



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de Agroquímica
y Tecnología de Alimentos



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**Metabolismo y síntesis de oligosacáridos
de la leche humana mediante la
utilización de enzimas glicosil hidrolasas
de *Lactobacillus casei***

TESIS DOCTORAL
Gonzalo Nahuel Bidart

Dirigida por: Dra. María Jesús Yebra Yebra
Dr. Jesús Rodríguez Díaz
Tutor: Dr. Manuel Hernández Pérez

Valencia, Julio 2016



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

La Dra. María Jesús Yebra Yebra, Científica Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) con destino en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA):

CERTIFICA:

Que Don **Gonzalo Nahuel Bidart Costoya**, Licenciado en Biotecnología por la Universidad Nacional de San Martín (Argentina), ha realizado bajo mi dirección el trabajo que, con el título **“Metabolismo y síntesis de oligosacáridos de la leche humana mediante la utilización de glicosil hidrolasas de *Lactobacillus casei*”**, presenta para optar al grado de Doctor en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Paterna, a de de 2016.

Dra. María Jesús Yebra Yebra



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

El Dr. Jesús Rodríguez Díaz, Investigador Contratado Ramón y Cajal de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que Don **Gonzalo Nahuel Bidart Costoya**, Licenciado en Biotecnología por la Universidad Nacional de San Martín (Argentina), ha realizado bajo mi codirección el trabajo que, con el título **“Metabolismo y síntesis de oligosacáridos de la leche humana mediante la utilización de glicosil hidrolasas de *Lactobacillus casei*”**, presenta para optar al grado de Doctor en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Paterna, a de de 2016.

Dr. Jesús Rodríguez Díaz



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

El Dr. Manuel Hernández Pérez, Profesor Titular de la Universidad Politécnica de Valencia:

CERTIFICA:

Que don **Gonzalo Nahuel Bidart Costoya**, Licenciado en Biotecnología por la Universidad Nacional de San Martín (Argentina), ha realizado bajo mi tutela el trabajo que, con el título **“Metabolismo y síntesis de oligosacáridos de la leche humana mediante la utilización de glicosil hidrolasas de *Lactobacillus casei*”**, presenta para optar al grado de Doctor en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Paterna, a de de 2016.

Dr. Manuel Hernández Pérez

“No tenemos en nuestras manos la solución a los problemas del mundo.
Pero frente a los problemas del mundo, tenemos nuestras manos.”

Mamerto Menapace
La misión de las manos, del libro “La sal de la tierra” (1977)

Agradecimientos

A la Fundación Carolina y al Ministerio de Educación de la Nación Argentina por haberme concedido la beca doctoral que ha permitido el desarrollo de esta tesis, y un crecimiento personal impensado antes de embarcarme en esta aventura. Agradezco también a la “European Molecular Biology Organization” por haberme concedido una beca para realizar una estadía en la Universidad de Utrecht y así poder completar una parte interesante de esta tesis.

A la Dra. María Jesús Yebra, por abrirme las puertas de su laboratorio y enseñarme todo lo que se sabe sobre bacterias lácticas. Por permitirme formarme como científico, porque siempre que estuvo en sus manos el hacerlo promovió mi crecimiento profesional. Porque además de haber sido una gran directora, desde el primer momento que llegué a este país se ha preocupado no solo por su becario de laboratorio sino por la persona detrás. Al Dr. Jesús Rodríguez Díaz, por codirigir esta tesis doctoral y por todo el conocimiento que me ha transmitido en estos años. Por estar siempre presente aún a la distancia y contribuir enormemente a mi formación.

A Manuel Hernández Pérez, por ser mi tutor y estar siempre dispuesto a ayudar con cualquier trámite necesario, incluyendo las decenas de informes mensuales que ha tenido que firmar.

A los Dres. Vicente Monedero, Gaspar Pérez, Manolo Zúñiga y la Dra. Maria Carmen Collado, que junto a la Dra. Yebra encabezan al Laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos, y han formado un excelente grupo de trabajo donde cualquiera puede contar con el apoyo o consejo de quien lo necesite.

A todos los que me han ayudado a realizar mi tesis doctoral. Mis compañeros de laboratorio, Ainhoa, Ludovica, Izaskun, Christine, Amalia, Pepe, Laia, Azahara y Nuria. Especialmente a Cristina por los mil y un favores que me has hecho y tu predisposición constante a ayudar. Jimmy por todo el recorrido que hemos hecho a la par en nuestros doctorados, por el día a día en el laboratorio, los congresos, el hoy por mi mañana por ti, el fútbol, el vóley, por todo gracias. Al personal de mantenimiento y el personal técnico del IATA, por contribuir a que se pueda trabajar con mayor libertad y en un ambiente adecuado. A Susana, por su ayuda en la traducción al valenciano.

A “Los Enzimas”, por su buena onda, por todas las veces que compartieron sus equipos/reactivos, y por ese momento indispensable de distracción diaria que son las comidas de cada día.

A mis amigos de la vida, los que permanecen a la distancia y los que he encontrado desde mi llegada a Valencia y mi estancia en Utrecht. Gracias por hacer que la vida sea más alegre, divertida y completa. Especialmente a Pablo Nikel, además de un amigo, mi primer mentor en la ciencia, por los consejos y empujones que recibí en momentos de bajón y por todos los viajes que hemos compartido.

A Cristi F. Albariño, por toda la ayuda en el diseño de imágenes, maquetado y especialmente por haber compartido y soportado los buenos y malos momentos derivados del labo (y otros que no), por estar siempre dispuesta a escuchar y entender.

Finalmente, le quiero agradecer a toda mi familia, porque gracias a ellos soy quien soy, y porque siempre me han apoyado. Especialmente a mis padres, Néstor y Loli, de quiénes he adquirido los valores más importantes, gracias por la confianza y por siempre hacerme sentir que este es donde están ustedes conmigo para lo que necesite.

A los que no nombro en este momento, pero que han dejado su huella en estos años. A todos, muchas gracias.

Acknowledgments

I would like to thank Prof. Dr. Johan Garssen for accepting me in his laboratory at the Utrecht University, where I spent three months carrying out the immunomodulatory experiments described in the chapter 4. To Linette Willemsen, thanks for patiently explaining me, a thousand times, everything that I did not understand regarding immunology and immunomodulation. Thanks for showing me your particular philosophical approach to science, and for showing that we are fortunate to do what we love and to contribute from our position. To Gemma Dingjan, thank you for helping me with all the experiments, for working side by side with me even during weekends and specially for helping me make my stay in Utrecht and in the laboratory not only fruitful, but also funy, introducing me to the people and integrating me into the out work activities.

To all my friends in Utrecht, from the lab and from outside the lab, because of them, now I do not only have two homes, but three. Thanks.

Resumen

La leche humana contiene una gran cantidad de oligosacáridos, libres o unidos a lípidos y proteínas, y su función fisiológica es mayoritariamente desconocida. Estos oligosacáridos son resistentes a la digestión y una gran proporción llega al intestino del lactante, donde pueden ser sustratos para la microbiota. La lacto-N-biosa (LNB) y la galacto-N-biosa (GNB) son las estructuras tipo-1 que forman el núcleo de los oligosacáridos de la leche humana (OLH) y de las glicoproteínas de la mucina, respectivamente. Los dos azúcares son fermentados por especies del género *Bifidobacterium*, pero no hay datos acerca de su utilización por el género *Lactobacillus*. Tampoco hay información para este género acerca del metabolismo de la N-acetil-lactosamina (LacNAc), que constituye la cadena de azúcar tipo-2 en los OLH, y de la lacto-N-triosa, que forma parte de la estructura de la lacto-N-tetraosa, uno de los OLH más abundantes.

Lactobacillus casei es una bacteria láctica aislada de numerosos nichos ambientales como leche, carne, materia vegetal y los tractos reproductivos y gastrointestinales de animales y humanos, incluyendo el intestino de niños lactantes. Además, algunas cepas se utilizan como cultivos iniciadores en la industria láctea y también como probióticos. Esta característica ha llevado a que una de las aplicaciones más recientes de esta especie sea su adición a fórmulas maternizadas. En este estudio se ha utilizado la cepa de *L. casei* BL23, porque tiene propiedades probióticas, se puede manipular genéticamente y se dispone de la secuencia de su genoma.

La capacidad de *L. casei* de prevalecer en el sistema gastrointestinal dependerá en parte de su versatilidad metabólica para utilizar los carbohidratos disponibles. En la presente Tesis Doctoral se ha demostrado que la cepa *L. casei* BL23 se puede cultivar en presencia de LNB, GBN, LacNAc, y lacto-N-triosa como fuentes de carbono. En el metabolismo de la LNB, GNB y también N-acetilgalactosamina (GalNAc) está implicado el operon *gnbREFGBCDA*. El análisis de actividades enzimáticas y de mutantes para estos genes demostró que esos tres carbohidratos son transportados por el mismo sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS^{Gnb}), y que la fosfo-β-galactosidasa GnbG hidroliza ambos disacáridos. Sin embargo, la N-acetilgalactosamina-6P deacetilasa (GnbF) y la galactosamina-6P isomerasa/deaminasa (GnbE) están implicadas en la fermentación de la GNB, pero no de la LNB. La

utilización de ésta depende del gen *nagA*, que codifica para una N-acetilglucosamina-6P deacetilasa. Análisis transcripcionales demostraron que el operon *gnb* está regulado por inducción del substrato mediada por el represor transcripcional GnbR, el cual se une a una región de DNA de 26 pares de bases que contiene secuencias invertidas repetidas exhibiendo un núcleo conservado 2T/2A. Por encima del operon *gnb*, hay dos genes *bnag* y *mana*, que codifican para el precursor de una β -N-acetilglucosaminidasa y una manosa-6P isomerasa. Se ha demostrado que BnaG es un enzima extracelular unido a la pared celular y que está implicado en el metabolismo de la lacto-N-triosa. Ésta es hidrolizada por BnaG en lactosa y N-acetilglucosamina (GlcNAc). El enzima ManA está implicada en el metabolismo de la manosa presente en el disacárido 3'-N-acetilglucosaminil-manosa, el cual es también una fuente de carbono para *L. casei* BL23. Por último, en esta cepa se ha demostrado que la LacNAc es transportada y fosforilada por el PTS de la lactosa e hidrolizada intracelularmente por la fosfo- β -galactosidasa LacG en galactosa-6P y GlcNAc. Análisis transcripcionales demostraron que el operon *lac*, además de por lactosa, está también inducido por LacNAc.

Para intentar comprender mejor el metabolismo y potencial bioactivo de los OLH se necesitan cantidades adecuadas de éstos, las cuales, dadas las dificultades implícitas a su obtención de la leche humana o por síntesis química, dependerán del desarrollo de aproximaciones enzimáticas. Además, los oligosacáridos son abundantes en la leche humana pero no en las fórmulas infantiles. Con el objeto de disponer de LNB y GNB en cantidad suficiente para ensayar su actividad biológica, se han sintetizado *in vitro* ambos disacáridos utilizando para ello la capacidad de transglicosidación de la glicosil hidrolasa GnbG aislada de *L. casei*. Las reacciones de transglicosidación se escalaron, los productos resultantes se purificaron, y se obtuvieron rendimientos de 10.7 ± 0.2 g/l de LNB y 10.8 ± 0.3 g/l de GNB.

Ambos disacáridos fueron utilizados *in vitro* para determinar sus propiedades prebióticas potenciales con 33 cepas de *Lactobacillus* correspondientes a 13 especies diferentes. Se determinó que 21 de las cepas, correspondientes a las especies *L. casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus zae*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus johnsonii* fueron capaces de metabolizar tanto GNB como LNB. Experimentos de hibridación de DNA demostraron que el metabolismo de estos disacáridos en las cepas de *L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. zae* depende de una fosfo- β -galactosidasa homóloga a GnbG.

Existen evidencias científicas recientes que les atribuyen a los OLH propiedades inmunomoduladoras, así que se han determinado éstas *in vitro* para LNB y GNB, y para dos fucosiloligosacáridos (Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc) sintetizados anteriormente en nuestro laboratorio. Se ha demostrado que los cuatro disacáridos son capaces de incrementar significativamente la producción de IFN- γ en Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC). El Fuc- α -1,6-GlcNAc además fue capaz de reducir significativamente la producción de IL13. Estos resultados sugieren un efecto estimulante del sistema inmune y en el caso particular del Fuc- α -1,6-GlcNAc un efecto polarizador de la respuesta inmune Th1/Th2 hacia poblaciones Th1.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han permitido ampliar los conocimientos sobre la síntesis, el metabolismo por especies del género *Lactobacillus*, y las propiedades inmunomoduladoras de oligosacáridos específicos presentes en la leche humana y en la mucosa. Esto podría contribuir a entender mejor la posible función de los OLH en la colonización por esas especies del tracto gastrointestinal de los niños, y en la estimulación de la respuesta inmune.

Abstract

Human milk contains a large number of oligosaccharides, either free or bound to proteins and lipids, and their physiological role is mostly unknown. These oligosaccharides are resistant to host gastrointestinal digestion and therefore, a significant proportion reaches the infant colon, where they can be substrates for the resident microbiota. Lacto-N-biose (LNB) and galacto-N-biose (GNB) are the core type-1 sugar structures in HMO and mucin glycoproteins, respectively. They are fermented by species of the genus *Bifidobacterium*, but, there is no data about their utilization by the genus *Lactobacillus*. There is also no information for this genus about the metabolism of N-acetyllactosamine (LacNAc), which constitutes the type-2 sugar core in HMO, and lacto-N-triose, which forms part of the structure of lacto-N-tetraose, one of the most abundant HMOs.

Lactobacillus casei is a lactic acid bacteria isolated from several environmental niches such as milk, meat, vegetables and reproductive and gastrointestinal tracts of animals and humans, including infant intestine. In addition, some strains are used as starter cultures in the dairy industry and also as probiotics. This characteristic resulted in one of the most recent applications for *L. casei* species, thus, its incorporation to infant formulas. The *L. casei* BL23 strain has been used in this study, due to its probiotic properties, it can be genetically manipulated and the availability of its genome sequence.

The capability of *L. casei* species to survive in the gastrointestinal tract would depend in part of its ability to metabolize the available carbohydrates. In this Thesis we have shown that this strain is able to grow using LNB, GBN, LacNAc, and lacto-N-triose as carbon sources, and we have characterized the corresponding metabolic pathways. *L. casei* contains a gene cluster, *gnbREFGBCDA*, involved in the metabolism of GNB, LNB and also N-acetylgalactosamine. Enzyme activities and knockout mutants analyses showed that the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS^{Gnb}) is involved in the transport of those three sugars and that GnbG (phospho- β -galactosidase) hydrolyzes both disaccharides. However, GnbF (N-acetylgalactosamine-6P deacetylase) and GnbE (galactosamine-6P isomerase/deaminase) are involved in GNB but not in LNB fermentation. The utilization of LNB depends on *nagA* (N-acetylglucosamine-6P deacetylase). Transcriptional analysis showed that the *gnb* operon

is regulated by substrate-specific induction mediated by the transcriptional repressor GnbR, which binds to a 26-bp DNA-region containing inverted repeats exhibiting a 2T/2A conserved core. Upstream of the *gnb* operon, there are two genes, *bnag* and *manA*, encoding a β -N-acetylglucosaminidase precursor and a mannose-6P isomerase. It has been shown that BnaG is an extracellular wall-attached enzyme and that it is involved on lacto-N-triose metabolism. Lacto-N-triose is hydrolyzed by BnaG into lactose and N-acetylglucosamine. ManA enzyme is involved in the utilization of the mannose moiety of 3'-N-acetylglucosaminyl-mannose, which is a carbon source for *L. casei* BL23. Finally, in this strain, LacNAc is transported and phosphorylated by the lactose PTS and it is intracellularly hydrolyzed by the phospho- β -galactosidase LacG into galactose-6P and GlcNAc. Transcriptional analysis showed that the *lac* operon, in addition to lactose, is also induced by LacNAc.

In an effort to better understand the metabolism and bioactive potential of HMO, sufficient quantities are required, which, due to the implied difficulties to obtain them from human milk or chemical synthesis will rely on the development of enzymatic approaches. Additionally, oligosaccharides are abundant in human milk but not in infant formula. In order to have enough amounts of LNB and GNB to test their biological activities, both disaccharides have been synthesized *in vitro* using the transglycosylation activity of the GnbG glycosyl hydrolase isolated from *L. casei*. Transglycosylation reactions were scaled and the resulting products were purified, and the yields obtained were 10.7 ± 0.2 g/L of LNB and 10.8 ± 0.3 g/l of GNB.

Both disaccharides were used *in vitro* to determine their potential prebiotic properties using 33 *Lactobacillus* strains corresponding to 13 different species. It was determined that 21 strains, corresponding to the species *L. casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus zae*, *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus johnsonii* were able to metabolize both GNB as LNB. DNA hybridization experiments suggested that the metabolism of those disaccharides in the *L. casei*, *L. rhamnosus* and *L. zae* strains tested relies upon a phospho- β -galactosidase homologous to GnbG.

Recently, some scientific evidences suggest an immunomodulatory function for HMO. *In vitro* analyses to assay this function have been performed for LNB and GNB, and for two fucosyloligosaccharides (Fuc- α -1,3-GlcNAc and Fuc- α -1,6-GlcNAc) previously synthesized in our laboratory. The four disaccharides were able to significantly increase IFN- γ production in Peripheral Blood Mononuclear Cells

(PBMC). Fuc- α -1,6-GlcNAc was also able to significantly reduce the production of IL13. These results suggest a stimulatory effect on the immune system, and in the particular case of Fuc- α -1,6-GlcNAc, a polarizing effect of immune response Th1 / Th2 towards Th1 populations.

The results obtained in this Thesis allowed expanding the knowledge about synthesis, metabolism by *Lactobacillus* species, and immunomodulatory properties of specific oligosaccharides present in human milk and mucosa. These would contribute to a better understanding of the possible role of HMO in infant gut colonization by those species, and in the immune response stimulation.

Resum

La llet humana conté una gran quantitat d'oligosacàrids, lliures o conjugats amb lípids o proteïnes i la seua funció fisiològica és majoritàriament desconeguda. Aquests oligosacàrids són resistents a la digestió i una gran proporció arriba a l'intestí dels lactants, on poden ser substrat per a la microbiota. La lacto-N-biosa (LNB) i la galacto-N-biosa (GNB) són les estructures tipus-1 que conformen el nucli dels oligosacàrids de la llet humana (OLH) i de les glicoproteïnes de la mucina, respectivament. Els dos sucres són fermentats per espècies del gènere *Bifidobacterium*, però no existeixen dades sobre l'ús pel gènere *Lactobacillus*. Tampoc no hi ha informació per a aquest gènere sobre el metabolisme de la N-acetil-lactosamina (LacNAc), que constitueix la cadena de sucre tipus-2 als OLH i de la lacto-N-triosa, que forma part de l'estructura de la lacto-N-tetraosa, ú dels OLH més quantios.

Lactobacillus casei és una bactèria làctica aïllada de múltiples nínxols ambientals com la llet, carn, matèria vegetal i els tractes reproductius d'animals i humans, incloent-hi l'intestí d'infants lactants. A més a més, algunes soques s'utilitzen com a cultius iniciadors a la indústria làctia i també com a probiòtics. Aquesta característica comporta que una de les aplicacions més recents d'aquesta espècie implique l'addició d'aquestes a fórmules maternitzades. En aquest estudi s'ha utilitzat la soca de *L. casei* BL23, ja que té propietats probiòtiques, es pot manipular genèticament i es disposa de la seqüència del seu genoma.

La capacitat de *L. casei* de prevaler al sistema gastrointestinal dependrà en part de la seua versatilitat metabòlica per a utilitzar els carbohidrats disponibles. A la present tesi doctoral s'ha demostrat que la soca *L. casei* BL23 es pot cultivar en presència de LNB, GBN, LacNAc i lacto-N-triosa com a fonts de carboni. Al metabolisme de la LNB, GNB i també de la N-acetilgalactosamina (GalNAc) està implicat l'operó *gnbREFGBCDA*. L'anàlisi d'activitats enzimàtiques i de mutants per a aquests gens demostrà que aquests tres carbohidrats són transportats pel mateix sistema fosfotransferasa de sucres dependent de fosfoenolpiruvat (PTS^{Gnb}), i que la fosfo-β-galactosidasa GnbG hidrolitza ambdós disacàrids. D'altra banda, la N-acetilgalactosamina-6P deacetilasa (GnbF) y la galactosamina-6P isomerasa/deaminasa (GnbE) estan implicades en la fermentació de GNB, però no de la LNB. La utilització d'aquesta depèn del gen *nagA*, que codifica per a una N-acetilglucosamina-6P

deacetilasa. Anàlisi transcripcionals demostraren que l'operó *gnb* està regulat per inducció del substrat mitjançant el repressor transcripcional GnbR, el qual s'uneix a una regió de DNA de 26 parells de bases que contenen seqüències invertides repetides exhibint un nucli conservat 2T/2A. A sobre de l'operó *gnb*, hi ha dos gens *bnA* i *manA*, que codifiquen per al precursor d'una β -N-acetilglucosaminidasa i una manosa-6P isomerasa. S'ha demostrat que BnA és un enzim extracel·lular unit a la paret cel·lular i que està implicat en el metabolisme de la lacto-N-triosa. Aquesta és hidrolitzada per BnA en lactosa i N-acetilglucosamina (GlcNAc). L'enzim ManA està implicada en el metabolisme de la manosa present al disacàrid 3'-N-acetilglucosaminilmanosa, el qual també representa una font de carboni per a *L. casei* BL23. Per concloure, en aquesta soca s'ha demostrat que la LacNAc és transportada i fosforilada pel PTS de la lactosa i hidrolitzada intracel·lularment per la fosfo- β -galactosidasa LacG en galactosa-6P i GlcNAc. Anàlisi transcripcionals demostraren que l'operó *lac*, a més de per lactosa està induït per LacNAc.

Per intentar comprendre millor el metabolisme i potencial bioactiu dels OLH es necessiten quantitats adequades d'aquests, les quals, donades les dificultats implícites a la seua obtenció a partir de la llet humana o per síntesi química, dependran del desenvolupament d'aproximacions enzimàtiques. A més a més, els oligosacàrids són abundants en la llet humana però no a les fórmules infantils. A fi de disposar de LNB i GNB en quantitats suficients per a assajar la seua activitat biològica, s'han sintetitzat *in vitro* ambdós disacàrids utilitzant per a tal la capacitat de trasglicosidació de la glicosil hidrolasa GnbG aïllada de *L. casei*. Les reaccions de trasglicosidació s'escalaren, els productes resultants es purificaren i s'obtingueren rendiments de 10.7 ± 0.2 g/l de LNB y 10.8 ± 0.3 g/l de GNB.

Ambdós disacàrids foren utilitzats *in vitro* per a determinar les seues propietats prebiòtiques potencials amb 33 soques de *Lactobacillus* corresponents a 13 espècies diferents. Es determinà que 21 de les soques, corresponents a les espècies *L. casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus zeae*, *Lactobacillus gasseri* i *Lactobacillus johnsonii* foren capaces de metabolitzar tant GNB com LNB. Experiments d'hibridació de DNA demostraren que el metabolisme d'aquests disacàrids a les soques de *L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. zeae* depèn d'una fosfo- β -galactosidasa homòloga a GnbG.

Existeixen evidències científiques recents que atribueixen als OLH propietats immunomoduladores, així que s'han determinat aquestes *in vitro* per a LNB i GNB i per als dos fucosiloligosacàrids (Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc) sintetitzats

anteriorment al nostre laboratori. S'ha demostrat que els quatre disacàrids són capaços d'incrementar significativament la producció de IFN- γ en Cèl·lules Mononuclears de Sang Perifèrica (PBMC). El Fuc- α -1,6-GlcNAc a més, fou capaç de reduir significativament la producció de IL13. Aquests resultats suggereixen un efecte estimulador del sistema immune i en el cas particular del Fuc- α -1,6-GlcNAc un efecte polaritzador de la resposta immune Th1/Th2 cap a poblacions Th1.

Els resultats que s'han obtingut en aquesta Tesi Doctoral han permès ampliar els coneixements sobre la síntesi, el metabolisme per espècies del gènere *Lactobacillus* i les propietats immunomoduladores d'oligosacàrids específics presents en la llet humana i a la mucosa. Açò podria contribuir a entendre millor la possible funció dels OLH a la colonització per aquestes espècies del tracte gastrointestinal dels xiquets i a l'estimulació de la resposta immune.

Índice

Abreviaturas

1. Introducción general	1
1.1. Oligosacáridos de leche humana (OLH)	3
1.1.1. Composición, concentración y estructura molecular	3
1.1.2. Glicoproteínas y glicolípidos en la leche humana	5
1.1.2.1. Glicoproteínas	5
1.1.2.2. Glicolípidos	8
1.1.3. Variación interpersonal de la composición.	9
1.1.4. Biosíntesis de OLH	11
1.1.5. Metabolismo de OLH	13
1.1.6. Efectos beneficiosos de los OLH	14
1.1.6.1. Efecto prebiótico	14
1.1.6.2. Efecto antiadhesina	15
1.1.6.3. Efecto antimicrobiano	18
1.1.6.4. Efecto modulador de la respuesta celular del epitelio intestinal	20
1.1.6.5. Efecto inmunomodulador	20
1.1.6.6. Efecto protector frente a la enterocolitis necrotizante	23
1.1.6.7. Efecto sobre el desarrollo cerebral	23
1.1.6.8. Efectos sobre la madre	24
1.1.7. Oligosacáridos en leches de otros mamíferos y leches de fórmula	26
1.1.8. Producción de OLH	27
1.1.8.1. Síntesis química de OLH	27
1.1.8.2. Síntesis enzimática de OLH	28
1.1.8.2.1. Glicosiltransferasas	28
1.1.8.2.2. Glicosidasas	29
1.1.8.3. Síntesis por ingeniería genética	31
1.2. Lacto-N-biosa (LNB) y galacto-N-biosa (GNB)	32
1.2.1. Rutas metabólicas de LNB y GNB en <i>Bifidobacterium</i>	36
1.2.2. Síntesis de LNB y GNB	38
1.3. N-acetilactosamina y lacto-N-triosa	41
1.4. Bacterias lácticas	42
1.4.1. <i>Bifidobacterium</i>	43
1.4.2. <i>Lactobacillales</i>	44
1.4.2.1. El género <i>Lactobacillus</i> en la leche humana	45
1.4.2.2. Metabolismo de carbohidratos	45
1.4.2.3. Sistemas de transporte de azúcares	47

1.4.2.3.1.	Permeasas dependientes del gradiente de protones	47
1.4.2.3.2.	Sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato o PTS	47
1.4.2.4.	<i>Lactobacillus casei</i>	48
1.4.3.	Probióticos	49
2.	Objetivos	53
2.1.	Objetivo general	55
2.2.	Objetivos específicos	55
3.	Materiales y métodos	57
3.1.	Cepas, plásmidos y oligonucleótidos	59
3.2.	Medios de cultivo y condiciones de cultivo	59
3.2.1.	Medio LB y MRS	59
3.2.2.	Medio MRS basal	59
3.2.3.	Antibióticos y aditivos	59
3.2.4.	Cultivos para la extracción de RNA y para la determinación del consumo de oligosacáridos de las distintas cepas	61
3.3.	Manipulaciones genéticas	63
3.3.1.	Aislamiento de DNA	63
3.3.2.	Transformación con DNA plasmídico	64
3.3.3.	Reacciones de amplificación de DNA por PCR	64
3.3.4.	Electroforesis en geles de agarosa	64
3.3.5.	Ensayos de retardo en gel	64
3.3.6.	Ensayos de footprinting	65
3.3.7.	Ensayos de southernblot	65
3.3.8.	Búsqueda bioinformática y diseño de oligonucleótidos cebadores	66
3.3.9.	Generación de mutantes derivados de <i>L. casei</i> BL23	66
3.3.10.	Secuenciación de DNA y análisis de secuencias	68
3.3.11.	Aislamiento de RNA, RT-PCR y PCR cuantitativa (RT-qPCR)	68
3.4.	Métodos analíticos	69
3.4.1.	Determinación de azúcares residuales en el medio de cultivo y productos de hidrólisis enzimática y transglicosidación	69
3.4.2.	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)	70
3.5.	Manipulación de proteínas	70
3.5.1.	Clonación, expresión y purificación de 6XHis-GnbR, 6XHis-GnbE, 6XHis-GnbF, 6XHis-GnbG, 6XHis-GnbGMutEnd, 6XHis-BnaG, 6XHis-ManA y 6XHis-LacG	70
3.5.2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida	71

3.5.3.	Ensayo de actividad de las enzimas 6XHis-GnbG, 6XHis-GnbGMutEnd, 6XHis-BnaG y 6XHis-LacG	72
3.5.4.	Ensayo de actividad de las enzimas 6XHis-GnbF (N-Acetilgalactosamina-6P deacetilasa) y 6XHis-GnbE (Galactosamina-6P deaminasa/isomerasa)	72
3.5.5.	Ensayo de actividad de la enzima 6XHis-ManA (Manosa-6P isomerasa)	73
3.5.6.	Ensayo de actividad β -N-Acetilglucosaminidasa en células enteras y sobrenadantes de cultivo de <i>L. casei</i> BL23	73
3.6.	Síntesis y purificación de LNB y GNB	74
3.6.1.	Reacciones de transgalactosidación	74
3.6.2.	Purificación de LNB y GNB	74
3.7.	Ensayo del potencial prebiótico	74
3.7.1.	Cultivo de las cepas	74
3.8.	Ensayos del potencial inmunomodulador	76
3.8.1.	Cultivo de células de epitelio intestinal (IEC)	76
3.8.2.	Purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	76
3.8.3.	Modelo de co-cultivo en placas transwell	77
3.8.4.	Modelo de incubación directa	77
3.8.5.	ELISA	78
3.8.6.	Ensayo de viabilidad	78
3.8.7.	Análisis fenotípico de células T CD4+	78
3.8.8.	Análisis estadístico	78
4.	Resultados	79
4.1.	Metabolismo de lacto-N-biosa (LNB), galacto-N-biosa (GNB) y N-acetilgalactosamina (GalNAc) en <i>L. casei</i>	81
4.1.1.	<i>Lactobacillus casei</i> fermenta galacto-N-biosa (GNB) y lacto-N-biosa (LNB) y las hidroliza utilizando el mismo enzima	83
4.1.2.	GNB, LNB y GalNAc son transportados por el PTS ^{Gnb}	86
4.1.3.	GnbE y GnbF son necesarios para el metabolismo de la GNB, pero no de la LNB	89
4.1.4.	Identificación de la ruta de la Tagatosa-6P en <i>L. casei</i> y evaluación de su participación en el metabolismo de GNB y LNB	94
4.1.5.	Regulación del operón <i>gnb</i>	95
4.1.5.1.	Análisis transcripcional del operón <i>gnb</i>	95
4.1.5.2.	<i>gnbR</i> codifica un represor transcripcional del operón <i>gnb</i>	96
4.1.5.3.	Unión de GnbR al promotor de <i>gnbREFGBCDA</i>	97

4.2. Metabolismo de lacto-N-triosa en <i>L. casei</i>	99
4.2.1. La β -N-acetilglucosaminidasa BnaG de <i>L. casei</i> es una proteína extracelular anclada a pared	101
4.2.2. Especificidad de sustrato y características enzimáticas de la β -N-acetilglucosaminidasa BnaG de <i>L. casei</i> BL23	103
4.2.3. <i>L. casei</i> BL23 fermenta la lacto-N-triosa y la hidroliza utilizando la β -N-acetilglucosaminidasa BnaG	104
4.2.4. La enzima ManA es necesaria para el metabolismo de manosa y del disacárido GlcNAc β 1-3Man en <i>L. casei</i> BL23	108
4.3. Metabolismo de N-acetilactosamina (LacNAc) en <i>L. casei</i>	111
4.3.1. <i>L. casei</i> BL23 fermenta la N-acetilactosamina (LacNAc)	113
4.3.2. La LacNAc es transportada por el PTS de la lactosa	114
4.3.3. LacG es la enzima responsable de hidrolizar LacNAc	116
4.3.4. Participación de la ruta de la Tagatosa-6P en el metabolismo de lactosa y LacNAc en <i>L. casei</i>	118
4.3.5. Participación de <i>nagA</i> en el metabolismo de LacNAc en <i>L. casei</i>	119
4.3.6. El antiterminador transcripcional LacT está implicado en el metabolismo de la LacNAc en <i>L. casei</i> BL23	120
4.3.7. Análisis transcripcionales del operón <i>lac</i> mediante RT-qPCR	120
4.4. Síntesis, purificación de LNB y GNB, y evaluación de su potencial prebiótico e inmunomodulador	123
4.4.1. Actividad de transglicosidación de la fosfo- β -galactosidasa GnbG	125
4.4.2. Síntesis y purificación de lacto-N-biosa (LNB) y galacto-N-biosa (GNB) a escala preparativa	126
4.4.3. Construcción de una variante de GnbG por mutagénesis dirigida	129
4.4.4. Fermentación <i>in vitro</i> de LNB y GNB por cepas de <i>Lactobacillus</i>	130
4.4.5. Presencia de genes homólogos a <i>gnbG</i> en cepas de <i>Lactobacillus</i>	134
4.4.6. Análisis del potencial inmunomodulador de la LNB, GNB, fucosil- α 1,3-GlcNAc (Fuc1-3) y fucosil- α 1,6-GlcNAc (Fuc1-6)	136
4.4.6.1. Modelo de co-cultivo en placas transwell	137
4.4.6.1.1. Ausencia de citotoxicidad de los disacáridos	137
4.4.6.1.2. Efecto sobre la población de linfocitos T reguladores (Treg)	138

4.4.6.1.3. Efecto sobre la producción de citoquinas	138
4.4.6.2. Modelo de incubación directa	140
4.4.6.2.1. Efecto sobre la producción de citoquinas	140
5. Discusión	143
5.1. Metabolismo de oligosacáridos presentes en la leche humana y en la mucosa gastrointestinal	145
5.2. Producción de LNB y GNB, y evaluación de su potencial prebiótico e inmunomodulador	154
6. Conclusiones	159
7. Bibliografía	163
8. Anexo 1	197
9. Anexo 2	203
10. Anexo 3	222

Abreviaturas

2'FL	2'Fucosillactosa
3'FL	3'Fucosillactosa
3'SL	3'Sialillactosa
6'SL	6'Sialillactosa
ANOVA	Análisis de la varianza
Ap	Ampicilina
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATP	Adenosina trifosfato
BAL	Bacterias ácido lácticas
BSA	Albúmina sérica bovina
BSSL	Lipasa inducida por sales biliares.
CD	Células dendríticas
cDNA	DNA complementario
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DS	Desviación estándar
DSLNT	Disialil-lacto-N-tetraosa
DSM	Colección Alemana de Microorganismos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
Erm	Eritromicina
FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia (citometría de flujo)
FOS	Fructooligosacáridos
Fuc	Fucosa
FUT2	Fucosiltransferasa 2
FUT3	Fucosiltransferasa 3
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GBS	<i>Streptococcus</i> del grupo B
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GNB	Galacto-N-biosa
GOS	Galactooligosacáridos
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IBD	Enfermedades inflamatorias intestinales
IEC	Células de epitelio intestinal
Ig	Inmunoglobulina
IL10	Interleuquina 10
IL13	Interleuquina 13
IFN- γ	Interferon gamma
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
IQ	Coeficiente intelectual
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
K _m	Constante de afinidad (constante de michaelis menten)
LacNAc	N-acetilactosamina

LNB	Lacto-N-biosa
LNFP	Lacto-N-Fucopentosa
LNFP II	Lacto-N-Fucopentosa II
LNFP III	Lacto-N-Fucopentosa III
LNT	Lacto-N-tetraosa
LNNH	Lacto-N-neohexosa
LNNt	Lacto-N-neotetraosa
LPS	Lipopolisacárido
LST	Sialil-lacto-N-tetraosa
Man	Manosa
mRNA	RNA mensajero
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NCIMB	Colección Nacional de Bacterias Industriales, Alimenticias y Marinas, Reino Unido
NEC	Enterocolitis necrotizante
NeuAc	Ácido N-acetilneuramínico
NK	Células natural killer
OD/OD550	Densidad óptica/densidad óptica medida a $\lambda = 550$ nm
OLH	Oligosacáridos de leche humana
oNP	<i>orto</i> -nitrofenil
OPME	Sistemas multi enzima
pb	Par(es) de bases
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución de fosfatos salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PHA	Fitohemaglutinina
pIECs	Células epiteliales de intestino de niños prematuros
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
pNP	<i>para</i> -nitrofenil
PNC	Complejo plaqueta-neutrófilo
PTS	Sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato
qPCR	PCR cuantitativa
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Sia	Ácido siálico
sIgA	Inmunoglobulina A secretada
TACA	Carbohidrato antigénico asociado a tumores
Tag	Tagatosa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
UDP	Uridina difosfato
UV	Ultravioleta
V _{max}	Velocidad máxima

1. Introducción general



La leche materna es un fluido biológico complejo que aporta la energía y los nutrientes fundamentales para el crecimiento y desarrollo del recién nacido. Su composición está adaptada en cada especie a los requerimientos nutricionales del lactante, y por lo tanto varía en cada especie de mamífero. Además de los nutrientes básicos para el crecimiento de los recién nacidos, como proteínas, grasas, hidratos de carbono y vitaminas, la leche humana proporciona también una serie de compuestos bioactivos como enzimas, anticuerpos, hormonas, factores de crecimiento, poliaminas, nucleótidos y oligosacáridos.

1.1. Oligosacáridos de leche humana


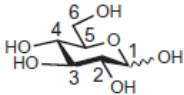

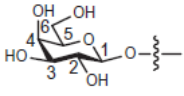

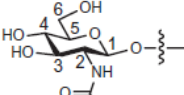

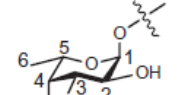

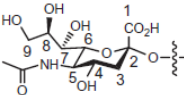
1.1.1. Composición, concentración y estructura molecular.

Los oligosacáridos de leche humana (OLH) son una familia de glicanos no conjugados, de gran diversidad estructural, y constituyen el tercer componente sólido presente en la leche, después de la lactosa y los lípidos. Si bien la cantidad y composición de los mismos varía de mujer a mujer y en el curso de la lactancia (Kunz *et al.*, 2000), en el calostro se observan concentraciones medias entre 20 y 25 g/L, mientras que a lo largo de la lactancia las concentraciones suelen decaer hasta valores entre 5 y 20 g/L (Bao *et al.*, 2007; Coppa *et al.*, 1999; Chaturvedi *et al.*, 2001a; Davidson *et al.*, 2004; Gabrielli *et al.*, 2011; Kunz *et al.*, 1999; Newburg *et al.*, 2000). Estas cantidades superan a la concentración total de proteínas presentes en la leche, y son de 100 a 1.000 veces mayor que la concentración de oligosacáridos presentes en la leche bovina, que es la base de la mayoría de las leches de fórmula infantiles.

Los OLH están compuestos por cinco monosacáridos, glucosa (Glc), galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc) y ácido N-acetilneuramínico (NeuAc). Este es el ácido siálico (Sia) presente en humanos, y es diferente al resto de los mamíferos donde el principal Sia corresponde al ácido N-glicolilneuramínico. Entre esos cinco monosacáridos constituyentes (Tabla 1.1), la Glc se encuentra siempre en el extremo reductor en una mezcla de sus anómeros α y β . La Gal y GlcNAc siempre están presentes con enlaces glicosídicos β -D-, y la Fuc y el Sia siempre están presentes con enlaces glicosídicos α -L- y α -D-, respectivamente. Los 12 enlaces glicosídicos que se encuentran en las estructuras de los OLH (Tabla 1.2.) incluyen tres tipos de enlace

galactosídico, dos tipos de enlace N-acetil-glucosaminídico, cuatro tipos de enlace fucosídico, y tres tipos de enlace sialisídicos.

Tabla 1.1. Monosacáridos constituyentes de los OLH.













Monosacáridos constituyentes de los OLH	Abreviatura	Símbolo	Estructura	Enlaces glicosídicos
Glucosa	Glc			Ninguno (solo en el extremo reductor)
Galactosa	Gal			β
N-acetil-glucosamina	GlcNAc			β
Fucosa	Fuc			α
Ac. N-AcetilNeuramínico (Ac. siálico)	Sia			α

La estructura de estos oligosacáridos sigue un patrón básico ya que todos ellos poseen lactosa (Gal β 1-4Glc) en su extremo reductor, que posteriormente puede ser extendido mediante la adición de un monosacárido (Fuc o Sia), permitiendo la formación de trisacáridos, o mediante la adición en β 1-3 o β 1-6 de los disacáridos lacto-N-biosa (Gal β 1-3GlcNAc) o N-acetillactosamina (Gal β 1-4GlcNAc) formando oligosacáridos de cadena tipo 1 o 2 respectivamente (Fig. 1.1a).

La adición de una molécula de lacto-N-biosa termina la elongación de la cadena, posibilitando únicamente la adición de los monosacáridos Fuc y Sia, mientras que el agregado de una N-acetillactosamina permite que se extienda aún más el oligosacárido con una nueva adición de uno de estos disacáridos. Los enlaces β 1-6 entre dos unidades de disacárido introducen ramificaciones de cadena, estas estructuras ramificadas se denominan *iso*-OLH, mientras que las estructuras lineales formadas por los enlaces β 1-3 son llamados *para*-OLH (Fig. 1.1b). Tanto la lactosa, como la cadena con la cual se alargan los oligosacáridos pueden ser fucosiladas en enlaces α 1-2, α 1-3 o α 1-4 y / o sialiladas en enlaces α 2-3 o α 2-6 (Figs. 1.1c). Algunos de los OLH pueden sintetizarse en varias formas isoméricas, como es el caso de la lacto-N-fucopentosa (LNFP) o la

sialil-lacto-N-tetraosa (LST). Se ha determinado la estructura de más de cien OLH diferentes (Kobata, 2010).

Tabla 1.2. Enlaces presentes en la estructura de los OLH

Enlace glicosídico	Abreviatura	Símbolo
Galactosídicos	Gal β 1-4Glc	
	Gal β 1-3GlcNAc	
	Gal β 1-4GlcNAc	
N-acetil-glucosaminídicos	GlcNAc β 1-3Gal	
	GlcNAc β 1-6Gal	
Fucosídicos	Fuc α 1-2Gal	
	Fuc α 1-3Glc	
	Fuc α 1-3GlcNAc	
	Fuc α 1-4GlcNAc	
Sialisídicos	Sia α 2-3Gal	
	Sia α 2-6Gal	
	Sia α 2-6GlcNAc	

1.1.2. Glicoproteínas y glicolípidos en la leche humana.

Además de oligosacáridos libres, en la leche humana se pueden encontrar oligosacáridos conjugados a proteínas y a lípidos.

1.1.2.1. Glicoproteínas

La glicosilación de proteínas es una modificación post-traduccional en donde un glicano es unido covalentemente a un aminoácido determinado en la estructura de una proteína. Existen dos tipos de glicosilación en eucariotas, N-glicosilación y O-

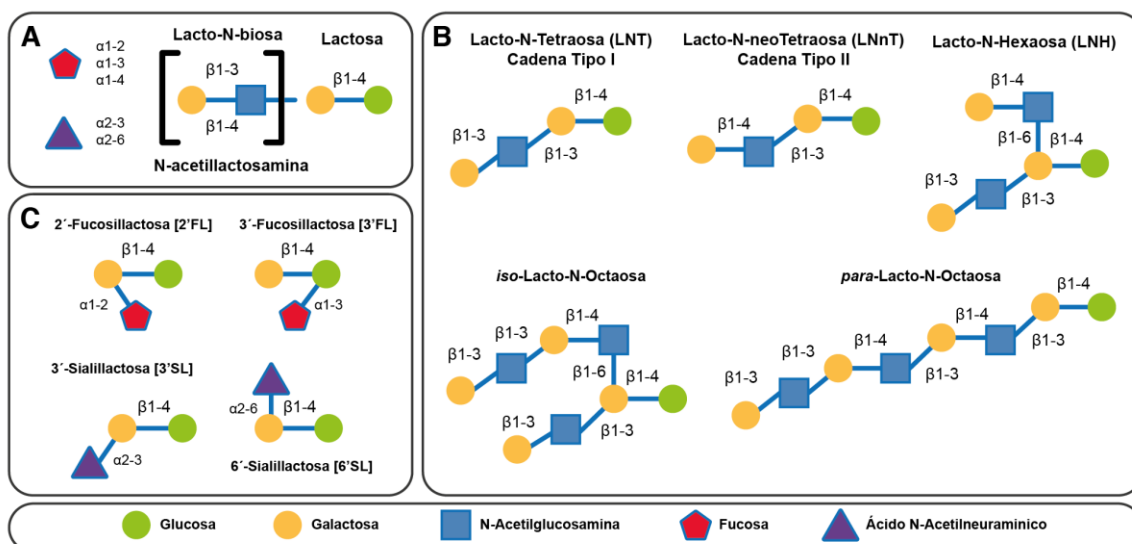


Fig. 1.1. (a) Estructura básica de los oligosacáridos de leche humana. (b) La lactosa puede ser glicosilada con lacto-N-biosa (OLH Tipo I) o N-acetilglucosamina (OLH tipo II). La glicosilación puede generarse tanto en enlaces β1-3, como en enlaces β1-6. (c) La lactosa puede ser fucosilada o sialilada en diferentes enlaces, generando diferentes trisacáridos (Adaptado de Bode 2012).

glicosilación. Estos glicoconjugados están involucrados en distintos procesos fisiológicos como por ejemplo la síntesis, plegado y secreción de proteínas, resistencia a proteólisis y prevención de la colonización de epitelios por patógenos (Barboza *et al.*, 2012; Gopal and Gill, 2000; Newburg *et al.*, 2005; Peterson *et al.*, 1998; Rudd *et al.*, 1994). En la leche humana se encuentran una gran cantidad de glicoproteínas (Tabla 1.3), incluyendo entre otras mucinas e inmunoglobulinas (Froehlich *et al.*, 2010).

La N-glicosilación se produce en asparaginas específicas en la secuencia Asn-X-Ser/Thr (Stanley *et al.*, 2009) y siempre posee en su estructura un pentasacárido compuesto por Man3GlcNAc2, donde la última GlcNAc se enlaza a la asparagina mediante un enlace β. Este pentasacárido puede ser modificado dando lugar a las tres clases principales de N-glicanos: (1) alto en manosa, con ramificaciones de α-manosa; (2) complejo, con una fucosilación en enlace α1-6 a la GlcNAc basal unida a la asparagina y dos o más repeticiones de N-acetilglucosamina en las posiciones terminales, que además pueden estar fucosiladas o sialiladas; (3) híbrido, que consiste en una mezcla de los dos tipos. El N-glicoma humano ha sido descrito en detalle, y en general, los N-glicanos de la leche humana se encuentran altamente fucosilados y en

mayor concentración a los encontrados en leche de vaca (Dallas *et al.*, 2011; Nwosu *et al.*, 2012).

Tabla 1.3. Principales glicoproteínas de la leche humana.

Glicoproteína	Peso molecular (kDa)	Concentración (mg/L)
Mucinas	200-2000	729±75
sIgA	160	200-6200
BSSL	120-140	100-200
Lactoferrina	80	1000-7000
Lactoperoxidasa	77,5	0,77±0,38
Butirofilina	66	41±3
Lactadherin	46	93±10
Adiponectina	30	4-88
β -caseína	24	4670±890
κ -caseína	19	100-4600
Leptina	16	0,003
Lisozima	14,4	21±13
α -lactoalbumina	14,2	2440±640

sIgA, Inmunoglobulina A secretada; BSSL, Lipasa inducida por sales biliares.

A diferencia de la anterior, la O-glicosilación se produce en residuos aminoacídicos de serina o treonina, sin necesidad de una secuencia consenso en los alrededores. Hasta la fecha se han descrito ocho estructuras, todas ellas comienzan con una GalNAc unida mediante enlace α al aminoácido correspondiente, pero solo cuatro están presentes en humanos (Brockhausen *et al.*, 2009). En las estructuras de tipo 1 se une una Gal por un enlace β 1,3- a la GalNAc formando el disacárido galacto-N-biosa (Gal- β 1,3-GlcNAc; GNB). Además, todas las estructuras pueden ser elongadas con cadenas de N-acetilactosamina y fucosa o Sia en las posiciones terminales.

En la leche humana, la glicosilación de proteínas incrementa la resistencia de las proteínas a la proteólisis (van Berkel *et al.*, 1995), contribuyendo a la excreción de proteínas intactas o parcialmente degradadas en las heces de niños amamantados (Davidson and Lonnerdal, 1987; Prentice *et al.*, 1989). Por lo tanto, estas proteínas pueden transitar el tracto gastrointestinal jugando un rol en el desarrollo de la microbiota (Garrido *et al.*, 2013). Las evidencias científicas indican que la microbiota modifica los glicoconjugados del hospedador (Hoskins *et al.*, 1985; Variyam and Hoskins, 1981). Por ejemplo, ratones “Germfree” secretan las mucinas intactas en sus heces, mientras que animales convencionales degradan y metabolizan completamente

las mucinas (Corfield *et al.*, 1992; Midtvedt *et al.*, 1987). Además, se ha demostrado que bacterias aisladas tanto de niños como de adultos son capaces de deglicosidar las mucinas para utilizar los oligosacáridos como fuente de carbono (Derrien *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2000).

Hasta la fecha se han descrito varias especies de *Bacteroides* (Backhed *et al.*, 2005; Martens *et al.*, 2009) y *Bifidobacterium* (Crociani *et al.*, 1994; Hoskins *et al.*, 1985; Ruas-Madiedo *et al.*, 2008) capaces de degradar mucinas, lo cual representa una ventaja para estas especies que les permite sobrevivir y predominar en el tracto gastrointestinal de niños y adultos.

1.1.2.2. Glicolípidos

Los lípidos representan hasta el 5% del volumen total de la leche humana, y de ellos el 98% corresponden a triacilgliceroles (Jensen, 1999). De los restantes, una parte corresponden a glicolípidos, los cuales se encuentran asociados a membranas globulares presentes en la leche (Newburg and Chaturvedi, 1992). Los glicolípidos están formados por una cadena de ceramida unida covalentemente a uno o más monosacáridos. Los glicolípidos presentes en la leche pueden clasificarse en neutros, como la galactosilceramida y glucosilceramida (Bouhours and Bouhours, 1979), o ácidos (gangliosidos) aquellos que tienen Sia (Laegreid *et al.*, 1986). Los gangliosidos más abundantes en la leche humana son GD3 ($\alpha 2$ -8NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer) y GM3 (NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer) (Lee *et al.*, 2011).

Los dominios glicano de los glicolípidos tienen un papel importante en la inhibición de la adhesión de patógenos. El primer paso para la entrada de patógenos o sus toxinas es la unión a los epitelios. Estos procesos suelen estar mediados por glicolípidos, motivo por el cual, los glicolípidos asociados a las membranas globulares lipídicas de la leche son capaces de prevenir la unión de bacterias, virus o toxinas al intestino (Lindberg *et al.*, 1987; Miller-Podraza *et al.*, 2005; Newburg, 2009; Otnaess *et al.*, 1983). Además se ha descrito que varios comensales intestinales son capaces de adherirse a glicolípidos *in vitro* (Mukai *et al.*, 2004; Neeser *et al.*, 2000; Stromberg *et al.*, 1988; Yamamoto *et al.*, 1996).

Se han realizado algunos estudios para investigar la degradación de glicolípidos de la leche o de epitelios por miembros de la microbiota intestinal, y en ellos se indica que poseen enzimas capaces de hidrolizar gran parte de estos glicoconjugados (Larson *et al.*, 1988). El patrón de lípidos en heces, en modelos animales y en niños amamantados, sugiere

que después de establecerse, la microbiota intestinal es la responsable de la degradación de glicolípidos (Gustafsson *et al.*, 1986; Midtvedt *et al.*, 1988). Se ha descrito también la capacidad de algunas bifidobacterias de liberar Sia a partir de los principales gangliósidos de la leche humana, GD3 y GM3, sugiriendo que estas bacterias poseen sialil hidrolasas con especificidad para enlaces α 2-8 y α 2-3 (Falk *et al.*, 1990).

1.1.3. Variación interpersonal de la composición.

La composición de los OLH varía de mujer a mujer y depende principalmente de factores genéticos relacionados con la expresión o no de ciertas glicosiltransferasas.

En el caso de la fucosilación de OLH, ésta puede producirse en diferentes tipos de enlaces, α 1-2-, α 1-3-, o α 1-4-, y depende del genotipo materno respecto de los antígenos sanguíneos Lewis (Chaturvedi *et al.*, 2001a; Johnson and Watkins, 1992; Kumazaki and Yoshida, 1984; Stahl *et al.*, 2001). La enzima fucosiltransferasa 2 (FUT2) codificada por el gen *Se* cataliza la adición de Fuc en enlaces α 1-2- en los epítomos de los antígenos sanguíneos Lewis, así como también en los OLH (Kumazaki and Yoshida, 1984). FUT2 se expresa en más del 70% de las mujeres caucásicas, y a éstas se las clasifica como “secretoras”. La leche de estas mujeres contiene altas concentraciones de OLH fucosilados en α 1-2- como por ejemplo 2’fucosillactosa (2’FL) o lacto-N-fucopentosa 1 (LNFP1). Las clasificadas como “no secretoras” no expresan FUT2, y por lo tanto la leche que producen carece de OLH fucosilados en α 1-2-.

Otra enzima, la fucosiltransferasa 3 (FUT3) codificada por el gen *Le* cataliza la adición de Fuc en enlaces α 1-3/4- (dependiendo de la estructura del OLH), y también puede ser inactiva en parte de la población, a ésta se la clasifica como Lewis negativa (Johnson and Watkins, 1992). La leche de mujeres Lewis negativas tiene una reducción marcada en la concentración de OLH fucosilados en enlaces α 1-3/4-.

Dependiendo de la expresión activa de FUT2 y FUT3, las mujeres son clasificadas en 4 grupos distintos: 1. Secretoras Lewis positivas (FUT2 activa, FUT3 activa), 2. Secretoras Lewis negativas (FUT2 activa, FUT3 inactiva), 3. No secretoras Lewis positivas (FUT2 inactiva, FUT3 activa), y 4. No secretoras Lewis negativas (FUT2 inactiva, FUT3 inactiva) (Fig. 1.2). La composición de los OLH presentes en la leche de mujeres de estos cuatro grupos diferentes varía significativamente (Chaturvedi *et al.*, 2001a; Stahl *et al.*, 2001). La clasificación de muestras de leche particulares en

alguno de los cuatro grupos aquí presentados, es sin embargo, una sobre simplificación de la verdadera complejidad de los OLH. Incluso en la leche de mujeres No secretoras Lewis negativas que no expresan ni FUT2 ni FUT3, se encuentran presentes fucosiloligosacáridos como la 3'FL o LNFP III, sugiriendo la existencia de otras enzimas FUT independientes de los genes *Se* y *Le* que podrían ser las responsables de estas fucosilaciones (Newburg *et al.*, 2005). Además, α 1-2-fucosiloligosacáridos han sido

encontrados en la leche de mujeres no secretoras hacia el final de la lactancia, y se ha sugerido que la enzima FUT1 podría participar también de la fucosilación de OLH (Newburg *et al.*, 2005).

Por otra parte, la adición de Sia puede darse en enlaces α 2-3- o α 2-6-, tanto en la Gal terminal como en una molécula de GlcNac interna. El Sia contiene un grupo carboxilo, lo cual introduce una carga negativa en los OLH, y por lo tanto, los OLH sialilados pueden tener una o más cargas negativas dependiendo de los Sia adicionados a su estructura. La adición de Sia a los OLH está catalizada por varias sialiltransferasas, y a diferencia de los fucosiloligosacáridos, donde alguno de ellos pueden estar ausentes debido a la ausencia de FUT2 o FUT3, no ha sido descrito hasta el momento ningún caso donde haya ausencia total de sialiltransferasas con la correspondiente ausencia de sialiloligosacáridos. En este caso, la variación en los OLH se debe a sutiles diferencias en la expresión de variantes de sialiltransferasas u otras enzimas, y a transportadores importantes en las rutas de adición de Sia.

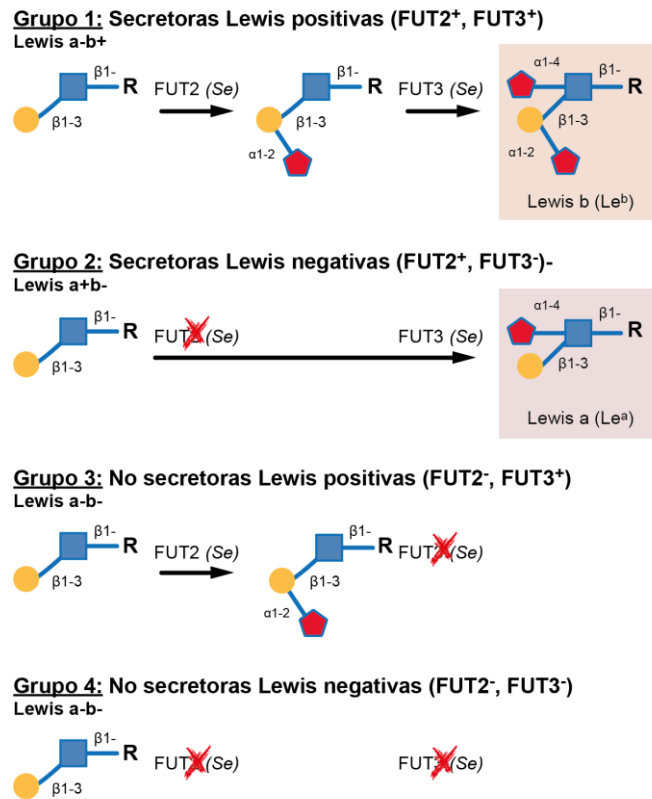


Fig. 1.2. Fucosilación de OLH dependiente de FUT2 y FUT3 (Adaptado de Bode 2012).

Además de los factores genéticos expuestos hasta aquí, es posible que existan otros genes involucrados en la elongación, o ramificación de OLH que estén diferencialmente expresados y que conduzcan a distintos perfiles de composición de OLH. Factores como la edad, la dieta, el estado de salud, el uso de medicamentos y/o factores ambientales podrían también modificar la composición de los OLH (Bode, 2015).

1.1.4. Biosíntesis de OLH.

Hasta el momento existe muy poca información sobre la biosíntesis de los OLH, pero debido a que todos ellos poseen lactosa en su extremo reductor, es probable que los OLH sean sintetizados como una extensión de la biosíntesis de la lactosa, la cual ocurre en el aparato de Golgi (Fig. 1.3). El proceso comienza por la activación de Glc a UDP-Glc en el citosol, que después es convertido a UDP-Gal. Ambos, tanto Glc como UDP-Gal son transportados posteriormente al interior del aparato de Golgi donde son utilizados como sustratos del complejo lactosa sintasa compuesto por dos subunidades, la proteína A con actividad β -1-4 galactosiltransferasa (β 4GalT1), que normalmente transfiere el UDP-Gal a una molécula de GlcNAc durante la síntesis de glicoconjugados, y la proteína B (α -lactoalbúmina) expresada durante la lactancia que es capaz de cambiar la especificidad del aceptor de β 4GalT1 de GlcNAc a Glc, dando como producto la síntesis de lactosa (Ramakrishnan *et al.*, 2002).

A partir de este punto, el proceso de elongación de los OLH está lleno de incógnitas. Como se ha mencionado anteriormente, la cantidad de oligosacáridos y la complejidad de los mismos varía mucho entre distintas especies, por lo tanto es difícil estudiar la regulación y el mecanismo de biosíntesis de los OLH en modelos animales. Por ejemplo, la leche de ratón, donde sería posible construir mutantes en las diferentes glicosiltransferasas para estudiar los mecanismos de biosíntesis, contiene 3'SL y 6'SL, pero carece de los oligosacáridos lineales, ramificados y fucosilados (Fuhrer *et al.*, 2010). Tampoco ha sido exitoso el intento de utilizar líneas celulares epiteliales de glándula mamaria, ya que en ninguno de los casos se ha conseguido ni siquiera la síntesis de lactosa (Bode, 2012).

Se ha propuesto un modelo de elongación y ramificación que utiliza como ejemplo la síntesis de glicoconjugados de poly- N-acetilactosamina, en donde se propone que el núcleo de lactosa es extendido mediante la alternancia de N-acetilglucosaminiltransferasas (GlcNAcT) y galactosiltransferasas (GalT) (Kobata, 2003) (Fig.1.3). La extensión lineal o ramificación comenzarían con la adición de GlcNAc mediante las glicosiltransferasas β 3GlcNAcT (iGnT) y β 6GlcNAcT (IGnT), respectivamente (Fig.1.3). Estas enzimas participan en la adición de GlcNAc en las cadenas de azúcares de glicoconjugados y en la síntesis de OLH estarían utilizando la lactosa como falso aceptor debido a su similitud estructural. La síntesis de OLH de tipo 1 o 2 se produciría con la posterior adición de Gal mediante una β 3GalT o β 4GalT al residuo de GlcNAc (Fig. 1.3).

La fucosilación es el proceso sobre el cual se tiene más conocimiento. Como se mencionó anteriormente en el apartado sobre variación de OLH entre mujeres, las principales enzimas que participan en este proceso son FUT2, que adiciona Fuc en enlaces α 1-2- a la Gal en el extremo no reductor, y FUT3 que adiciona Fuc en enlaces α 1-4- a GlcNAc internas y preferiblemente a oligosacáridos de cadena tipo 1. La expresión de FUT2 y FUT3 depende exclusivamente de los genes *Se* y *Le* (Chaturvedi *et al.*, 2001a; Johnson and Watkins, 1992; Kumazaki and Yoshida, 1984; Stahl *et al.*, 2001), pero debe existir alguna otra enzima FUT (FUTx en la Fig. 1.3) independiente de los genes *Se* y *Le* responsable de la adición de Fuc en enlace α 1-3 a la Glc del extremo reductor o GlcNAc internas en oligosacáridos de cadena tipo 2 (Bode, 2012).

Respecto a la sialilación de OLH, existe un gran desconocimiento. Análisis realizados en ratones mutantes para las sialiltransferasas ST3Gal4 y ST6Gal1 mostraron

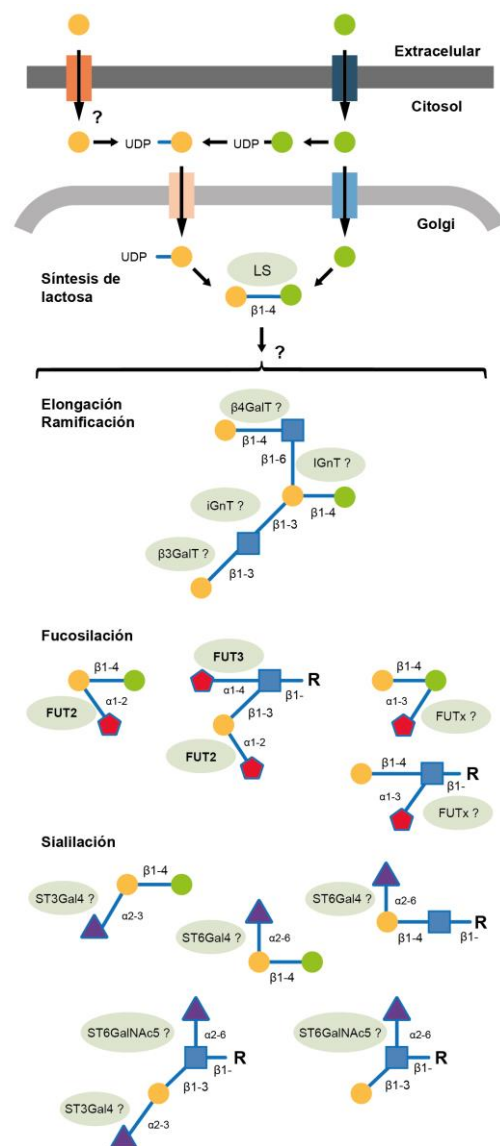


Fig. 1.3. Biosíntesis de OLH (Adaptado de Bode 2012). LS: Lactosa sintasa.

que estas son responsables de la biosíntesis de 3'SL y 6'SL, respectivamente (Fuhrer *et al.*, 2010), pero aún se desconoce si este proceso es similar en humanos (Fig. 1.3). Por otra parte, en humanos han sido identificadas seis sialiltransferasas de GalNAc (ST6GalNAc), pero ninguna de GlcNAc (ST6GlcNAc). En algunas líneas celulares de cáncer de colon se ha visto que la ST6GalNAc5 es capaz de adicionar Sia a una GlcNAc interna mediante un enlace α 2-6 (Tsuchida *et al.*, 2003). Este tipo de estructura está presente en los OLH y en el tejido del sistema nervioso central, por lo tanto una explicación posible es que las ST6GalNAc estarían involucradas en la sialilación de OLH (Fig.1.3).

1.1.5. Metabolismo de OLH.

Los OLH resisten el bajo pH estomacal de los niños amamantados, así como la digestión *in vitro* por enzimas pancreáticas e intestinales (Engfer *et al.*, 2000; Gnoth *et al.*, 2000). Distintos estudios han demostrado que los OLH alcanzan la parte distal del intestino delgado y el colon de forma intacta y son excretados en las heces de los niños (Coppa *et al.*, 2001; Chaturvedi *et al.*, 2001b; Sabharwal *et al.*, 1988a; Sabharwal *et al.*, 1984; Sabharwal *et al.*, 1988b; Sabharwal *et al.*, 1991). Resultados recientes confirmaron las observaciones originales y sugieren que existen distintas etapas durante los primeros meses de lactancia, donde varía el procesamiento y degradación de los OLH consumidos, dependiendo de la edad, grupo sanguíneo y del régimen de alimentación de los infantes (Albrecht *et al.*, 2010, 2011a; Albrecht *et al.*, 2011b). En la primer etapa (hasta los dos meses), los oligosacáridos encontrados en las heces de los niños amamantados son similares a los presentes en la leche materna que consumen. En una segunda etapa, comprendida entre los dos meses y el momento en que se introducen otros alimentos además de la leche materna, las heces contienen principalmente productos de degradación de los OLH, que varían en gran medida de los OLH presentes en las leches correspondientes. Finalmente en la tercera etapa, posterior a la introducción de alimentos, los OLH desaparecen completamente de las heces de los niños.

También se ha demostrado que OLH intactos son excretados en la orina de niños prematuros alimentados con leche materna, pero no así en niños alimentados con leches de fórmula (Rudloff *et al.*, 1996). Estos resultados sugieren que los OLH son absorbidos en el intestino alcanzando así la circulación sistémica. Años más tarde, mediante

experimentos *in vivo* utilizando marcaje con ^{13}C , se demostró que aproximadamente el 1% de los OLH ingeridos alcanzan la circulación sistémica y son excretados intactos en la orina de los infantes (Rudloff *et al.*, 2006; Rudloff *et al.*, 2012; Rudloff *et al.*, 1996), mientras que la mayoría de OLH son metabolizados por la microbiota intestinal o son excretados intactos en las heces del lactante (Albrecht *et al.*, 2010, 2011a).

Dado que los OLH son absorbidos y alcanzan la circulación sistémica, es probable que lleguen a otros órganos además del intestino, incluyendo hígado, cerebro, sistema respiratorio y tracto urinario. Por lo tanto la función biológica de los OLH no debe estar restringida al intestino, sino que podrían tener un efecto pleiotrópico en el neonato.

1.1.6. Efectos beneficiosos de los OLH.

1.1.6.1. Efecto prebiótico

Los prebióticos son definidos como ingredientes que producen una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad(es) de uno o de un limitado número de géneros/especies de microorganismos en la microbiota intestinal confiriendo beneficios para la salud del hospedador (Gibson *et al.*, 2004; Roberfroid, 2007a; Roberfroid *et al.*, 2010). Según esta definición, es necesario que los prebióticos resistan la acidez gástrica, la hidrólisis por enzimas digestivas y la absorción gastrointestinal. Estas condiciones se cumplen para los OLH, que a pesar de presentar un 1% de absorción, llegan intactos y en gran concentración al intestino delgado y colon. Originalmente los OLH fueron descubiertos por su función prebiótica, ya que sirven como sustrato metabólico selectivo de bacterias probióticas (Bode, 2012). Éstas son bacterias viables y no patogénicas que conforman una microbiota saludable y que administradas en cantidad suficiente pueden resultar beneficiosas para el hospedador, en este caso el recién nacido, más allá del efecto puramente nutricional (Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization., 2006). Entre las especies de bifidobacterias encontradas comúnmente en niños alimentados con leche materna se encuentran, *Bifidobacterium longum* subespecie *longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum* subespecie *infantis* y *Bifidobacterium breve*. Las dos últimas son capaces de consumir tanto oligosacáridos de cadena tipo 1 como de cadena tipo 2 (Asakuma *et al.*, 2011; LoCascio *et al.*, 2007; Marcobal *et al.*, 2010), mientras que las otras dos especies, *B. longum* subespecie

longum y *B. bifidum*, solo consumen lacto-N-tetraosa (LNT) pero no lacto-N-neotetraosa (LNnT). La secuenciación del genoma de *B. infantis* mostró que posee un cluster de genes que controla la expresión de glicosidasas específicas, transportadores de azúcares y proteínas de unión a glicanos, implicados en la utilización de OLH (Sela *et al.*, 2008). La cepa *B. infantis* JCM1222 también fue capaz de utilizar los oligosacáridos LNT y LNnT mono y di fucosilados, y los disacáridos y monosacáridos producto de degradación de los OLH (Asakuma *et al.*, 2011).

A diferencia de *B. infantis* que expresa glicosidasas intracelulares (Garrido *et al.*, 2012; Sela, 2011; Sela *et al.*, 2012) y depende de sus transportadores ABC para la internalización correspondiente, *B. bifidum* expresa glicosidasas extracelulares. Éstas liberan componentes de los OLH que pueden ser transportados y consumidos por *B. bifidum* o por otras bacterias, contribuyendo así a determinar la microbiota intestinal.

La mayor parte de la información obtenida sobre el efecto prebiótico de los OLH proviene de estudios de fermentación *in vitro* (Asakuma *et al.*, 2011; LoCascio *et al.*, 2007; Marcobal *et al.*, 2010), aunque también hay un estudio en ratones “germ-free” que demostró que la LNnT otorga una ventaja significativa al crecimiento de *B. infantis* sobre *Bacteroides thetaiotaomicron* (Marcobal *et al.*, 2011). Los ratones fueron co-inoculados con ambas especies, la abundancia relativa de *B. infantis* fue solo del 2%, mientras que este valor se incrementó al 40% después de introducir LNnT en el agua disponible para los ratones. Estos resultados coinciden con el hecho de que *in vitro* *B. infantis* utiliza LNnT mientras que *B. thetaiotaomicron* no lo metaboliza (Marcobal *et al.*, 2011).

El aumento y prevalencia de bacterias probióticas en el tracto gastrointestinal de los niños mediada por los OLH, podría evitar el establecimiento de bacterias potencialmente patógenas, ya que se encuentran compitiendo por una cantidad de recursos limitados (Fig. 1.4A). Además, determinadas cepas probióticas producen ácidos grasos de cadena corta y otros metabolitos que contribuyen a crear un ambiente favorable al crecimiento de comensales sobre patógenos potenciales (Gibson and Wang, 1994).

1.1.6.2. Efecto antiadhesina

En la actualidad las evidencias científicas sugieren que los OLH, además de contribuir indirectamente a evitar el establecimiento de patógenos intestinales debido al

efecto prebiótico, el cual otorga una ventaja competitiva a bacterias probióticas, también son capaces de disminuir directamente las infecciones microbianas debido a su capacidad de actuar como antiadhesinas microbianas (Kunz *et al.*, 2000; Newburg *et al.*, 2005). Muchos patógenos intestinales, ya sean virales, bacterianos o protozoos, necesitan adherirse a las superficies mucosas para colonizar o invadir al hospedador. A menudo, la adhesión de estos patógenos está mediada por interacciones lectinas-glicanos, por ejemplo *Escherichia coli* con fimbrias del tipo 1 se une a glicanos que contienen manosa, mientras que *E. coli* con fimbrias del tipo S y *Helicobacter pylori* se unen a glicanos que contienen Sia (Firon *et al.*, 1983; Parkkinen *et al.*, 1983). Del mismo modo, han sido descritos mecanismos de adhesión mediados por glicanos tanto en norovirus como en rotavirus (Hu *et al.*, 2012), los principales causantes de diarreas severas infantiles y responsables de la muerte de medio millón de niños al año (Tate *et al.*, 2012).

Los OLH poseen una similitud estructural con los receptores que utilizan los patógenos para adherirse al epitelio gastrointestinal, por lo tanto compiten con ellos e inhiben, la adhesión de estos patógenos a las mucosas (Fig. 1.4B), disminuyendo así el riesgo de infección (Gustafsson *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 1997). Así por ejemplo la 3'sialil lactosa (3'SL) inhibe la adhesión de *H. pylori* a células epiteliales en cultivos *in vitro* y reduce la colonización por esta bacteria en monos rhesus (Mysore *et al.*, 1999).

El efecto antiadhesina de los OLH se ha descrito ampliamente en *Campylobacter jejuni*, esta bacteria se une a cultivos celulares de epitelio vía antígenos H del tipo 2, formados por glicanos fucosilados con enlaces α 1-2- (Ruiz-Palacios *et al.*, 2003). La adición de OLH α 1-2-fucosilados bloquea la unión de *C. jejuni* tanto en cultivos celulares como en explantes de mucosa humana, y reduce la colonización de esta bacteria en ratones. El efecto beneficioso de los OLH α 1-2-fucosilados en la reducción de episodios diarreicos asociados a *C. jejuni* fue confirmado en un estudio con casi 100 pares de madre-niño de un barrio de Ciudad de Mexico (Morrow *et al.*, 2004). La diarrea asociada a esta bacteria fue significativamente menor en los niños cuyas madres presentan altas concentraciones de 2'FL en su leche. Del mismo modo, diarreas producidas por calicivirus ocurren con menos frecuencia en niños cuyas madres presentan altas concentraciones de lacto-N-difucohexaosa I, otro OLH α 1-2-fucosilado, en su leche. También se ha demostrado la capacidad de OLH α 1-2-fucosilados de inhibir la adherencia de *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium a células Caco-2 (Chessa *et al.*, 2009).

Este efecto antiadhesina no está limitado a microorganismos. Los OLH también son capaces de unirse a toxinas producidas por microorganismos patógenos. Este es el caso de las toxinas A y B de *Clostridium difficile*, una bacteria anaerobia estricta, gram positiva y esporulante, responsable de una variedad de enfermedades gastrointestinales mediadas por toxinas, que pueden ir desde una diarrea asociada a antibióticos hasta una colitis pseudomembranosa (Bartlett, 2008; Kelly and LaMont, 1998). *C. difficile* produce 6 toxinas diferentes, sin embargo, las dos principales son las toxinas A y B. Estas toxinas poseen dominios de interacción con sus glicanos receptores, y al ser ensayados contra un panel de 21 OLH diferentes, se encontró que el dominio de la toxina A unía 8 de ellos, y el de la B unía 11, siendo 5 de ellos comunes a las dos toxinas. Es interesante remarcar que la mayoría de estos oligosacáridos se unen a las toxinas con una mayor afinidad que la del único receptor natural conocido hasta la fecha (El-Hawiet *et al.*, 2011).

Algunos microorganismos, en lugar de expresar lectinas que se unen a glicanos del hospedador, expresan glicanos que se unen a lectinas del hospedador. Este es el caso de la glicoproteína de envoltura gp120, la cual facilita la unión del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) a células dendríticas (CD) específicas que se encuentran en las superficies mucosas (Su *et al.*, 2003; van Kooyk and Geijtenbeek, 2003; Wu and KewalRamani, 2006). La interacción entre gp120 y las CD es importante para que el HIV entre a través de las barreras mucosas durante la transmisión madre-hijo del HIV. Las CD se unen a los glicanos ricos en manosa de la gp120 (Doores *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2000), pero tienen más afinidad por los antígenos sanguíneos Lewis (Naarding *et al.*, 2005; van Liempt *et al.*, 2006). Los OLH tienen en su estructura estos antígenos, y se ha visto en estudios *in vitro* que compiten con la gp120 en la unión de las CD (Hong *et al.*, 2009). En la superficie de mucosas de niños alimentados con leche materna, hay presentes altas concentraciones de OLH, los cuales podrían bloquear la entrada del HIV vía las CD, esto explicaría porque la transmisión madre-hijo en niños alimentados con leche materna es ineficiente, dando como resultado un 80%-90% de niños no infectados a pesar de la continua exposición al virus en la leche (Bode, 2012; Coutsoudis *et al.*, 2004).

La actividad antiadhesina también puede aplicarse a algunos parásitos protozoarios como *Entamoeba histolytica*, causante de disentería amebiana o absceso amebiano de hígado (Pritt and Clark, 2008). Este protozoo causa más de 100.000 muertes anuales y es la tercera causa de muerte por enfermedades parasitarias tras la

malaria y la esquistosomiasis. La invasión de este protozoo requiere de la adhesión a la mucosa colónica del hospedador, para ello utiliza uno de sus principales factores de virulencia, la lectina Gal/GalNAc (Cano-Mancera and Lopez-Revilla, 1987; Saffer and Petri, 1991a, b), y si esto no ocurre, el parásito es excretado en las heces sin causar enfermedad. Estudios *in vitro* de co-cultivo de líneas celulares de epitelio intestinal y *E. histolytica* con OLH, han demostrado que algunos OLH reducen significativamente la adhesión y la citotoxicidad de este protozoo (Jantscher-Krenn *et al.*, 2012a). Al contrario de lo que ocurre en *C. jejuni*, los OLH α 1-2-fucosilados no tienen ningún efecto en la adhesión o citotoxicidad de *E. histolytica*, sugiriendo que los OLH importantes en este efecto serían los no fucosilados. Al contrario de lo que ocurre con azúcares como la lactosa o la galactosa por los que tiene alta afinidad la lectina Gal/GalNAc (Cano-Mancera and Lopez-Revilla, 1987; Ravdin and Guerrant, 1981), los OLH son capaces de llegar intactos al colon, sitio donde se produce la infección. Esto explicaría porque los niños alimentados con leche materna poseen menor riesgo de infección por *E. histolytica* que los niños alimentados con leche de fórmula (Islam *et al.*, 1988).

El efecto antiadhesina antimicrobiano puede no estar limitado a infecciones del tracto intestinal. La leche materna suele cubrir la superficie mucosa nasofaríngea e incluso puede alcanzar el sistema respiratorio superior debido a las aspiraciones. Los niños alimentados con leche materna son menos propensos a desarrollar otitis causada por *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Haemophilus influenzae*, y también tienen menos riesgo de infectarse con el virus sincitial respiratorio (RSV) (Abrahams and Labbok, 2011; Downham *et al.*, 1976). Todos estos patógenos utilizan lectinas para interactuar con glicanos e iniciar la infección, y los OLH han demostrado *in vitro* la capacidad de inhibir su adhesión (Andersson *et al.*, 1986; Devaraj *et al.*, 1994; Lesman-Movshovich *et al.*, 2003; Malhotra *et al.*, 2003). Del mismo modo, una fracción de los OLH son absorbidos y excretados en la orina, y son capaces de reducir la hemaglutinación uropatogénica inducida por *E. coli* (Martin-Sosa *et al.*, 2002), sugiriendo que también tienen un efecto sobre infecciones del tracto urinario.

1.1.6.3. Efecto antimicrobiano

Además del efecto prebiótico y del efecto antiadhesina frente a patógenos intestinales, recientemente se ha visto que los OLH poseen también la capacidad de

actuar directamente sobre algunos microorganismos como agentes antimicrobianos. *Streptococcus agalacticae* (*Streptococcus* del grupo B; GBS) es uno de los principales patógenos neonatales y afecta a 1 de cada 2000 niños en Estados Unidos. Aproximadamente un 15-40% de las mujeres embarazadas están colonizadas por GBS en el tracto gastrointestinal o genital (Anthony *et al.*, 1981; Campbell *et al.*, 2000), más de la mitad de esos embarazos derivan en abortos involuntarios, y entre el 16-53% de las madres colonizadas podrían transmitir la bacteria a sus bebés durante el parto (Phares *et al.*, 2008). Los bebés infectados pueden desarrollar sepsis, neumonía y meningitis. Se ha visto que GBS no es capaz de proliferar en presencia de un grupo específico de OLH no sialilados (Bode, 2015). A través del uso de librerías de transposones de GBS se identificó una cepa mutante inmune al efecto bacteriostático de los OLH. Esta cepa carece de una glicosiltransferasa, la cual según estudios *in vitro* incorpora OLH específicos a la membrana celular, deteniendo la proliferación de la bacteria de forma similar a algunos de los antibióticos comerciales (Bode, 2015).

Otro caso descrito para este tipo de efecto es frente al patógeno fúngico *Candida albicans*. Esta levadura coloniza el intestino de niños recién nacidos, es la principal causante de enfermedades invasivas fúngicas en niños prematuros, y está asociada a enfermedades como la enterocolitis necrotizante (NEC) y perforación intestinal (Coates *et al.*, 2005; Ragouilliaux *et al.*, 2007). El tratamiento con OLH reduce significativamente y en forma dosis dependiente, la invasión por *C. albicans* de células epiteliales de intestino de niños prematuros (pIECs) (Gonia *et al.*, 2015). Nuevamente en este caso el efecto no se relaciona con una inhibición directa en la interacción patógeno-hospedador, sino que el efecto producido es la alteración de la morfogénesis y un retraso en el desarrollo de las hifas, el cual deriva en una mayor dificultad del patógeno de adherirse e invadir al hospedador.

Estos efectos abrirían las puertas al desarrollo de nuevas moléculas antimicrobianas basadas en compuestos naturales como los OLH para hacer frente a la creciente resistencia a antibióticos, tanto de patógenos obligados como de patógenos oportunistas.

1.1.6.4. Efecto modulador de la respuesta celular del epitelio intestinal

La presencia de 3'sialil-lactosa en cultivos de células de epitelio intestinal reprime la expresión de los genes que codifican para las sialiltransferasas ST3Gal1, ST3Gal2 y ST3Gal4, lo cual disminuye la α 2-3- y la α 2-6- sialidación de los glicanos de la superficie celular (Angeloni *et al.*, 2005). Como consecuencia de este proceso, algunas cepas enteropatógenas de *E. coli* reducen significativamente su unión al epitelio intestinal, ya que utilizan sialilglicanos de la superficie celular para adherirse al epitelio intestinal del hospedador (Fig. 1.4C). Aunque aún es necesario analizar si esto ocurre *in vivo* y si puede traducirse en algún tipo de tratamiento para contribuir a detener infecciones en neonatos, fue la primera prueba de que los OLH son capaces de afectar directamente el epitelio celular intestinal, induciendo un cambio en la expresión génica y modulando una respuesta celular.

Otros estudios han demostrado que los OLH son capaces de modular el crecimiento celular e inducir diferenciación y apoptosis en cultivos de líneas celulares de epitelio intestinal humanas, alterando la expresión de genes relacionados con el ciclo celular (Kuntz *et al.*, 2009; Kuntz *et al.*, 2008). Se ha sugerido que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la señalización via Raf/Raf/ERK podrían estar involucrados en esos procesos (Kuntz *et al.*, 2009), pero se desconoce todavía como se produce la interacción entre los OLH y estos componentes de vías de señalización celular.

1.1.6.5. Efecto inmunomodulador

Los OLH generan cambios en la microbiota intestinal y en la respuesta celular del epitelio intestinal, lo cual puede afectar de forma indirecta el sistema inmune de los recién nacidos, además, estudios *in vitro* sugieren que también modulan directamente el sistema inmune. Los OLH podrían actuar tanto de forma local en células linfoides asociadas a mucosas o a nivel sistémico debido al 1% que es absorbido y alcanza la circulación sistémica (Gnoth *et al.*, 2001; Rudloff *et al.*, 2006; Rudloff *et al.*, 2012). El tratamiento de linfocitos T extraídos de cordón umbilical con OLH sialilados resultó en un aumento en el número de linfocitos CD4+/CD3+ y CD3+/CD8+ productores de interferón- γ , y linfocitos CD3+/CD8+ productores de IL-13, (Eiwegger *et al.*, 2004). Se

ha sugerido que estos OLH influyen en la maduración de los linfocitos promoviendo un cambio de respuesta T hacia una proporción Th1/Th2 más equilibrada (Fig. 1.4D). Por otra parte, se ha observado que OLH sialilados reducen la producción de IL-4 en un subconjunto de linfocitos de pacientes con alergia al cacahuete, lo que llevó a la conclusión de que ciertos OLH contribuyen a la prevención de alergias (Eiwegger *et al.*, 2010). Igualmente, en un estudio reciente en el cual se utilizó una combinación de oligosacáridos (estructuralmente similares a los de la leche humana) y probióticos, tanto en un modelo murino de alergia a leche de vaca, como en el tratamiento de niños con dermatitis atópica, se demostró la capacidad de ese suplemento de aumentar los niveles de galectina 9, lo cual fue asociado con la prevención de los síntomas de alergias (de Kivit *et al.*, 2012).

La función inmunomoduladora de los OLH fucosilados se centra en la lacto-N-fucopentosa III (LNFP III), la cual ha mostrado funciones inmunosupresivas activando la secreción de citoquinas anti inflamatorias e inhibiendo la proliferación de linfocitos T CD4⁺ naive (Terrazas *et al.*, 2001). Además, la LNFP III estimula la actividad de macrófagos *in vitro* de forma múltiple, incrementando la secreción de prostaglandina E2, IL-10 y TNF α , y confiriendo la capacidad de activar células natural killer (NK) (Atochina and Harn, 2005). Para los OLH que contienen antígenos Lewis también se ha demostrado un efecto en la reducción de las interacciones célula-célula mediadas por selectinas (Bode *et al.*, 2004a; Bode *et al.*, 2004b).

Por otra parte, los OLH sialilados también son capaces de reducir el “rolling” y la adhesión de leucocitos de forma dosis dependiente (Fig. 1.4E). La 3'SL y 3'sialil-3'fucosillactosa fueron identificadas como los compuestos clave y se sugiere que contribuyen a un menor número de enfermedades inflamatorias en niños alimentados con leche materna (Bode *et al.*, 2004a). Del mismo modo, OLH sialilados reducen la formación de complejos neutrófilo-plaqueta (PNC) y la activación de neutrófilos en un modelo *ex vivo* con sangre humana (Bode *et al.*, 2004b). El conjunto de estos datos nos indicaría que estos OLH sialilados podrían estar interaccionando con selectinas, una familia de lectinas involucradas en estos procesos.

A pesar de que toda esta evidencia sugiere que los OLH poseen un rol inmunomodulador en el desarrollo del sistema inmune de los neonatos, hasta el momento se han hecho pocos análisis sobre los efectos de los OLH sobre células del sistema inmune aisladas de neonatos. En este sentido, se ha analizado el efecto *ex vivo* del tratamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de

neonatos de cerdo, con distintos OLH particulares, con mezclas definidas de OLH y con mezclas complejas purificadas de leche humana (Comstock *et al.*, 2014). Los resultados mostraron que las PBMC estimuladas con mezclas complejas purificadas de leche humana producían más IL10 que células sin estimular, y que PBMC estimuladas con fucosiloligosacáridos proliferaban menos que células sin estimular. En el mismo estudio también se analizó si había cambios en el fenotipo de linfocitos T, al co-estimular las PBMC con los OLH y con fitohemaglutinina (PHA) o lipopolisacárido (LPS). Las PBMC co-estimuladas con PHA y mezclas complejas purificadas de leche humana proliferaron más que las células estimuladas únicamente con PHA. Del mismo modo, las PBMC co-estimuladas con LPS y sialiloligosacáridos proliferaron más y presentaron menos linfocitos T CD4+. Esta reducción en la población de linfocitos T “helper” indica un cambio en el balance de la respuesta T hacia funciones efectoras, y junto con el aumento en la proliferación sugiere una mejor inmunocompetencia (Comstock *et al.*, 2014).

Al igual que en el caso de la modulación de la respuesta celular del epitelio intestinal, actualmente se desconoce que receptores o que vías de señalización participan en la transducción de la señal mediada por los OLH, tanto en la producción de citoquinas por los linfocitos como en la estimulación de los macrófagos. Muchas lectinas participan en las respuestas del sistema inmune y la especificidad de unión a glicanos sugiere que los OLH podrían interferir en este proceso. Por ejemplo, las “siglecs” (lectinas del tipo Ig que unen Sia), son receptores de la superficie celular, miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas que reconocen Sia. Estas lectinas participan en el sistema inmune de diversas formas y se ha demostrado que unen OLH sialilados (Crocker *et al.*, 2007). Por otra parte, las galectinas son lectinas que unen β -galactosidos y que modulan la respuesta inmune (Rabinovich *et al.*, 2002). Los OLH son β -galactosidos que generalmente poseen galactosa unida por enlaces β 1-3- y β 1-4- en su extremo no reductor, y por lo tanto podrían participar en vías de señalización mediadas por galectinas.

1.1.6.6. Efecto protector frente a la enterocolitis necrotizante

Otro efecto beneficioso asociado a los OLH es la protección natural frente a la enterocolitis necrotizante. Esta enfermedad es la principal causa de muerte en niños prematuros (Holman *et al.*, 1997; Neu and Walker, 2011; Uauy *et al.*, 1991), y además desarrollan esta enfermedad entre un 5% y un 10% de los niños nacidos con un peso inferior a 1,5 Kg (Holman *et al.*, 2006). Se ha observado que los bebés alimentados con leche materna tienen un riesgo entre 6 y 10 veces menor de desarrollar esta enfermedad, en comparación con los bebés alimentados con fórmula (Lucas and Cole, 1990; Schanler *et al.*, 2005; Sisk *et al.*, 2007). Esto ha llevado a formular la hipótesis de que los OLH contribuyen a los efectos protectores de la lactancia materna frente a la enterocolitis necrotizante. En virtud de la escasa disponibilidad de OLH, la comprobación de esta teoría *in vivo* en un modelo humano es difícil, aunque la utilización de OLH en un modelo murino confirma esa hipótesis (Jantscher-Krenn *et al.*, 2012b; Lucas and Cole, 1990). En este último trabajo fue identificado un único OLH, la disialil-lacto-N-tetraosa (DSLNT), responsable del efecto protector, lo cual sugiere una alta especificidad de estructura mediada por algún receptor del hospedador.

1.1.6.7. Efecto sobre el desarrollo cerebral

Los niños alimentados con leche materna tienen marcadores de desarrollo superiores a los 18 meses de vida, y un IQ más alto a los 7 años de edad, que aquellos alimentados con leche de fórmula (Lucas and Cole, 1990; Lucas *et al.*, 1990) (Fig. 1.4F). La evidencia sugiere que el desarrollo cerebral y cognitivo depende en parte de gangliosidos que contienen Sia y glicoproteínas con poly-Sia (Wang, 2009). Las concentraciones de Sia en el cerebro aumentan a más del doble entre algunos meses previos y algunos años después del nacimiento (Svennerholm *et al.*, 1989). Estudios hechos en animales sugieren que el Sia aportado en la dieta es un nutriente esencial debido a la gran demanda provocada por el desarrollo cerebral que existe durante la etapa pre y postnatal (Carlson and House, 1986; Wang *et al.*, 2007a). Por ejemplo, se ha observado un aumento en el aprendizaje y la memoria en cochinitos al suplementar la leche que consumen con glico-macropéptidos de caseína sialilados (Wang *et al.*, 2007a). La leche humana es una fuente rica en Sia (Wang *et al.*, 2001), y análisis post mortem

de neonatos humanos han mostrado que existen concentraciones más altas de gangliosidos y proteínas sialiladas en los cerebros de niños alimentados con leche materna, comparado con niños alimentados con leche de fórmula, la cual contiene menos cantidad de Sia que la leche materna humana (Wang *et al.* 2001).

Los OLH sialilados representan la mayor parte del Sia presente en la leche materna humana. La cantidad de Sia aportado por los OLH es de 2 a 3 veces mayor que el aportado por glicoproteínas, mientras que el Sia aportado por los glicolípidos solo representa el 1% del total aportado por la leche humana (Wang *et al.* 2001).

1.1.6.8. Efectos sobre la madre

Además de los beneficios potenciales enumerados para los OLH relacionados con el lactante, se ha sugerido también que los OLH podrían tener un efecto sobre la madre del lactante, y los mecanismos serían similares. La leche humana no es estéril, posee comunidades bacterianas complejas y particulares a cada madre (Hunt *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2007). Estas bacterias pueden considerarse como los probióticos naturales utilizados para inocular la microbiota intestinal del lactante, pero también pueden considerarse como potenciales comensales que modulen la composición de la leche o a patógenos causantes de mastitis. Los OLH pueden influir en las comunidades bacterianas tanto de la leche como de la glándula mamaria ya sea con su efecto prebiótico, antiadhesina, antimicrobiano, o directamente modulando la respuesta celular del epitelio de la glándula mamaria o la respuesta inmune local, de forma similar a lo que ocurre en el neonato. Por ejemplo, uno de los microorganismos principales causantes de mastitis, definida como la inflamación de la mama asociada a enrojecimiento, lactancia dolorosa y en ocasiones fiebre, son bacterias del género *Staphylococcus* (Barbosa-Cesnik *et al.*, 2003; Delgado *et al.*, 2009). Algunas cepas de este género se unen a 2'FL en un ensayo basado en un biosensor (Lane *et al.*, 2011), pero aún se desconoce cómo la 2'FL u otro OLH interactúa con cepas de *Staphylococcus* reduciendo o incrementando el riesgo de mastitis.

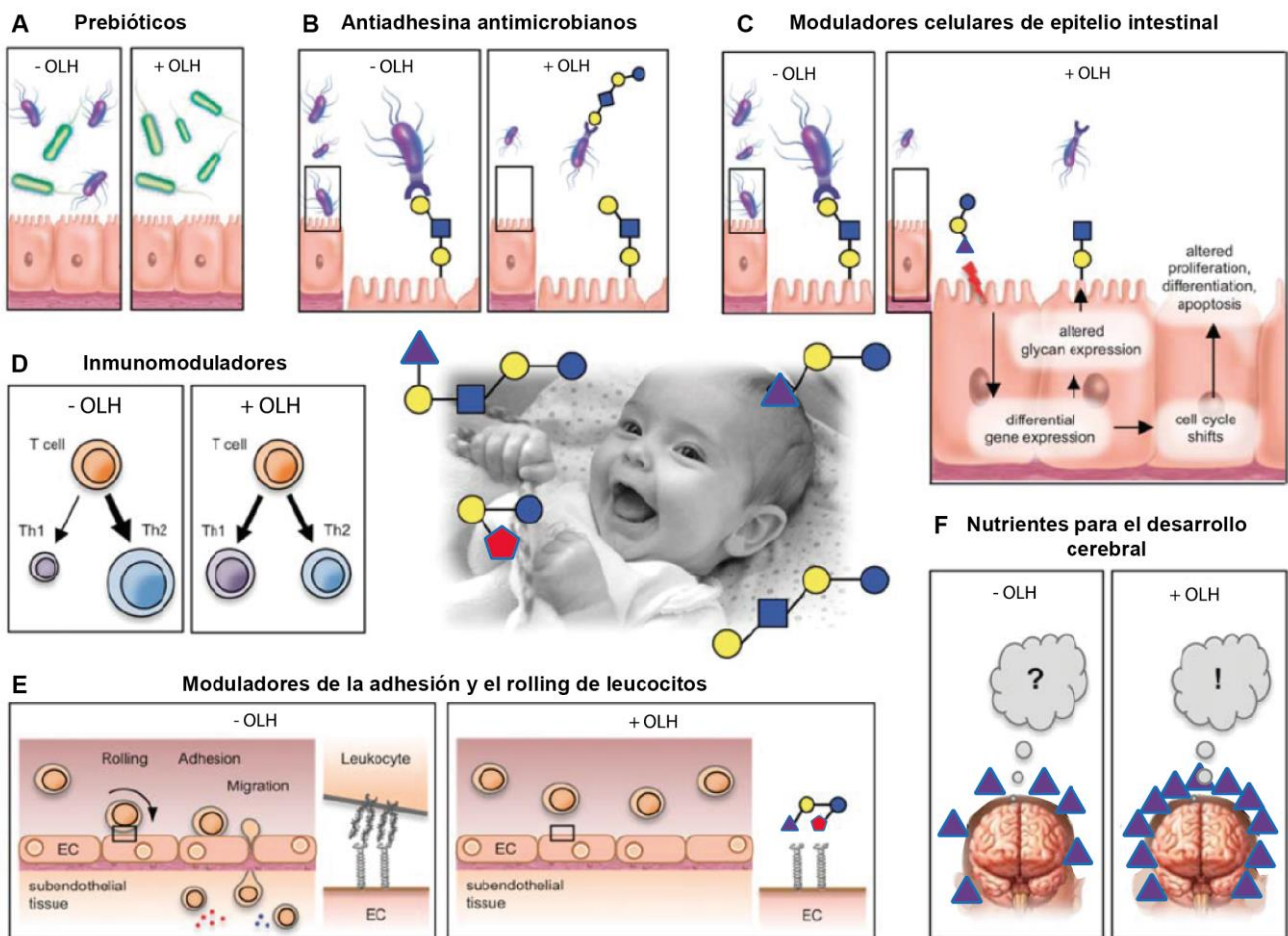


Fig. 1.4. Efectos benéficos de los OLH: A) Efecto prebiótico. B) Efecto antiadhesina. C) Modulación de la respuesta celular de epitelio intestinal. D) Efecto inmunomodulador. E) Reducción de las interacciones célula-célula mediadas por selectinas y reducción del “rolling” de leucocitos en células endoteliales. F) Aporte de nutrientes esenciales para el desarrollo cerebral y cognitivo (Adaptado de Bode 2012).

1.1.7. Oligosacáridos en leches de otros mamíferos y leches de fórmula.

La leche de animales de granja como la vaca, cabra, oveja y cerdo, contiene oligosacáridos pero éstos se encuentran en concentraciones entre 100 y 1000 veces menores, y son estructuralmente menos complejos que los presentes en la leche humana. Aquella leche no contiene oligosacáridos del tipo 1, que son los más abundantes en la leche humana, y muy pocos oligosacáridos se encuentran fucosilados, alrededor del 1%, en comparación al 50-80% de fucosilación en los OLH (Nakajima *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 1984; Saito *et al.*, 1981; Tao *et al.*, 2010; Urashima *et al.*, 1991). Dado que las fórmulas infantiles se basan en leche bovina, la cantidad, proporción y tipo de oligosacáridos es muy diferente a la de la leche humana. Como alternativa para intentar simular los múltiples beneficios de los OLH, las leches de fórmula se suplementan con galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS).

Los GOS son oligómeros de galactosa con un alto grado de polimerización, entre 3 y 10 unidades, y son sintetizados a partir de lactosa mediante una transglucosidación enzimática utilizando β -galactosidasas aisladas de levaduras o bacterias (Fransen *et al.*, 1998). Dependiendo del origen de la enzima, los GOS contienen enlaces β 1-4 y β 1-6, y también β 1-2 o β 1-3, dando como resultado una variedad diferente de isómeros estructurales (Coulier *et al.*, 2009).

Los FOS son oligómeros de fructosa mayormente con enlace β 2-1, y generalmente se obtienen de plantas de la familia Asteraceae como la achicoria (Roberfroid, 2005, 2007b). El grado de polimerización varía entre 2 y 60, y generalmente contienen glucosa en el extremo reductor. Los FOS se producen a partir de inulina utilizando una endoinulinasa que corta los polímeros en oligómeros más pequeños, con o sin glucosa en el extremo reductor (Cho *et al.*, 2001; Park and Yun, 2001). También pueden ser sintetizados mediante transfructosilación utilizando β -fructosidasas de levaduras o bacterias y sacarosa como sustrato (Lafraya *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2011). Estos FOS sintéticos generalmente poseen glucosa en el extremo reductor y su grado de polimerización es menor a 5.

Es importante remarcar que FOS y GOS no se encuentran de forma natural en la leche humana, de hecho, el monómero fructosa ni siquiera está presente en la leche humana. Por otro lado, ninguno de los dos, ni FOS ni GOS se encuentran fucosilados o sialilados. A pesar de las diferencias estructurales con los OLH, el consumo de FOS y

GOS también influencia la composición de la microbiota gastrointestinal de los niños y otorga beneficios ampliamente estudiados (Boehm and Moro, 2008; Macfarlane *et al.*, 2008; Rijnierse *et al.*, 2011; Seifert and Watzl, 2007).

Una mezcla definida de GOS y FOS reduce la incidencia de dermatitis atópica durante los primeros seis meses de vida (Moro *et al.*, 2006), y manifestaciones alérgicas e infecciones durante los primeros dos años de vida (Arslanoglu *et al.*, 2008). Los efectos a largo plazo ya sean beneficiosos o perjudiciales, de alimentar a los niños con cantidades significativas de estos oligosacáridos que no se encuentran de forma natural en la leche humana, aún deben ser investigados.

1.1.8. Producción de OLH

Para confirmar las evidencias descritas de los beneficios de los OLH es necesario disponer de una cantidad adecuada de OLH específicos. La fuente natural para obtenerlos sería la purificación a partir de la leche humana, pero esto no es posible a gran escala, por lo tanto, es necesario el desarrollo de procesos que permitan sintetizar OLH. Los avances en la síntesis química y enzimática de carbohidratos, ha permitido recientemente la producción de algunos OLH en cantidades suficientes como para impulsar ensayos preclínicos, y eventualmente conseguir realizar el primer ensayo clínico (Bode 2012).

1.1.8.1. Síntesis química de OLH

La primera alternativa para sintetizar OLH fue la síntesis química. A través de este tipo de procesos se ha logrado producir más de 15 OLH de hasta 11 monosacáridos, entre los cuales se encuentran la 2'FL, 3'FL, LDFT (Fernandez-Mayoralas, 1986), LNT (Aly *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 2012; Takamura, 1980), LNnT (Aly *et al.* 1999; Hsu *et al.* 2012; Takamura *et al.*, 1980; (Aly, 2000), LNFP I (Hsu *et al.* 2012; Takamura *et al.*, 1980; Aly *et al.* 2000; (Manzoni, 1998), LNFP II (Manzoni *et al.* 1998; (Lay, 1998; Love and Seeberger, 2005; Zhang, 1999), LNnH (Takamura *et al.* 1981), DF-LNH II y DF-LNnH (Kim *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006). Los principales problemas de este tipo de síntesis es que para lograr el tipo de enlace deseado es necesario realizar múltiples pasos de protección y desprotección, y posteriormente para la purificación de los compuestos

es necesario múltiples pasos cromatográficos. Estos múltiples pasos reducen el rendimiento y la productividad, resultando en un proceso largo, tedioso, y caro.

El desarrollo de procesos automáticos en fase sólida para la síntesis de oligosacáridos ha mejorado la eficiencia y sobre todo la velocidad de síntesis (Plante *et al.*, 2001). Por ejemplo, la síntesis de oligosacáridos complejos como los antígenos Lewis X-Lewis Y, que normalmente requerían más de un año utilizando fase líquida, ahora puede completarse en un día mediante procesos en fase sólida automatizados (Routenberg Love and Seeberger, 2004; Seeberger and Werz, 2005).

Sin embargo, a pesar de las mejoras en los métodos químicos, aun no es posible trasladarlos a una escala industrial debido a los bajos rendimientos y al uso de múltiples agentes químicos tóxicos no aptos para el uso en la industria alimentaria.

1.1.8.2. Síntesis enzimática de OLH

1.1.8.2.1. Glicosiltransferasas

La segunda alternativa ha sido la síntesis enzimática. Con estos métodos se han logrado sintetizar varios OLH, principalmente aquellos de estructura simple (Han *et al.*, 2012). Dentro de la síntesis enzimática podemos encontrar diferentes alternativas. La primera es la utilización de glicosiltransferasas que llevan a cabo la biosíntesis de OLH. Se han caracterizado numerosas glicosiltransferasas de mamíferos y se han purificado también glicosiltransferasas de la leche humana, sin embargo la aplicación de estas enzimas en una escala comercial está limitada por la dificultad de obtenerlas en grandes cantidades a un coste bajo. Una opción que permite evitar este problema es la utilización de glicosiltransferasas bacterianas. Estas enzimas son utilizadas por las bacterias para la síntesis de distintos lipopolisacáridos o polisacáridos, algunos de los cuales poseen una estructura similar a la de los OLH (Monteiro *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1995). La gran distribución de este último tipo de glicosiltransferasas y la capacidad de generar enzimas recombinantes ha hecho que éstas sean cada vez más utilizadas para sintetizar OLH en procesos enzimáticos, quimio enzimáticos e incluso en sistemas vivos de células enteras (Chen *et al.*, 2000; Chen and Varki, 2010).

A lo largo del tiempo la síntesis con glicosiltransferasas ha ido mejorando progresivamente. Los primeros métodos enzimáticos con este tipo de enzimas necesitaban de sustratos caros como los azúcares nucleótidos, más tarde se han

desarrollado las reacciones con ciclos de regeneración *in situ* de los sustratos donadores (Ichikawa *et al.*, 1992; Tsai *et al.*, 2013). Actualmente se utilizan también sistemas multi enzima (OPME), en éstas se utiliza una única mezcla de enzimas para lograr la elongación de un oligosacárido a partir de monosacáridos, éstos son transformados en azúcares nucleótidos, los cuales son transferidos por una glicosiltransferasa al acceptor correspondiente, con o sin la formación de azúcares fosfato intermediarios (Yu *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2014). Distintos sistemas OPME pueden usarse de forma secuencial para añadir distintos monosacáridos y producir oligosacáridos más complejos. Estos procesos tienen una mayor eficiencia, pero al utilizarse distintas enzimas simultáneamente, las reacciones enzimáticas son difíciles de controlar. Por otra parte, la mayoría de las glicosiltransferasas bacterianas son aisladas de microorganismos patógenos, lo cual sigue siendo un problema para la industria alimentaria. La caracterización de nuevas glicosiltransferasas y nuevas enzimas mutantes con buenos niveles de expresión en *E. coli*, buena solubilidad, estabilidad y actividad es clave para continuar mejorando este tipo de reacciones. En los últimos años se ha logrado un gran progreso identificando glicosiltransferasas mutantes con propiedades mejoradas, esto ha sido producto del diseño racional de mutantes basado en la estructura de las enzimas, y de la evolución directa acoplada a métodos de “high throughput screening” (Yu *et al.* 2012, 2014).

1.1.8.2.2. Glicosidasas

Otra alternativa dentro de la síntesis enzimática de OLH es el uso de glicosilhidrolasas (glicosidasas). Mediante la utilización de estas enzimas se ha conseguido sintetizar algunos di o trisacáridos como la N-acetilactosamina (Bridiau and Maugard, 2011), fucosil- α -1,3-N-acetilglucosamina, fucosil- α -1,6-N-acetilglucosamina (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2013), 3'SL (Michalak, 2014) y galactosil sucralosa (Lu *et al.*, 2012). La utilización de glicosidasas presenta algunos inconvenientes, pero también algunas ventajas respecto a las glicosiltransferasas. Así, las primeras tienen poca regioselectividad, resultando en la síntesis de varios isómeros, mientras que las glicosiltransferasas son muy específicas en el enlace formado. Otra desventaja es la de competir con la actividad opuesta y natural de estas enzimas que es la hidrólisis de oligosacáridos, lo cual genera que el producto sintetizado pueda ser hidrolizado por la misma enzima, reduciendo el rendimiento neto de la síntesis. En cuanto a las ventajas

que presentan las glicosidasas, destacar que son más fáciles de producir en grandes cantidades y a bajo costo, se encuentran mejor caracterizadas y se puede encontrar una gran variedad de ellas en la naturaleza (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2013; Sandoval and Vaultier, 2012; van Rantwijk, 1999).

La síntesis de oligosacáridos mediante la utilización de glicosidasas puede ocurrir de dos formas, por una hidrólisis reversa controlada termodinámicamente, en donde un monosacárido actúa como donador en una reacción de condensación, o mediante una transglicosidación controlada cinéticamente, en donde se utiliza un donador activado como por ejemplo un *p*-nitrofenil (pNP) monosacárido. En la hidrólisis reversa el máximo rendimiento posible está determinado por el equilibrio de reacción, y las reacciones suelen ocurrir en un largo periodo de tiempo, mientras que la transglicosidación logra sobrepasar el equilibrio favoreciendo la glicosidación de un aceptor, siempre y cuando el sustrato activado que actúa como donador sea más reactivo que el producto formado (Ichikawa *et al.*, 1992; Kasche, 1986; van Rantwijk, 1999; Yoon, 2000). En ambos casos las reacciones se producen en competencia simultánea con la hidrólisis tanto del sustrato como del producto obtenido.

Las glicosidasas utilizadas hasta el momento para sintetizar oligosacáridos mantienen la configuración anomérica en sus productos y utilizan el mecanismo de doble desplazamiento descrito por Koshland (Zeuner *et al.*, 2014). El mecanismo de doble desplazamiento involucra la formación de un intermediario covalente glicosil-enzima, éste se forma después de unirse el sustrato donador al sitio activo de la enzima, al mismo tiempo que es liberado por hidrólisis el grupo activo del sustrato donador, como por ejemplo el grupo pNP (Koshland, 1953; Rye, 2000) (Fig. 1.5). Posteriormente, el intermediario glicosil-enzima sufre un ataque nucleofílico, ya sea por agua, dando como producto la hidrólisis, o por un aceptor, resultando así en una transglicosidación (Fig. 1.5). Hay que destacar que el producto formado por la transglicosidación también es sustrato de la glicosidasa, y por lo tanto puede ser hidrolizado (Fig. 1.5).

Los rendimientos finales obtenidos en reacciones de transglicosidación son el resultado del balance entre la síntesis, la hidrólisis del sustrato donador y la hidrólisis del producto formado. Como consecuencia de esta competencia suelen obtenerse rendimientos pobres, sin embargo, existe un número de estrategias que incluyen el control de la proporción aceptor/donador, tiempo de reacción, cantidad de enzima utilizada, control de pH y temperatura de reacción, inmovilización y reutilización de las

glicosidasas, eliminación continua del producto sintetizado, utilización de solventes orgánicos e ingeniería de proteínas, dirigidas a incrementar la transglicosidación y disminuir la hidrólisis, que permiten aumentar en gran medida los rendimientos obtenidos (Zeuner *et al.* 2014).

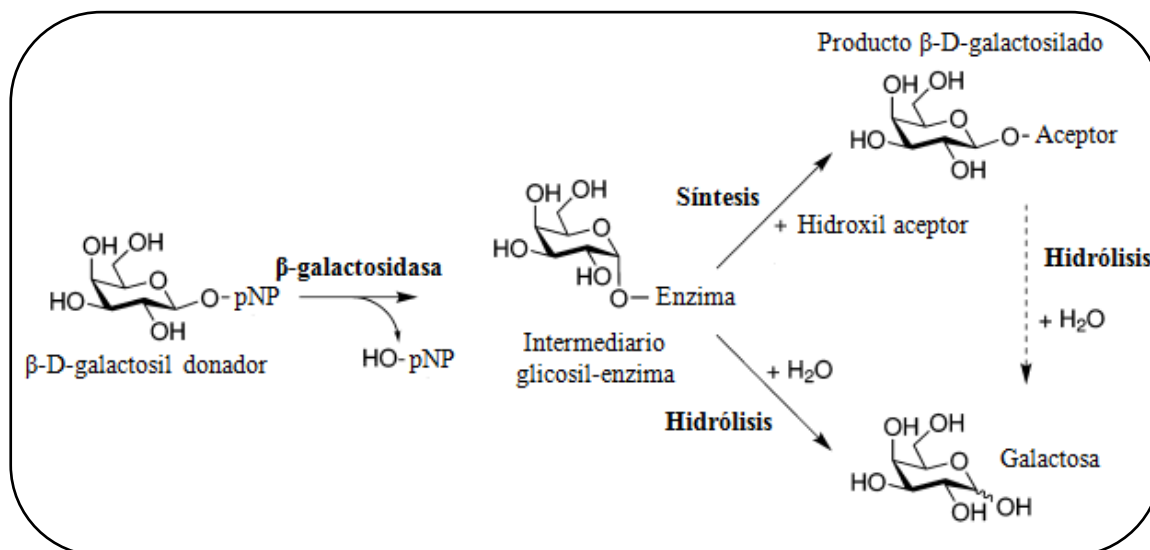


Fig. 1.5. Esquema de las reacciones catalizadas por las β -galactosidasas (Adaptada de Zeuner *et al.* 2014)

1.1.8.3. Síntesis por ingeniería genética

Algunos OLH han sido producidos mediante ingeniería genética en *E. coli*. Este es el caso de la LNT, recientemente se ha integrado en el cromosoma de la cepa de *E. coli* LJ110 (mutante en el gen *lacZ*) el gen *lgtA* de *Neisseria meningitidis* que codifica para la β 1–3-N-acetilglucosaminiltransferasa y el gen *wbgO* de *E. coli* O55:H7 que codifica para la β 1–3-galactosiltransferasa. La cepa recombinante convierte la lactosa en LNT mediante dos pasos de glicosilación sucesivos (Fig. 1.6). Utilizando cultivos continuos con galactosa como fuente de energía y carbono se ha conseguido una producción de 12,72 g/L de LNT (Baumgartner *et al.*, 2015).

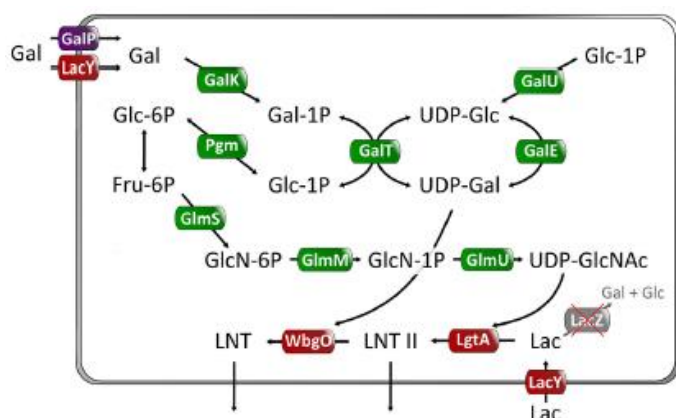


Fig. 1.6. Rutas metabólicas para la síntesis *in vitro* de lacto-N-triosa y LNT en *E. coli* LJ-AYO. LacY, lactosa permeasa; LacZ, β -galactosidasa; LgtA, β -1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa; WbgO, β -1,3-galactosiltransferasa.

Otros ejemplos de OLH sintetizados en células enteras mediante ingeniería metabólica son la 2'FL (Baumgartner *et al.*, 2013; Chin *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2012), 3'SL (Endo *et al.*, 2000; Fierfort and Samain, 2008; Priem *et al.*, 2002), 6'Sialillactosa y 6,6'Disialillactosa (Drouillard *et al.*, 2010), LNTriosa, LNnT, LNnHexaosa, LNnOctaosa y LNnDecaosa (Priem *et al.*, 2002).

1.2. Lacto-N-biosa (LNB) y Galacto-N-biosa (GNB)

La LNB (Gal β 1-3GlcNAc) forma el núcleo de los OLH de cadena de tipo 1 (Thurl *et al.*, 2010; Urashima *et al.*, 2012), los más abundantes en la leche materna, y específicos de humanos (Urashima *et al.*, 2013). La LNB también forma parte de mucinas presentes en la leche humana (Garrido *et al.*, 2013) y de la estructura de los dominios glicanos de glicolípidos y glicoproteínas en muchos tipos celulares, incluyendo el epitelio intestinal y los antígenos sanguíneos (Finne *et al.*, 1989; Hakomori, 2008). Además, recientemente se ha demostrado que también está presente en la leche materna el disacárido libre, en concentraciones decrecientes desde 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el calostro a niveles por debajo del límite de detección después de la primer semana de lactancia (Balogh *et al.*, 2015) (Fig. 1.7). Dado que la biosíntesis de moléculas se rige por la selección natural, y que la síntesis de moléculas innecesarias daría como resultado el desperdicio de energía (Zivkovic *et al.*, 2011), la presencia de este disacárido libre en la leche materna sugiere que podría desempeñar funciones biológicas importantes.

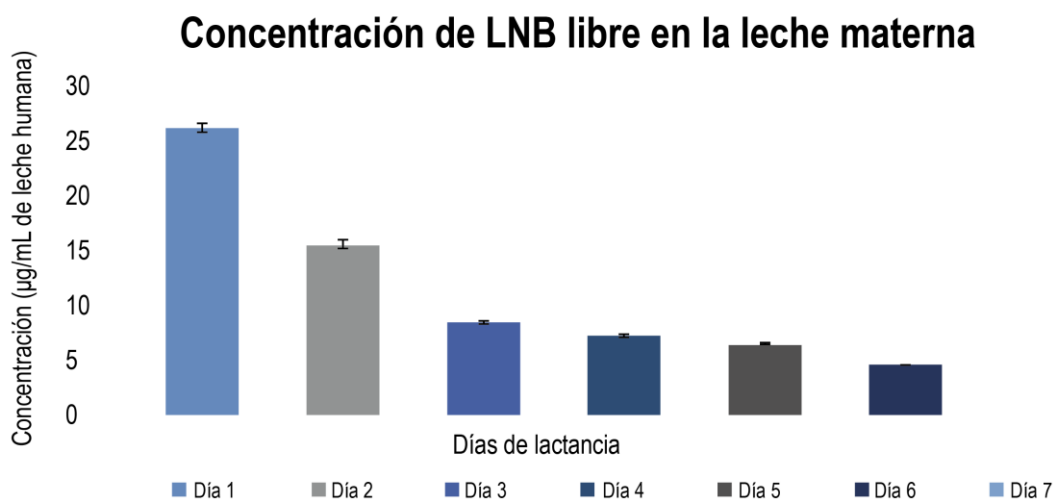


Fig. 1.7. Concentración de LNB libre en leche materna (Adaptado de Balogh *et al.*, 2015).

Entre estas funciones destaca un efecto bifidogénico, de hecho, antes de ser caracterizado, a este disacárido se lo llamaba factor Bifidus. En distintos estudios donde se realizaron cultivos puros con más de 200 cepas de 10 especies del género *Bifidobacterium*, se observó la capacidad de metabolizar este disacárido por las especies *B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum* y *B. bifidum* (Tabla 1.4) (Xiao *et al.*, 2010). Estas especies predominan en la microbiota de niños recién nacidos alimentados con leche materna.

El potencial prebiótico de la LNB se ha analizado también utilizando muestras fecales de niños en un sistema de fermentación *in vitro*, y se ha comparado con otros oligosacáridos (lactulosa, rafinosa, GOS y mananoligosacáridos) (Sato *et al.*, 2013). Se ha observado que la LNB, al igual que los otros oligosacáridos, aumentaba significativamente la población total de bifidobacterias. Además, se encontraron características únicas para la LNB, ésta fue el único de los oligosacáridos en el cual el efecto bifidogénico fue selectivo sobre *B. bifidum*, y fue el único en el cual se observó una mayor producción de ácido acético y una menor producción de ácido láctico (Sato *et al.*, 2013). *B. bifidum* es la bifidobacteria predominante en la microbiota de niños sanos amamantados (He *et al.*, 2001). Además se ha descrito en una línea celular “macrophage-like” murina que algunas especies de bifidobacterias, entre las cuales se encuentra *B. bifidum*, estimulan la producción de IL-10, una interleuquina regulatoria clasificada dentro de las de efecto antiinflamatorio (He *et al.*, 2002). También se ha descrito recientemente que *B. bifidum* mejora la integridad intestinal en un modelo de NEC en neonatos de ratas, mediante la expresión del receptor “toll-like” 2 que preservan las uniones estrechas, y la expresión de ciclooxigenasa 2 y prostaglandina E2 para suprimir la apoptosis epitelial intestinal (Khailova *et al.*, 2010). Por otra parte, el incremento en el ácido acético también presenta numerosos beneficios, ya que éste también aumenta las uniones estrechas entre las células del epitelio intestinal, estimula su crecimiento y regula el metabolismo energético, incluyendo el apetito y el gasto energético a través de GPR 41 o GPR 43 (Darzi *et al.*, 2011; Miyauchi *et al.*, 2010; Ohata *et al.*, 2005). Otro efecto descrito para el ácido acético producido por bifidobacterias es inhibir la traslocación de la toxina Shiga de *E. coli* O157:H7 desde el lumen intestinal a la sangre, mediante la mejora del efecto barrera intestinal (Fukuda *et al.*, 2011).

Además del potencial prebiótico, la LNB posee un efecto antiadhesina. Éste se ha descrito en células epiteliales del sistema respiratorio frente a algunos patógenos, tanto obligados como oportunistas. Inhibe en un 46% la adhesión de *Yersinia pestis* a células epiteliales del sistema respiratorio (Thomas and Brooks, 2006), en un 64% la adhesión de *Bacillus anthracis* a una línea celular alveolar humana, y en un 64% la adhesión de los patógenos oportunistas *Pseudomona aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia* y *Legionella pneumophila* a una línea celular alveolar (Thomas and Brooks, 2004a; Thomas and Brooks, 2004b).

Tabla. 1.4. Especies del género *Bifidobacterium* capaces (+) e incapaces (-) de metabolizar LNB.

Especies	Metabolismo
<i>B. breve</i>	+
<i>B. longum</i> subp. <i>infantis</i>	+
<i>B. longum</i> subp. <i>longum</i>	+
<i>B. bifidum</i>	+
<i>B. adolescentis</i>	-
<i>B. animalis</i> sub. <i>lactis</i>	-
<i>B. catenolatum</i>	-
<i>B. adolescentis</i>	-
<i>B. dentium</i>	-
<i>B. angulatum</i>	-
<i>B. thermophilum</i>	-

La GNB (Gal β 1-3GalNAc) es un disacárido que forma parte de distintas estructuras funcionales de carbohidratos. Constituye el núcleo de la O-glicosidación de proteínas, y está presente en numerosas proteínas como por ejemplo la mucina que se encuentra presente en la leche materna y en el tracto gastrointestinal humano (Fujita *et al.*, 2005; Hanisch, 2001; Kimura *et al.*, 2007; Kudo *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2008). También forma parte de la estructura de los glicoesfingolípidos (Liu and Newburg, 2013; Lloyd *et al.*, 1996; Moran *et al.*, 2011).

La GNB constituye el antígeno Thomsen–Friedenreich (TF) o antígeno T, éste ha adquirido una gran relevancia en los últimos años ya que ha sido clasificado como un carbohidrato antigénico asociado a tumores (Tumor Associated Carbohydrate Antigens-TACAs). La GNB suele encontrarse en la superficie de la membrana celular de células cancerosas y se utiliza como biomarcador (Brockhausen, 1999; Campbell *et al.*, 1995). Los genes que codifican para las glicosiltransferasas que modifican al antígeno T, con excepción de las sialiltransferasas, no se expresan en las células cancerosas, resultando

en cadenas cortas de carbohidratos como los antígenos T, Tn (T antigen nouvelle), sialil-T (sT) y sialil-Tn (sTn) (Brockhausen, 1999; Itzkowitz *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1994; Yu, 2007). Distintos TACAs expresados en células cancerígenas son representados en la Fig. 1.8A.

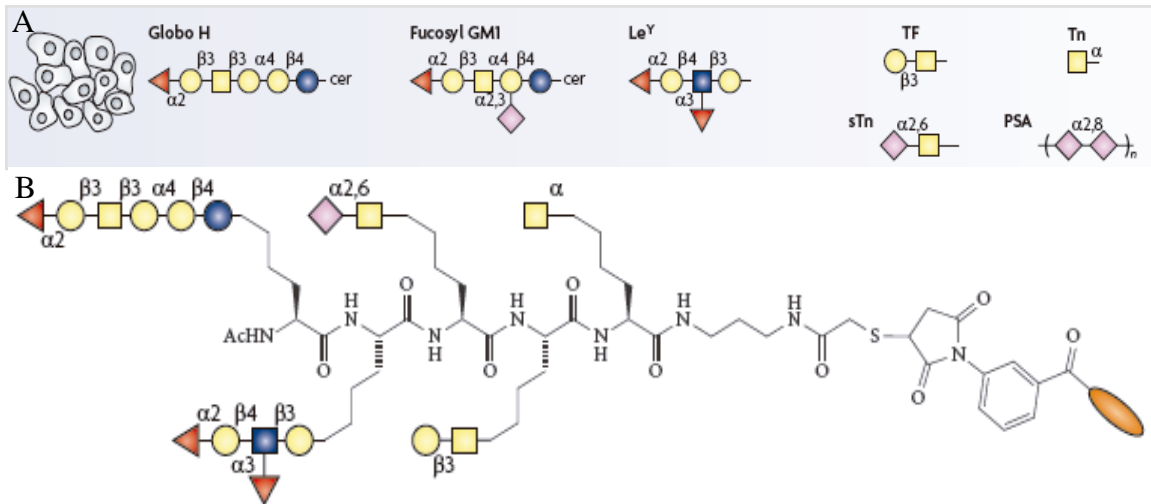


Fig. 1.8. A) Glicanos antigénicos asociados a glicolípidos (Globo H, Fucosyl GM1 y LeY) o glicoproteínas (TF, Tn, sTn y PSA), encontrados comúnmente en células cancerígenas de distintos tejidos. B) Ejemplo de un glicoconjugado sintético antigénico pentavalente utilizado en una vacuna contra cáncer. En este caso se utilizó como carrier a la hemocianina de “Keyhole limpet” (KLH), representado con un óvalo naranja (Adaptado de (Astronomo and Burton, 2010).

Esta particularidad ha sido aprovechada para el desarrollo de vacunas basadas en carbohidratos. La segunda generación de este tipo de vacunas depende en gran medida en métodos sintéticos para imitar la presentación natural de los TACAs. Por ejemplo, TACAs asociados a mucinas, como el antígeno T, Tn, sialil-T y sialil-Tn, se encuentran en clusters y por lo tanto imitar esta forma de presentación es importante para generar una fuerte respuesta de anticuerpos que sean capaces de reaccionar con los TACAs presentes en las células tumorales (Fig. 1.8B). Ensayos clínicos con un glicopeptido conjugado con los antígenos T, Tn y sTn en forma de cluster han demostrado que es seguro para su utilización y que mejora la inmunogenicidad de estos glicanos (Gilewski *et al.*, 2007; Ragupathi *et al.*, 2006; Slovin *et al.*, 2005; Slovin *et al.*, 2003). En la tabla 1.5 se enumera una lista de vacunas basadas en carbohidratos que se encuentran en la fase de estudios preclínicos así como estudios clínicos de fase I y II. Muchas de estas poseen al antígeno T (GNB) en la estructura del glicopéptido inmunogénico, ya sea mono o multivalente (Slovin *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007b).

Tabla. 1.5. Lista de vacunas bajo ensayos preclínicos y clínicos.

Cáncer de mama	Conjugado hexavalente unimolecular (Globo H-GM2-Lewis ^x -sTn-TF-Tn-R)	Preclínico	Ragupathi <i>et al.</i> , 2006
	sTn(c)-KLH mas adyuvante QS-21	Fase I	Gilewski <i>et al.</i> , 2007
Cáncer epitelial	Globo H-GM2-Lewis ^x -MUC1-32(aa)-sTn(c)-TF(c)-Tn(c)-KLH Vacuna de conjugado mas adyuvante QS-21	Fase I	Sabbatini <i>et al.</i> , 2007
Melanoma	GM3NPhAc-KLH	Preclínico	Wang <i>et al.</i> , 2007
Cáncer de próstata	Conjugado hexavalente unimolecular (Globo H-GM2-Lewis ^x -sTn-TF-Tn-R)	Preclínico	Ragupathi <i>et al.</i> , 2006
	TF(c)-KLH mas adyuvante QS-21	Fase I	Slovin <i>et al.</i> , 2005
	Tn(c)-KLH y Tn(c)-ácido palmítico	Fase I	Slovin <i>et al.</i> , 2003
	Globo H-GM2-Lewis ^x -MUC1-32(aa)-TF(c)-Tn(c)-KLH Vacuna de conjugado mas adyuvante QS-21	Fase II	Slovin <i>et al.</i> , 2007

Se encuentran remarcadas las vacunas mono (celeste) y multivalente (marrón) que contienen GNB en la estructura del glicopéptido antigénico. (Adaptado de Astronomo y Burton. 2010).

1.2.1. Rutas metabólicas de la LNB y GNB en *Bifidobacterium*

El metabolismo de la LNB y la GNB ha sido solo caracterizado en especies del género *Bifidobacterium* (Nishimoto and Kitaoka, 2007; Satoh *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2012). Ambos disacáridos se incorporan al interior celular mediante un sistema de transporte ABC. En la cepa de *B. longum* NCC2705 los genes que codifican para este transportador y los del metabolismo se encuentran organizados en un operón (Fig. 1.9). Los primeros 3 genes de este operón (BL1638, BL1639 y BL1640) codifican las proteínas del transportador ABC; BL1638 codifica la proteína de unión a LNB y GNB, mientras que BL1639 y BL1640 codifican las permeasas correspondientes con actividad ATPasa (Fig. 1.9). A continuación de BL1640, se encuentran los 4 genes (LNBP, NahK, GalT y GalE) que codifican las proteínas que dirigen los intermediarios derivados de LNB y GNB a las rutas metabólicas centrales de *B. longum* (Kitaoka *et al.*, 2005; Nishimoto and Kitaoka, 2007). La LNBP es una fosforilasa que actúa sobre la LNB o GNB liberando Gal-1P y la N-acetilhexosamina correspondiente. Estos azúcares intermediarios ingresan en la glicólisis o en el ciclo metabólico de los aminoazúcares por la acción de NahK, GalT y GalE (Fig. 1.9).

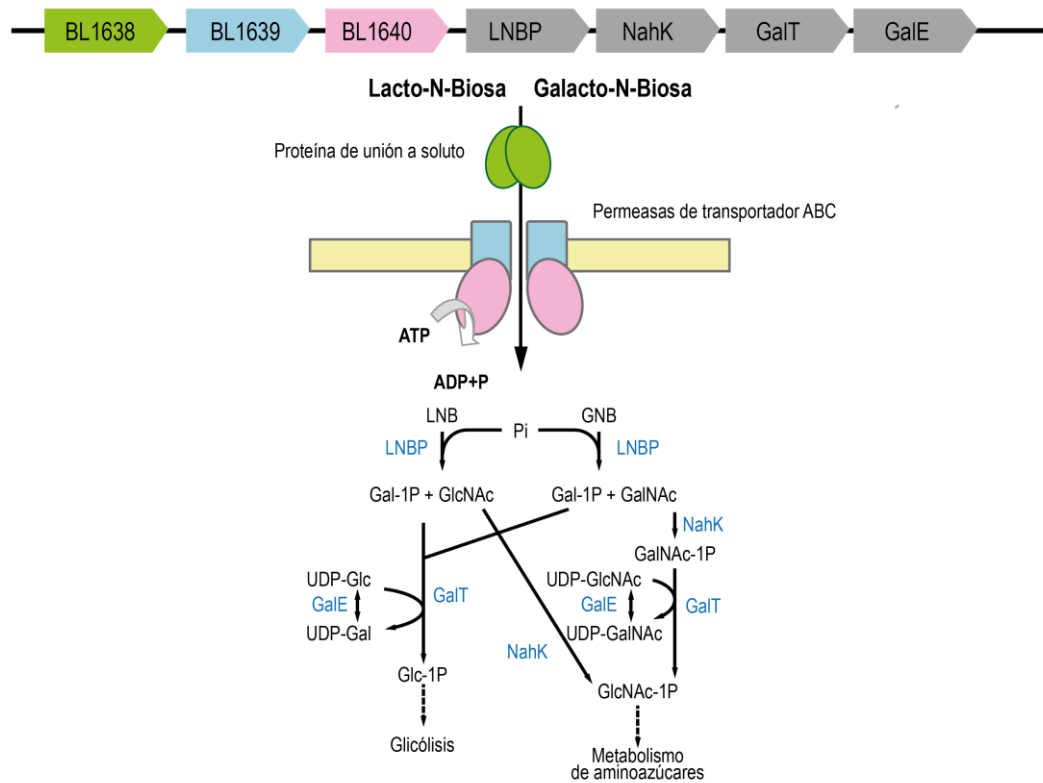


Fig. 1.9. Esquema del operón y la ruta metabólica de la LNB/GNB en *Bifidobacterium longum*. LNBP, lacto-N-biosa fosforilasa; NahK, N-acetilhexosamina-1-quinasa; GalT, UDP-glucosa-1-fosfato uridil transferasa; GalE, UDP-glucosa 4-epimerasa.

En la mayoría de los microorganismos la galactosa es metabolizada a glucosa-1P por la ruta de Leloir (Frey, 1996; Leloir, 1951) (Fig. 1.10). Esta ruta está compuesta por 4 enzimas, la galactosa mutarotasa (GalM), que convierte β -Gal a α -Gal, la galactokinasa (GalK), que convierte α -Gal a Gal-1P, la UDP-glucosa-1-fosfato uridil transferasa (GalT), que convierte Gal-1P a UDP-Gal, acoplado a la conversión de UDP-Glc a Glc-1P, y la UDP-glucosa 4-epimerasa (GalE), que convierte UDP-Gal a UDP-Glc. Aunque la ruta de la LNB/GNB se asemeja bastante a la ruta de Leloir, ambas vías son diferentes. En la ruta de Leloir la α -Gal es fosforilada mediante la galactokinasa consumiendo en el proceso una molécula de ATP, mientras que en la ruta de la LNB/GNB la enzima lacto-N-biosa fosforilasa (LNBP) hidroliza ambos disacáridos a la vez que los fosforila, dando como resultado Gal-1P y GlcNAc/GalNAc, NahK fosforila este último intermediario consumiendo una molécula de ATP en el proceso, y da lugar a GlcNAc-1P/GalNAc-1P, lo cual constituye otra diferencia respecto de la ruta de Leloir. Posteriormente Gal-1P es convertido a Glc-1P, mediante la interacción con GalT y GalE, que entra en la glicólisis a través de la ruta metabólica característica de las

bifidobacterias denominada “bifid shunt”, mientras que la N-acetilhexosamina correspondiente GlcNAc-1P/GalNAc-1P entra en la vía del metabolismo de aminoazúcares (Nishimoto and Kitaoka, 2007).

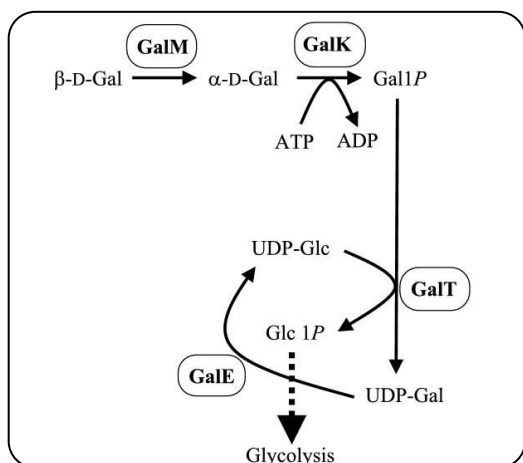


Fig. 1.10. Ruta de Leloir. GalM, galactosa mutarotasa; GalK, galactoquinasa; GalT, galactosa-1P uridil transferasa; GalE UDP-galactosa 4-epimerasa.

En *Bifidobacterium*, existen también diferentes vías para el metabolismo de la LNT (LNB β 1-3Lac), este tetrasacárido es muy abundante en la leche humana y por lo tanto es la principal fuente de LNB. *B. bifidum* secreta dos enzimas, una lacto-N-biosidasa (LnbB) que hidroliza la LNT a LNB y lactosa, y una endo- α -N-acetilgalactosaminidasa (EngBF) que libera GNB a partir de O-glicanos de las mucinas (Wada *et al.*, 2008). Posteriormente LNB y GNB son transportadas y metabolizadas por una ruta LNB/GNB homóloga a la descrita anteriormente para la cepa de *B. longum* NCC2705. Al contrario, *B. longum* subsp. *infantis* utiliza un transportador ABC para internalizar la LNT, y posteriormente ésta es degradada secuencialmente. Primero la acción de una β 1-3galactosidasa libera galactosa y lacto-N-triosa, y después una β -N-acetilglucosaminidasa libera GlcNAc y lactosa (Yoshida *et al.*, 2012).

1.2.2. Síntesis de LNB y GNB

La síntesis de LNB y GNB ha sido realizada mediante síntesis química (Ito, 1992; Wilstermann and Magnusson, 1995), y mediante síntesis enzimática utilizando β -galactosidasas (Hedbys *et al.*, 1989) y β -galactosiltransferasas (Yi *et al.*, 2008). Se ha utilizado una β -galactosidasa aislada de testículos bovinos, la cual posee una regioselectividad muy baja, dando como subproductos la formación de disacáridos con enlaces β 1-4 y β 1-6, además del β 1-3 deseado (Hedbys *et al.* 1989). Después de la transglicosilación es necesario un paso de hidrólisis con β -galactosidasas de *E. coli* para

eliminar los isómeros no deseados y finalmente tras un paso cromatográfico, se obtuvo únicamente un rendimiento del 12%. La síntesis mediante la galactosiltransferasa WbiP de *E. coli* O127 (Fig. 1.11), requiere un sustrato caro como es la UDP-galactosa, el cual también genera inhibición por sustrato, dos inconvenientes a la hora de realizar un proceso a gran escala. Además hay que destacar que la Cepa *E. coli* O127 está clasificada como EPEC (*E. coli* Enteropatógena), y la utilización de enzimas derivadas de ella es conflictiva en la industria alimentaria.

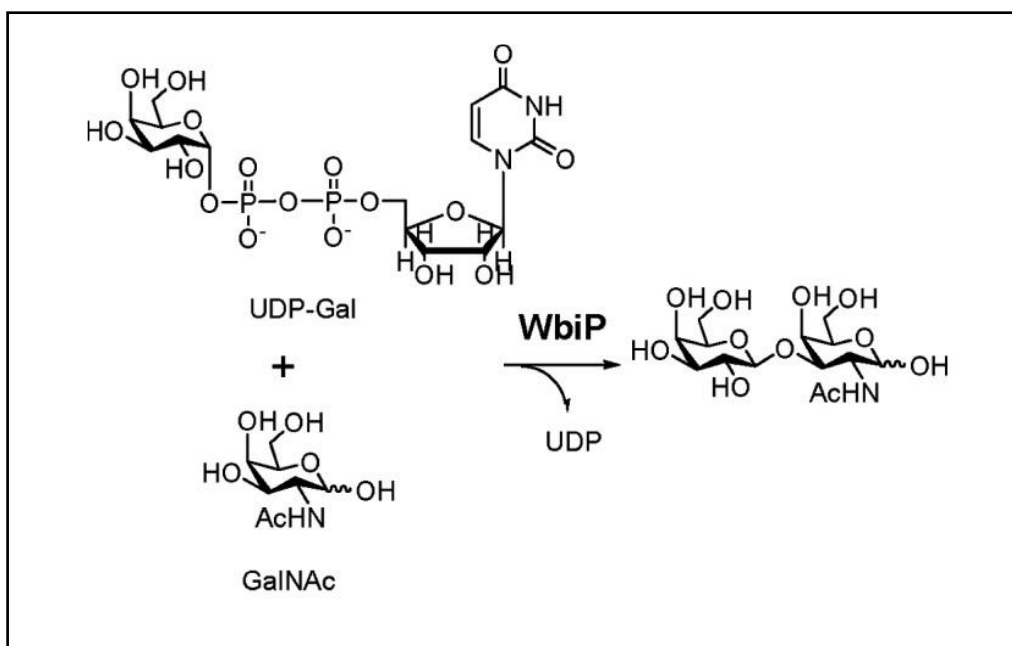


Fig. 1.11. Esquema representativo de la síntesis de GNB catalizada por la galactosiltransferasa WbiP de *E. coli* O127. (Extraído de Yi *et al.* 2008)

En los últimos años se han descrito dos métodos enzimáticos basados en la actividad de enzimas fosforilasas de LNB y GNB aisladas de bifidobacterias (Nishimoto and Kitaoka, 2007, 2009; Yu *et al.*, 2010). El primero de ellos corresponde a un proceso escalable, que utiliza como sustrato sacarosa y GlcNAc o GalNAc, en presencia de UDP-Glucosa, fosfato, y cuatro enzimas simultáneamente: sacarosa fosforilasa (SP) (EC 2.4.1.7, SP), UDP-glucosa-hexosa-1-fosfato uridiltransferasa (EC 2.7.7.12, GalT), UDP-glucosa-4-epimerasa (EC 5.1.3.2, GalE) y galacto-N-biosa/lacto-N-biosa fosforilasa (EC 2.4.1.211, GLNBP) (Nishimoto y Kitaota 2007; Nishimoto y Kitaota 2009). Las reacciones se esquematizan en la Fig. 1.12A. La sacarosa es fosforilada e hidrolizada por la SP dando lugar a glucosa-1P (Glc-1P) y fructosa, después el grupo uridin monofosfato de la UDP-Gal es transferido a la Glc-1P por GalT formando Gal-1P y UDP-Glc. Finalmente se sintetiza LNB/GNB a partir de Gal-1P y

GlcNAc/GalNAc por la acción de GLNBP. En una reacción simultánea GalE regenera la UDP-Gal a partir de UDP-Glc. Al terminar la reacción, después de unas 96-140 h, se adiciona levadura de panadería y se incuba durante 12 h para eliminar el exceso de sacarosa y fructosa. Con este método se ha obtenido LNB y GNB, respectivamente, con un 95% de pureza. A pesar de ser un proceso escalable, aún es necesaria la utilización de un sustrato caro como la UDP-Glc. Por otra parte, la utilización de levadura para eliminar los azúcares remanentes tiene el inconveniente de la secreción de metabolitos propios de la levadura, introduciendo una serie de impurezas no deseadas a la hora de utilizar estos disacáridos en la industria alimentaria y/o farmacéutica.

El segundo método corresponde a una reacción de dos enzimas, la β 1-3-N-acetil-D-hexosamina fosforilasa de *B. longum* subsp. *infantis* (BiGalHexNAcP), homóloga a GLNBP, y GalK recombinante de *E. coli* que cataliza la formación de Gal-1P a partir de galactosa, en presencia de ATP (Yu *et al.*, 2010). El Gal-1P generado *in situ* es utilizado como sustrato donador por la fosforilasa BiGalHexNAcP para producir LNB/GNB (Fig. 1.12B). En este caso la purificación de LNB/GNB se realizó mediante dos pasos cromatográficos, uno de exclusión por tamaño y otro de gel de sílice. Este método ha sido útil para ensayar la versatilidad de la enzima BiGalHexNAcP, la cual es capaz de utilizar diferentes sustratos aceptores además de GlcNAc/GalNAc, dando lugar a la formación de distintos β -3-galactósidos. La utilización en este proceso de síntesis de un sustrato caro como es el ATP dificulta, como en el método anterior, su escalado para uso industrial.

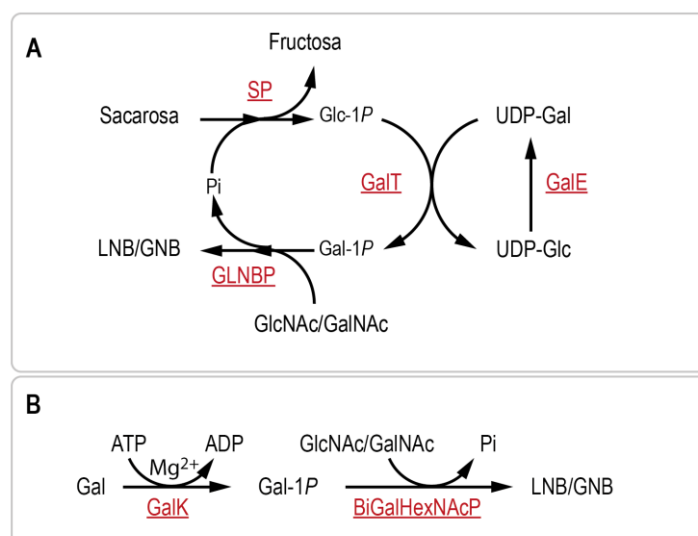


Fig. 1.12. Esquemas de reacciones de síntesis de LNB/GNB de Nishimoto y Kitaota. 2007; Nishimoto y Kitaota. 2009 (A) y Yu. *et al.*, 2010 (B), basados en fosforilasas.

1.3. N-acetilactosamina y lacto-N-triosa

La LacNAc (Gal β 1-4GlcNAc) es el núcleo de los OLH de cadena de tipo 2 (Thurl *et al.*, 2010; Urashima *et al.*, 2012), y una estructura ampliamente distribuida en los dominios glicano de glicoproteínas y glicolípidos (Bridiau *et al.*, 2010). Además, recientemente se ha demostrado que el disacárido libre también está presente en la leche materna, en concentraciones decrecientes desde 310 $\mu\text{g/ml}$ en el calostro a 6,7 $\mu\text{g/ml}$ después de la primer semana de lactancia (Balogh *et al.*, 2015) (Fig. 1.13).

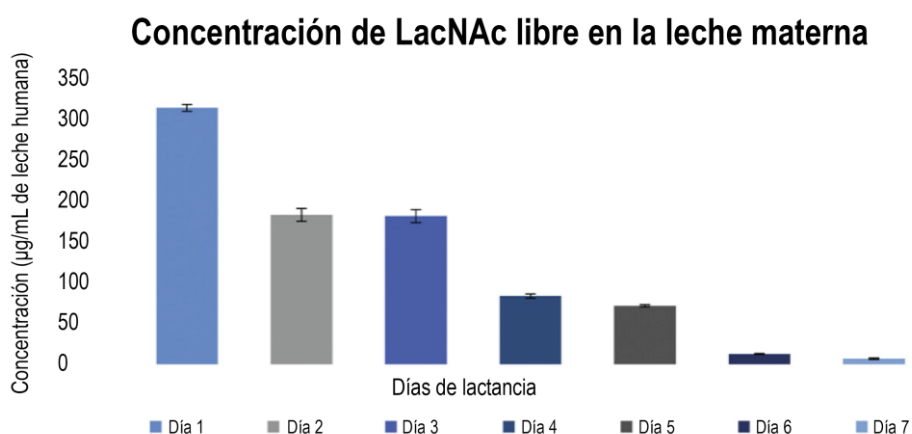


Fig. 1.13. Concentración de LacNAc libre en leche materna (Adaptado de Balogh *et al.*, 2015).

La LacNAc tiene un papel central en diversos procesos de reconocimiento celular (Berg, 2007) y puede estar involucrada en distintas enfermedades infecciosas (Bozue *et al.*, 1999), autoinmunes e inflamatorias (Cappione *et al.*, 2004; Hayer *et al.*, 2005; Rosen, 1999) o cáncer (Witz, 2006). Es la unidad estructural de las cadenas de polilactosamina, forma parte del antígeno sialil Lewis X, el cual ha sido caracterizado como un TACAs (Bay, 2006; Guillot *et al.*, 2004) y es el ligando funcional de lectinas tipo S (galectinas) y tipo C (E-,P-, y E-selectinas) (Dimitroff *et al.*, 2005; Simanek *et al.*, 1998). El antígeno sialil Lewis X media la adhesión de leucocitos a la superficie celular del endotelio, permitiendo su reclutamiento durante una respuesta inflamatoria normal (Lasky, 1992) o en respuesta a heridas o infección (Anderson and Springer, 1987). También está involucrado en migración metastásica transendotelial de algunas células tumorales que utilizan los mecanismos de adhesión mediados por selectinas, típicos de los leucocitos (Auguste *et al.*, 2007; Giavazzi *et al.*, 1993; Miles *et al.*, 2008; Takada *et al.*, 1993; Witz, 2006). Es por esto que se ha especulado con que análogos del antígeno sialil Lewis X pudieran inhibir la adhesión de leucocitos o células de

carcinoma, haciendo de estos compuestos potenciales drogas antiinflamatorias o antimetastásicas (Bridiau *et al.*, 2010).

Los efectos beneficiosos descritos hasta el momento para la LacNAc son principalmente los referentes a sus propiedades como antiadhesina. Este disacárido inhibe en un 42% la adhesión de *Yersinia pestis* a células epiteliales del sistema respiratorio (Thomas y Brooks 2006), en un 41% la adhesión de *Bacillus anthracis* a una línea celular alveolar humana, y en un 72% la adhesión de los patógenos oportunistas *Pseudomona aeruginosa*, *B. cenocepacia* y *Legionella pneumophila* a una línea celular alveolar (Thomas and Brooks, 2004a; Thomas and Brooks, 2004b).

Se ha observado que la LacNAc conjugada a BSA (LacNAc-BSA) o a nanopartículas de oro (LacNAc-Au) es capaz de inhibir en un 98% y 72%, respectivamente, la adhesión de la cepa enteropatógena *E.coli* (EPEC E2348/69) a la línea celular HEP-2 (Hyland *et al.*, 2006). Del mismo modo la LacNAc-BSA es capaz de inhibir en un 87% y 74% la adhesión de *E.coli* (EPEC E2348/69) a las líneas celulares intestinales Caco-2 y T84, respectivamente (Hyland *et al.*, 2006).

La lacto-N-triosa (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glu) es un trisacárido que forma parte de ambos tipos de OLH, de cadena tipo 1 y cadena tipo 2, poniendo en evidencia su importancia dentro del conjunto total de los OLH (Bode, 2012). También está presente en la estructura de los glicoesfingolípidos de las series lacto- y lactoneotetraglicosilceramidas. Los glicanos presentes en estos lípidos desempeñan muchas funciones en procesos biológicos como por ejemplo el reconocimiento célula-célula y forman parte además de los grupos sanguíneos ABH (Schnaar *et al.*, 2009).

1.4. Bacterias lácticas

El término bacterias lácticas engloba a un grupo heterogéneo de microorganismos, cuyo carácter definitorio es la producción de ácido láctico como producto mayoritario de la fermentación de azúcares. Después de años de discusión sobre la clasificación de las bacterias incluidas bajo ese término, éste ha adquirido un significado ambiguo, pudiendo referirse a bacterias del orden *Lactobacillales* exclusivamente o al conjunto de *Lactobacillales* y *Bifidobacterium*. A pesar de que hoy en día se reconoce que estos órdenes pertenecen a dos grupos filogenéticamente distantes como son los Firmicutes (*Lactobacillales*) y las Actinobacterias

(*Bifidobacterium*), por muchos años se los ha agrupado bajo el nombre de bacterias lácticas debido a sus similitudes fenotípicas. Dentro de los dos grupos pueden encontrarse géneros relevantes tanto en alimentación como en salud (Tabla 1.6).

Tabla. 1.6. Clasificación taxonómica de bacterias lácticas según el “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/taxonomy/>) (Adaptado de (Aznar and Zuñiga., 2011))

Clasificación taxonómica de bacterias ácido lácticas					
Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>
		(Subclase Actinobacteridae)		<i>Aerococcaceae</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	<i>Lactobacillales</i>	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>
				<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
					<i>Pediococcus</i>
				<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>
					<i>Oenococcus</i>
	<i>Weissella</i>				
		<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>		
			<i>Streptococcus</i>		

1.4.1. *Bifidobacterium*

El género *Bifidobacterium* engloba a más de 30 especies. Son bacilos pleomórficos, gram-positivos, catalasa y oxidasa negativos, y anaerobios. Algunas especies son capaces de crecer en presencia de oxígeno si también hay CO₂. Las bifidobacterias se caracterizan por utilizar una ruta metabólica especial para la fermentación de las hexosas conocida como “Bifidus shunt” o “fructosa-6-fosfato shunt” (Fig. 1.14A). Ésta se caracteriza por la presencia de la enzima fructosa-6-fosfato fosfocetolasa, la cual degrada la fructosa-6-fosfato en acetilfosfato y eritrosa-4-fosfato (Schramm *et al.*, 1958). Esta actividad enzimática permite diferenciar a las bifidobacterias del resto de las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillales*).

Las bifidobacterias se encuentran asociadas al tracto gastrointestinal y/o genital de humanos y animales, siendo algunas de ellas exclusivas de niños, de hecho son las

primeras colonizadoras del intestino, encontrándose en mayor proporción en niños alimentados con leche materna que en niños alimentados con leches de fórmula (Aznar and Zuñiga., 2011). Las poblaciones de estas bacterias en el intestino humano de adultos parecen tener un papel relevante en la salud del individuo. Entre otras funciones, se les ha atribuido un efecto regulador sobre las poblaciones bacterianas que constituyen la microbiota intestinal, prevención de la diarrea, potenciación del sistema inmune y mejora de la intolerancia a la lactosa, entre otras, lo cual ha despertado un gran interés en su investigación por bacteriólogos y nutricionistas (Biavati and Mattarelli, 2006). Algunas cepas han sido caracterizadas como probióticas y se utilizan en la industria alimentaria y farmacéutica (Kligler and Cochrane, 2008; Wu *et al.*, 2016).

1.4.2. *Lactobacillales*

Los *Lactobacillales*, o comúnmente llamadas bacterias ácido lácticas (BAL), son un grupo de microorganismos pertenecientes al filum Firmicutes, subdivisión *Clostridium-Bacillus* de las Eubacterias Gram-positivas, que se caracterizan por ser no esporulantes, catalasa negativas, quimio-organotrofas, y con un metabolismo estrictamente fermentativo de carbohidratos como fuente de energía. El producto final mayoritario de la fermentación de estas bacterias es el ácido láctico, lo cual les confiere su nombre, pero también producen acetato, etanol y CO₂ ya que muchas poseen un metabolismo heterofermentativo. Estas bacterias crecen en anaerobiosis, sin embargo, gran parte de ellas son capaces de crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, por lo que son consideradas aerotolerantes o microaerofílicas (Aznar and Zuñiga., 2011).

Dentro de este grupo bacteriano se incluyen cocos (*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *etc*) y bacilos como el género *Lactobacillus*, el cual comprende 148 especies reconocidas.

Las BAL se caracterizan por desarrollarse en nichos nutricionalmente complejos. Dentro del género *Lactobacillus* podemos encontrar especies principalmente presentes en la industria láctea (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*), otras aisladas frecuentemente de productos cárnicos (*Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*), especies encontradas en el tracto gastrointestinal de vertebrados (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*), y especies con una gran adaptabilidad a diversos hábitats (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*).

Por lo general, estos microorganismos poseen un grado considerable de auxotrofia, esto se debe a que tienen una capacidad biosintética limitada y por lo tanto, para compensar sus requerimientos nutricionales complejos entre los que se incluyen aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas, codifican en sus genomas una gran variedad de transportadores que les permiten importar los nutrientes de los nichos complejos donde se desarrollan.

1.4.2.1. El género *Lactobacillus* en la leche humana

La leche humana constituye una buena fuente de bacterias lácticas, tales como lactobacilli, lactococci, enterococci y *Leuconostoc* spp., para el tracto gastrointestinal de los niños. Especies del género *Lactobacillus* han sido aisladas tanto de la leche humana como de las heces de los lactantes e incluyen entre otras a *Lactobacillus rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *Lactobacillus brevis* y *L. casei* (Martin et al., 2007; Albesharat et al., 2011). Estudios moleculares han demostrado que especies de *Lactobacillus* eran aisladas de forma significativa con más frecuencia de las heces de niños amamantados que de las de niños destetados (Ahrne et al., 2005). Se ha observado además, que a los seis meses el recuento de *Lactobacillus* era significativamente más alto en las heces de niños amamantados que en los alimentados con fórmulas infantiles (Rinne et al., 2005).

1.4.2.2. Metabolismo de carbohidratos

Las BAL pueden metabolizar los azúcares por la vía heterofermentativa (vía de las Pentosas Fosfato) (Fig. 1.14B) u homofermentativa (Embden-Meyerhof o Glicólisis) (Fig. 1.14C). En el caso de las hexosas, las BAL las pueden transportar al interior celular sin fosforilar y posteriormente ser fosforiladas por medio de hexoquinasas dependientes de ATP o a través de un sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato o PTS, el cual lleva a cabo simultáneamente el transporte y la fosforilación del azúcar. En ambos casos se forma hexosa-6-fosfato, si ésta es metabolizada por la glucólisis se forma fructosa-1,6-difosfato, que será convertida por una fructosa-1,6-difosfato aldolasa en dihidroxiacetona-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato (GAP). Estos serán metabolizados hasta piruvato, produciendo un balance

energético de 2 moles de ATP por mol de glucosa consumida. En condiciones normales, como por ejemplo exceso de azúcar y acceso limitado a oxígeno, el piruvato es reducido a ácido láctico por la lactato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ . Este proceso metabólico en el que se mantiene el balance redox y en el que el ácido láctico es el principal producto final se conoce como fermentación homoláctica.

La otra ruta principal para el metabolismo de las hexosas es la vía de las pentosas fosfato, también denominada ruta de la fosfocetolasa o ruta del gluconato-6-fosfato. En esta ruta destaca la formación de gluconato-6-fosfato por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, seguida de descarboxilación con la consiguiente formación de pentosas-fosfato, que serán convertidas por la fosfocetolasa en GAP y acetil-fosfato. El GAP es metabolizado igual que en la glucólisis y el acetil-fosfato, en ausencia de otro aceptor de electrones, es reducido a etanol vía acetil-CoA y acetaldehído. Debido a que este proceso metabólico genera CO_2 y etanol además de ácido láctico se le conoce como fermentación heteroláctica. Esta ruta a diferencia de la homoláctica produce 1 mol de ATP por mol de glucosa consumido.

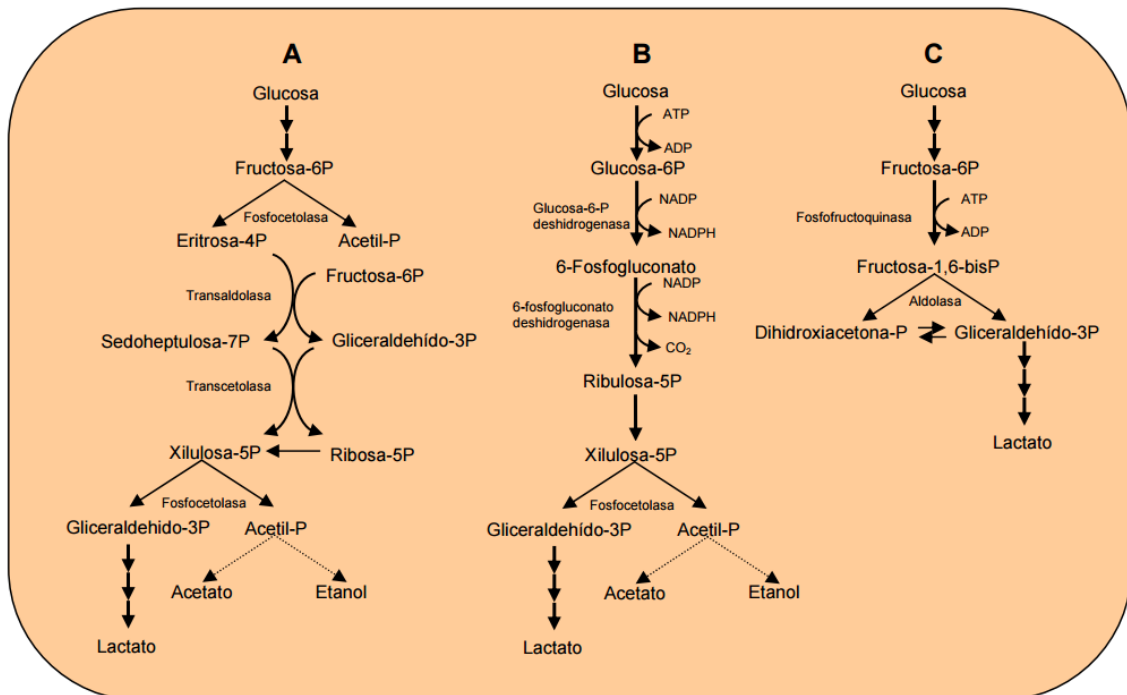


Fig. 1.14. Esquema de las rutas metabólicas de las bacterias ácido lácticas. A) Bifidus shunt; B) Ruta heterofermentativa; C) Ruta homofermentativa.

1.4.2.3. Sistemas de transporte de azúcares

Previo al catabolismo, los carbohidratos deben ser transportados al interior celular. Los azúcares pueden ser transportados del medio extracelular por difusión simple, aunque lo hacen mayoritariamente por transporte activo, que permite su entrada en contra del gradiente de la concentración. Esos mecanismos incluyen permeasas específicas ligadas a iones y/o hidrólisis de ATP (transportadores tipo ABC), sistemas de intercambio precursor/producto y sistemas PTS (Pérez-Martínez G., 2008).

1.4.2.3.1. Permeasas dependientes del gradiente de protones

Las permeasas son proteínas de membrana que transportan los azúcares sin fosforilar por un mecanismo dependiente de gradiente de protones. El azúcar será posteriormente fosforilado por una quinasa dependiente de ATP antes de entrar en las rutas metabólicas. Transporte conducido por una fuerza motriz de protones ha sido demostrado para la glucosa en *L. casei* (Veyrat *et al.*, 1994).

1.4.2.3.2. Sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato o PTS

El sistema PTS posee varios componentes que funcionan como una cadena de transportadores del grupo fosfato de alta energía del fosfoenolpiruvato (PEP) hasta el azúcar a transportar, de modo que el azúcar entra ya en la célula fosforilado. El sistema PTS consta de dos proteínas comunes para todos los azúcares, que son la Enzima-I (EI) y la enzima HPr (proteína pequeña termoestable, rica en Histidinas). El otro componente es la Enzima-II (EII), que es específica de cada azúcar, y lleva a cabo su detección, transporte y fosforilación. La EII puede estar formada por tres o cuatro dominios funcionales (EIIA, EIIB, EIIC y EIID), que pueden estar independientes o fusionados. En función de la homología de la secuencia de aminoácidos y la organización de los dominios, las EII se han agrupado en varias clases o familias (glucosa, manitol, lactosa, manosa, sorbitol y galactitol) (Pérez-Martínez *et al.*, 2008). El EI se fosforila a partir del PEP y transfiere el grupo fosfato al residuo His-15 de la HPr. Después, la HPr fosforilada (HPr-His-P) transfiere el fosfato al enzima EII, que lleva a cabo el transporte del azúcar asociado a su fosforilación (Fig.1.15).

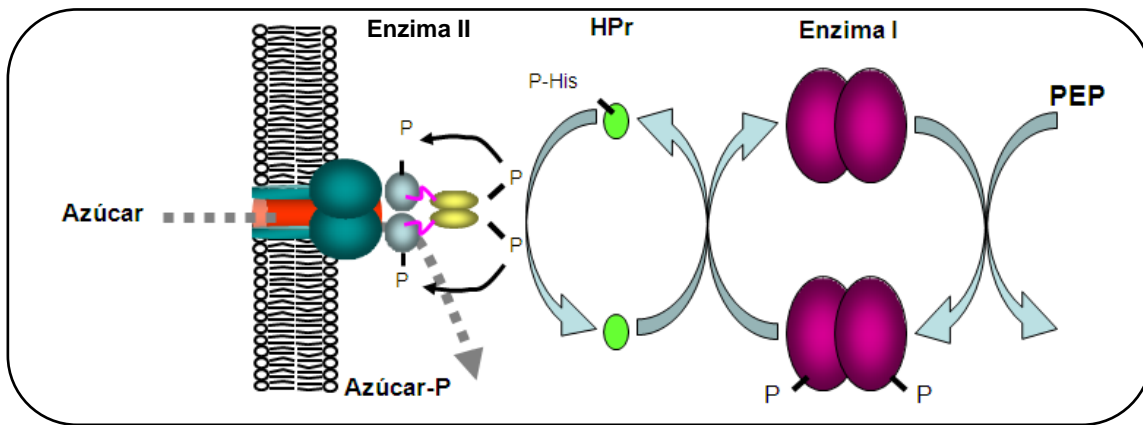


Fig. 1.15. Esquema del sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS). PEP, fosfoenolpiruvato.

1.4.2.4. *Lactobacillus casei*

L. casei es el microorganismo objeto del presente estudio. Es una bacteria láctica heterofermentativa facultativa, metabólica y fisiológicamente versátil, aislada de numerosos nichos ambientales como leche cruda o fermentada (sobre todo queso), carne, materia vegetal y los tractos reproductivos y gastrointestinales de animales y humanos.

Las diversas aplicaciones de esta especie en la industria alimentaria incluyen su uso como cultivo iniciador productor de ácido que contribuye a la conservación del alimento, favoreciendo además el desarrollo de las características organolépticas deseadas, o acelerando la maduración. Algunas cepas son empleadas biotecnológicamente para producir ácido láctico por fermentación de diversos substratos naturales. La aplicación en alimentos y biotecnología hace de esta especie objeto de numerosos estudios fisiológicos y genéticos, entre los que se incluyen varios proyectos de secuenciación de cepas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>). Además algunas cepas han sido caracterizadas como probióticos y frecuentemente se incluyen en la formulación de productos para consumo humano (ej.: Yakult® o Actimel®).

L. casei BL23 es la cepa modelo utilizada en este estudio. Su origen es desconocido (Acedo-Felix and Perez-Martinez, 2003), sin embargo su genoma ha sido secuenciado (Maze *et al.*, 2010) y ha sido utilizada como modelo por diversos laboratorios en estudios genéticos y fisiológicos (Alcantara and Zúñiga, 2012; Bourand *et al.*, 2013; Landete *et al.*, 2010; Muñoz-Provencio *et al.*, 2010; Palomino *et al.*, 2013; Rochat *et al.*, 2007; Watterlot *et al.*, 2010).

1.4.3. Probióticos

Los probióticos son definidos como “microorganismos vivos, que administrados en la cantidad suficiente, confieren un beneficio en la salud del hospedador” (Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization, 2006).

La fermentación de distintos productos como la leche, vegetales y carnes ha sido utilizada por miles de años en distintas culturas para prevenir la putrefacción de los alimentos, aún cuando estas desconocían la existencia de los microorganismos. La relación entre lactobacilli y la salud humana fue propuesta por primera vez por Metchnikoff en el año 1908 (Gordon, 2008) en su libro “The prolongation of life: optimistic studies” en donde dijo que la ingesta de yogurt con lactobacilli resultaba en una reducción de bacterias productoras de toxinas en el intestino, lo cual se asociaba a una mayor longevidad del hospedador. Del mismo modo, Tissier recomendaba la administración de bifidobacterias a infantes con diarrea, ya que estas podían reemplazar a las bacterias causantes de la enfermedad (Tissier, 1907). Por su parte, Shirota aisló la cepa *L. casei* Shirota y comenzó a comercializarla en el producto Yakult® en el año 1935. Estos fueron los primeros estudios que reconocieron las propiedades probióticas de algunas cepas de bacterias ácido lácticas.

La mayoría de probióticos corresponden a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, sin embargo no son los únicos. Por ejemplo, en el año 1917, Alfred Nissle aisló una cepa no patógena de *E. coli* de las heces de un soldado de la primera guerra mundial que no desarrolló enterocolitis durante un brote de shigellosis. Esta cepa es considerada probiótico en la actualidad. Del mismo modo existen probióticos que pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* y hasta algunas levaduras del género *Saccharomyces* (de Vrese and Schrezenmeir, 2008; Kanmani *et al.*, 2013).

En la actualidad hay muchas líneas de investigación enfocadas en utilizar la información disponible sobre el microbioma humano para la detección temprana de enfermedades crónicas, para desarrollar la llamada medicina personalizada y para el desarrollo de alimentos funcionales (Clarke *et al.*, 2012; de Vrese and Schrezenmeir, 2008; Kanmani *et al.*, 2013; Mäkinen *et al.*, 2012; Nagpal *et al.*, 2012; Robles Alonso and Guarner, 2013; Sanders *et al.*, 2013). Mantener un correcto equilibrio de la microbiota es necesario para mantener la homeostasis en un individuo sano. La disbiosis

intestinal se produce cuando hay un desequilibrio en la microbiota intestinal que permite el crecimiento de patógenos oportunistas derivando en la enfermedad. La disbiosis ha sido relacionada con obesidad, diabetes y enfermedades inflamatorias intestinales (IBD), como la enfermedad de Crohn's y la colitis ulcerosa (Martin *et al.*, 2013).

Según lo revisado en (Hammes and Hertel, 2006), incluso sin una colonización permanente del tracto gastrointestinal humano, lactobacilli pueden beneficiar la salud de los consumidores de diferentes formas: A) Los productos lácteos que contienen bacterias lácticas son más tolerados por personas con intolerancia a la lactosa, ya que las β -galactosidasas bacterianas contribuyen a hidrolizar la lactosa en el intestino delgado (Fernandes and Chandan, 1992; Saavedra, 2001). B) Productos que contienen lactobacilli han demostrado ser efectivos en el tratamiento de la diarrea causada por diferentes agentes (Fernandes *et al.*, 1992; Saavedra, 2001). C) Algunos lactobacilli pueden generar efectos en el sistema inmune del hospedador, como por ejemplo modulando la expresión de citoquinas, estimulando la fagocitosis por los leucocitos de sangre periférica, e incrementando el nivel de IgA e IgM (Haller *et al.*, 2000; Schiffrin *et al.*, 1995; von Schillde *et al.*, 2012). D) Algunos lactobacilli también son capaces de reducir los niveles de enzimas pro carcinogénicas en las heces, y tienen el potencial de unir y degradar carcinógenos (Fernandes and Chandan, 1992; Hirayama and Rafter, 1999). E) Se han obtenido resultados alentadores en el uso de probióticos en IBD, por ejemplo, se demostró que algunos lactobacilli reducen la inflamación de la mucosa y estimulan la función barrera de la mucosa en un modelo murino knock-out de IL10 (Madsen *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 2002). Por otra parte, el producto probiótico VSL-3 (mezcla de cepas de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, and *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, bifidobacteria and *Streptococcus thermophilus*) se ha mostrado eficiente en mantener la remisión de pacientes humanos que han sufrido pouchitis crónica y colitis ulcerosa (Gionchetti *et al.*, 2000; Tursi *et al.*, 2010).

Se han descrito múltiples efectos beneficiosos para distintas cepas de la especie *L. casei*. Una de las más estudiadas es la cepa *L. casei* Shirota (LcS), la cual puede sobrevivir en el tracto intestinal y restaurar el equilibrio de la microbiota (Matsumoto *et al.*, 2010). Entre los efectos que se le atribuyen se encuentran la capacidad de recobrar la actividad de células Natural Killer (NK) en personas con baja actividad NK (Nanno *et al.*, 2011), la reducción de enfermedades infecciosas en el tracto respiratorio superior

(Gleeson *et al.*, 2011; Shida *et al.*, 2015), el efecto anti obesidad en modelos murinos con dietas altas en grasas (Karimi *et al.*, 2015), reducción de los síntomas de personas con síndrome de intestino irritable (Thijssen *et al.*, 2016), y disminución de los síntomas asociados al estrés (Takada *et al.*, 2016), entre otros. Respecto a efectos beneficiosos atribuidos a otras cepas de *L. casei* es de destacar la reducción de enfermedades infecciosas comunes en niños de la cepa *L. casei* DN-114 001, efectos antivirales de *L. casei* CMPUJ 415 (Olaya Galan *et al.*, 2016) y efectos antitumorales de *L. casei* YIT 9018 (Kato *et al.*, 1994) y *L. casei* CRL 431 (Aragon *et al.*, 2014, 2015).

Para la cepa *L. casei* BL23 se han demostrado efectos antiinflamatorios después de la administración oral en ratones modelos de enfermedades inflamatorias intestinales (IBD) (Foligne *et al.*, 2007; Rochat *et al.*, 2007). También se ha demostrado que esta cepa es capaz de adherirse *ex vivo* a mucosas colónicas humanas (Munoz-Provencio *et al.*, 2010), y que junto con *L. plantarum* 299v restauran la homeostasis y reducen las señalizaciones que se producen durante la activación de linfocitos T en un modelo *ex vivo* de inflamación colónica (Bauerl *et al.*, 2013). Además, un estudio reciente ha mostrado que *L. casei* BL23 es capaz de reducir el cáncer colorrectal inducido por 1,2-dimetilhidracina (DMH) mediante la regulación de las poblaciones de linfocitos T_{reg} y linfocitos Th17 (Lenoir *et al.*, 2016).

2. Objetivos



2. Objetivos

2.1. Objetivo general

A los oligosacáridos de la leche humana (OLH) se les ha atribuido funciones protectoras y fisiológicas importantes para los niños, que incluyen una actividad prebiótica, esto es la estimulación del crecimiento de bacterias beneficiosas en el colon, y una actividad inmunomoduladora. Por un lado, a diferencia del género *Bifidobacterium*, que es capaz de fermentar OLH, para las especies del género *Lactobacillus* no hay información acerca del metabolismo de estos carbohidratos. Por otro lado, para demostrar la función biológica y para las aplicaciones potenciales de los OLH se requieren cantidades suficientes de estos estructuralmente definidos. Las dificultades encontradas para su extracción natural y síntesis química, plantea la necesidad de desarrollar aproximaciones enzimáticas. Con estos antecedentes en la presente Tesis Doctoral se propone evaluar la capacidad de especies del género *Lactobacillus*, que tiene muchas cepas con reconocidas propiedades probióticas, de metabolizar OLH específicos y determinar sus rutas metabólicas. Esto permitirá entender mejor la posible función de los OLH en la colonización por estas especies del tracto gastrointestinal de los niños, e identificar glicosidasas para mediante su actividad de transglicosidación sintetizar oligosacáridos. Para alcanzar este objetivo general se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

2.2. Objetivos específicos

1. Identificación, y análisis molecular y funcional de los genes y proteínas correspondientes responsables de la utilización de la lacto-N-biosa (LNB) y galacto-N-biosa (GNB) en la especie *Lactobacillus casei* dirigido a determinar sus rutas metabólicas.
2. Análisis molecular y funcional de los genes *bnaG* y *manA*, y sus correspondientes proteínas presentes en *L. casei* dirigido a determinar su función en el metabolismo de carbohidratos.

3. Identificación, análisis molecular y funcional de los genes y proteínas correspondientes responsables de la utilización de la N-acetillactosamina (LacNAc) en la especie *L. casei* dirigido a determinar su ruta metabólica.
4. Síntesis de oligosacáridos (LNB y GNB) por medio de la actividad de transglicosidación de la glicosidasa GnbG de *L. casei*. Construcción de variantes de esta enzima por mutagénesis dirigida para mejorar la relación de la síntesis frente a la hidrólisis.
5. Evaluación *in vitro* de las propiedades potenciales prebióticas de los disacáridos sintetizados en el objetivo 4.
6. Evaluación *in vitro* del potencial inmunomodulador de los disacáridos sintetizados en el objetivo 4 y de disacáridos fucosil-N-acetilglucosamina.

3. Materiales y métodos



3.1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas de *E. coli* utilizadas a lo largo de este trabajo derivan de la cepa *E. coli* K-12, y las cepas de *L. casei* derivan de la cepa *L. casei* BL23, ambas se detallan en la Tabla 3.1. Los plásmidos y oligonucleótidos utilizados se detallan en las tablas 3.2 y 3.3, respectivamente. Las cepas se conservaron a -80°C como suspensiones bacterianas en glicerol al 20%. El plásmido pRV300 (Leloup *et al.*, 1997), utilizado para la inactivación insercional de genes en *L. casei*, fue mantenido y amplificado en *E. coli* DH10B. El plásmido pQE-80 fue adquirido de Qiagen.

3.2. Medios de cultivo y condiciones de cultivo

3.2.1. Medio LB (Luria-Bertani) y MRS (Man-Rogosa-Sharpe). Para el mantenimiento rutinario de las cepas de *E. coli* y durante la construcción de los plásmidos utilizados para la generación de mutantes, se utilizó medio LB (Oxoid) (extracto de levadura 5 g l^{-1} ; triptona 10 g l^{-1} ; y NaCl 5 g l^{-1}), o medio LB sólido (conteniendo agar 1,5%). Para el mantenimiento rutinario de las cepas de *L. casei* se utilizó medio MRS (Difco) (extracto de levadura 5 g l^{-1} ; extracto de carne 10 g l^{-1} ; peptona 10 g l^{-1} ; Dextrosa 20 g l^{-1} ; Polisorbato 80 g l^{-1} ; Citrato de amonio 2 g l^{-1} ; Acetato de sodio 5 g l^{-1} ; Sulfato de magnesio $0,1\text{ g l}^{-1}$; Sulfato de manganeso $0,05\text{ g l}^{-1}$ y fosfato dipotásico 2 g l^{-1}), o medio MRS sólido (conteniendo agar 1,5%).

3.2.2. Medio MRS basal. Los cultivos utilizados para determinar la utilización o no de oligosacáridos en las cepas de *L. casei* y para la extracción de RNA se desarrollaron en medio MRS basal (extracto de levadura 4 g l^{-1} ; peptona 10 g l^{-1} ; Polisorbato 80 g l^{-1} ; Citrato de triamonio 2 g l^{-1} ; Acetato de sodio 5 g l^{-1} ; Sulfato de magnesio $0,2\text{ g l}^{-1}$ y Sulfato de manganeso $0,05\text{ g l}^{-1}$) suplementado con 4 mM del azúcar correspondiente.

3.2.3. Antibióticos y aditivos. Los antibióticos utilizados y sus concentraciones finales fueron: Ampicilina (Ap), $100\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$; kanamicina (Km), $50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ y eritromicina (Erm), $5\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$. En todos los casos, las soluciones de antibióticos, y los distintos azúcares utilizados se esterilizaron por filtración (membrana de acetato de celulosa de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ de poro), y se agregaron a las concentraciones requeridas después de autoclavar los restantes componentes del medio (121°C , 1 atm , 15 min).

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

Cepa	Características relevantes ^a	Fuente o referencia
<i>E. coli</i>		
DH10B	<i>F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galK rpsL(StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen (Paisley, UK)
BE50	Cepa utilizada para la expresión heteróloga de proteínas, BL21 (DE3) pREP4 GroES/GroEL, Km ^r	(Amrein <i>et al.</i> , 1995)
GM119	<i>F-supE44, lacY1, galK2, galT22, metB1, dcm-6, dam-3, tsx-78 λ -</i>	(Arraj and Marinus, 1983)
PE155	DH10β portando pQEgnbR	Este trabajo
PE157	DH10β portando pQEgnbE	Este trabajo
PE158	BE50 portando pQEgnbF	Este trabajo
PE159	BE50 portando pQEgnbG	Este trabajo
PE168	BE50 portando pQEbnaG	Este trabajo
PE169	BE50 portando pQEmanA	Este trabajo
Gon31	BE50 portando pQEgnbG:mutend	Este trabajo
Gon48	DH10β portando pQElacG	Este trabajo
<i>L. casei</i>		
BL23	Silvestre	CECT 5275
BL126	BL23 $\Delta ptsI$	(Monedero <i>et al.</i> , 1997)
BL153	BL23 $\Delta lacE$	(Gosalbes <i>et al.</i> , 1999)
BL155	BL23 $\Delta lacF$	(Gosalbes <i>et al.</i> , 1999)
BL195	BL23 $\Delta lacT$	(Gosalbes <i>et al.</i> , 2000)
BL380	BL23 $\Delta bnaG$ (mutación en el sitio SphI)	Este trabajo
BL381	BL23 $\Delta manA$ (mutación en el sitio XagI)	Este trabajo
BL382	BL23 $\Delta gnbR$ (mutación en el sitio SphI)	Este trabajo
BL383	BL23 $\Delta gnbF$ (mutación en el sitio BclI)	Este trabajo
BL384	BL23 $\Delta gnbG$ (mutación en el sitio NdeI)	Este trabajo
BL385	BL23 $\Delta gnbC::pRV300Erm^R$	Este trabajo
BL388	BL23 $\Delta nagA::pRV300Erm^R$	Este trabajo
BL389	BL23 $\Delta gnbF nagA::pRV300Erm^R$	Este trabajo
BL391	BL23 $\Delta glk::pRV300Erm^R$	Este trabajo
BL392	BL23 $\Delta sugK::pRV300Erm^R$	Este trabajo
BL393	BL23 $\Delta lacAB$ (Delección de 204pb en el extremo 3' de <i>lacA</i> y de 339pb en el extremo 5' de <i>lacB</i>)	Este trabajo
BL397	BL23 $\Delta gnbE$ (Delección de 266pb en el extremo 5' de <i>gnbE</i> y desplazamiento del marco de lectura en el segundo sitio AsuII)	Este trabajo
BL400	BL23 $\Delta lacG$ (mutación en el sitio SphI)	Este trabajo

^a Ap, ampicilina; Erm, eritromicina; Km, kanamicina; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo.

Tabla 3.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pRV300	Vector suicida Amp ^r , y Erm ^r de pAMb1 MCS flanqueado por promotores T7 y T3	Leloup <i>et al.</i> (1997)
pRV1bnaG	pRV300 con fragmento interno de <i>bnaG</i>	Este trabajo
pRV1manA	pRV300 con fragmento interno de <i>manA</i>	Este trabajo
pRV1gnbR	pRV300 con fragmento interno de <i>gnbR</i>	Este trabajo
pRV1gnbF	pRV300 c/ fragmento interno de <i>gnbF</i>	Este trabajo
pRV1gnbG	pRV300 c/ fragmento interno de <i>gnbG</i>	Este trabajo
pRV1gnbC	pRV300 c/ fragmento interno de <i>gnbC</i>	Este trabajo
pRVnagA	pRV300 c/ fragmento interno de <i>nagA</i>	Este trabajo
pRVglk	pRV300 c/ fragmento interno de <i>glk</i>	Este trabajo
pRVsugK	pRV300 c/ fragmento interno de <i>sugK</i>	Este trabajo
pRV1lacAB	pRV300 c/ fragmento interno de <i>lacA</i> y <i>lacB</i>	Este trabajo
pRV1gnbE	pRV300 c/ fragmento interno de <i>gnbE</i>	Este trabajo
pRV1lacG	pRV300 c/ fragmento interno de <i>lacG</i>	Este trabajo
pRVbnaG	pRV300 c/ fragmento interno de <i>bnaG</i> mutado	Este trabajo
pRVmanA	pRV300 c/ fragmento interno de <i>manA</i> mutado	Este trabajo
pRVgnbR	pRV300 c/ fragmento interno de <i>gnbR</i> mutado	Este trabajo
pRVgnbF	pRV300 c/ fragmento interno de <i>gnbF</i> mutado	Este trabajo
pRVgnbG	pRV300 c/ fragmento interno de <i>gnbG</i> mutado	Este trabajo
pRVgnbE	pRV300 c/ fragmento interno de <i>gnbE</i> mutado	Este trabajo
pRVlacG	pRV300 c/ fragmento interno de <i>lacG</i> mutado	Este trabajo
pRVlacAB	pRV300 c/ fragmento interno de <i>lacA</i> y <i>lacB</i> mutado	Este trabajo
pQE-80	Vector de expresión utilizado para la producción de proteínas recombinantes, <i>lac</i> repressor, oriColE1, Amp ^r	Qiagen
pQEbnaG	Vector de expresión con la región codificante de <i>bnaG</i>	Este trabajo
pQEmanA	Vector de expresión con la región codificante de <i>manA</i>	Este trabajo
pQEgnbR	Vector de expresión con la región codificante de <i>gnbR</i>	Este trabajo
pQEgnbE	Vector de expresión con la región codificante de <i>gnbE</i>	Este trabajo
pQEgnbF	Vector de expresión con la región codificante de <i>gnbF</i>	Este trabajo
pQEgnbGMutEnd	Vector de expresión con la región codificante de <i>gnbG</i> sin los últimos tres ácidos glutámicos	Este trabajo
pQEgnbG	Vector de expresión con la región codificante de <i>gnbG</i>	Este trabajo
pQElacG	Vector de expresión con la región codificante de <i>lacG</i>	Este trabajo

3.2.4. Cultivos para la extracción de RNA y para la determinación del consumo de oligosacáridos de las distintas cepas. Las cepas de *L. casei* se cultivaron a 37°C sin agitación durante una noche en 10 ml de MRS basal sin azúcar. Estos fueron diluidos a una densidad óptica medida a 550 nm (OD₅₅₀) inicial de 0,1 en el mismo medio suplementado con los carbohidratos a una concentración final de 4 mM. Los cultivos se llevaron a cabo en un lector de microplaca POLARstar Omega (BMG Labtech, Offenburg, Germany), utilizando placas multipocillos con 100 µl de volumen final, a 37°C y con una agitación de 20 segundos previa a cada medición de OD para

evitar la sedimentación de la biomasa. Las mediciones de OD₅₅₀ se realizaron automáticamente cada 30 minutos durante 25 horas. Para la extracción de RNA las células se recogieron en la fase exponencial. Las tasas de crecimiento (μ) fueron calculadas utilizando el modelo de Gompertz (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU).

Tabla 3.3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia
LNBReg3	5'-TTA GAA CGT AAT GAG AAC GC-3'
LNBReg4	5'-TGC GGC CGT CAC CTG ATC-3'
LNB1Fow	5'-AGC TGC TGC TGA TAA CAC CC-3'
LNB1Rev	5'-TCG GCT GGG CGA ACT AAG-3'
LNB2Fow	5'-TTC ATA GTG TCA CGC AAG G-3'
LNB2Rev	5'-TGA ACG TCA TGG TGC CAT C-3'
LNB3Fow	5'-CAT TCA CAT TGT TTC AGT CG-3'
LNB3Rev	5'-CGT TAG TTC AAG CAC CTT C-3'
LNB4Fow	5'-TCT TCC AGA AGC TTA TCA GG-3'
LNB4Rev	5'-GG AAT TCG CCA AGG ACG -3'
LNB5Fow	5'-TCG ATC GAT CAT GAG TTT ATG-3'
LNB5Rev	5'-TGC CTC ATC GCT GGC TTG-3'
LNBIICFow	5'-GGG CTG CAG GAA TTC GAT ATC CAC ACA GTT GAT GGT TCT TG-3'
LNBIICRev	5'-GGT ATC GAT AAG CTT GAT ATC AGC TAC CCC AGC AAC TGC-3'
lacAfor	5'-GCT AGC CCC GAA GAA GGC-3'
lacBrev	5'-AAA GCA GCA GGC CAG CTT G-3'
lacGfor	5'-CAA GGA AGA CGG TAA AGG-3'
lacGrev	5'-CCA ACG GAT AGT CAT TAT G-3'
nagAfor	5'-CTC TTA CCT TCT GGC ATG-3'
nagArev	5'-ATG ACG CAG TCA ACT GAG-3'
VerifnagA	5'-TGT GCT TGC ATC AGA TCC-3'
18750For	5'-GCC AAG CCA AGA AAG TAG-3'
18750Rev	5'-TTG TCG GTA TCG GTA TGG-3'
Verif18750	5'-ATT CTT GCG TAA ACG CCG-3'
29280For	5'-TGC CGC CGC CAA TGA TG-3'
29280Rev	5'-GGT ATC GGG TTG GCT TTG-3'
Verif29280	5'-AGG ACA TTT TCT TCG ATC G-3'
pRV300For	5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'
pRV300Rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
2860 BamHIFW	5'-TTT TGG ATC CGC TGA TAA CAC CTT GAA AAG CG-3'
2860 HindIIIRV	5'-TTT TAA GCT TTT TAC CGG TCT GGA TTC ACA ATG G-3'
2870 BamHIFW	5'-TTT TGG ATC CTT GAC AGA ACC ATT ATT TTT AAA ACC-3'
2870 HindIIIRV	5'-TTT TAA GCT TTT ATG CGT CTA CCC CTG GAG TAG-3'
2880 BamHIFW	5'-TTT TGG ATC CAT GGA AAA GGT TCC GTT GAC G-3'
2880 HindIIIRV	5'-TTT TAA GCT TCT AGT GAT TAA CGT GAT GTA CGT G-3'
2890 BamHIFW	5'-TTT TGG ATC CTT GTT CGA AAA AAC AAC TGA AG-3'
2890 PstIRV	5'-TTT TCT GCAGCT ATT CCT TAC CAG CGT AAT C-3'
2900 BamHIFW	5'-TTT TGG ATC CAT GAG TTA CTA CAT TCA CGC TG -3'
2900 PstIRV	5'-TTT TCT GCA GTC ATG CTT CAG CTT GAT AGC C-3'
2910 BamHIFW	5'-TTT TGG ATC CAT GAC GAC CTT TTC GAT CGA TC-3'
2910 HindIIIRV	5'-TTT TAA GCT TTT ATT CCT CCT CTG TGT TCA GTT C-3'
2910 HindIIIRV	5'-TTT AAG CTT TTA TGT GTT CAG TTC CTT AAA TAT TGG G-3'
MutEnd	
7280 NcoIFW	5'-TTT TCC ATG GGT AAA CAG CTA CCT CAA G-3'
7280 XhoIRV	5'-TTT TCT CGA GAT CCG GAA TGA TGT GGG-3'
pQE-80For	5'- CCC GAA AAG TGC CAC CTG-3'
pQE-80Rev	5'- GTT CTG AGG TCA TTA CTG G-3'
qPCR2860for	5'-GTC GAT ACT GGC GGC TGG GC-3'
qPCR2860rev	5'-TGG CCA TCG CCG CTA GTC G-3'
qPCR2870for	5'-TGC TTA TGC TGC GGC CCA CG-3'
qPCR2870rev	5'-TGC TCC CAA TCG CCG GCT TC-3'

qPCR2880for	5'-CGA GTT GCA CCA GCG TCA GC-3'
qPCR2880rev	5'-CGC GCG AGC CAC ACT CAA GG-3'
qPCR2890for	5'-TTG TGG CGC GTG AAG CCG AA-3'
qPCR2890rev	5'-TCA GGC GAG TTT CGC GGG TC-3'
qPCR2900for	5'-GAC GGC ACG GTG GTG GCT TT-3'
qPCR2900rev	5'-GCG ATG GCT CAA CGG GCT CA-3'
qPCR2910for	5'-CGG CGA TTG GCA AGC AGG GA-3'
qPCR2910rev	5'-CAA CGT TGG CCC CTT CCC CC-3'
qPCR2930for	5'-GGG GTC GGC ACA TTC GGT GG-3'
qPCR2930rev	5'-CTG GCT TCA TGC CGG GCG CTA-3'
qPCRlacTfor	5'-TTG TAA GGG GAC GTG GCA TC-3'
qPCRlacTrev	5'-TTG TCG GGA AGT CTC GTT CG-3'
qPCRlacEfor	5'-TTG GCC ATG AAC ACG ATG GA-3'
qPCRlacErev	5'-CCG AAA GTG CAT GGC ACA AA-3'
qPCRlacGfor	5'-AAG TCG AAG GAG CCA CCA AG-3'
qPCRlacGrev	5'-GAA CCG CCC CTG TTT ATC CA-3'
qPCRlacFfor	5'-GGT TTT GCA CTT GTG GCG TA-3'
qPCRlacFrev	5'-CTG TTG GGC CTT CTC AAC CA-3'
Pre2860for	5'-GCT GCT AGT CGC ATG CTG-3'
Pre2860rev	5'-AAC TTC AAC CTC CTT TTG TGG-3'
Pre2880Afor	5'-GTT GCG GAT CAT CAG GTG-3'
Pre2880Arev	5'-AGA CAT TTC CAT AAT TAG ACC-3'
Pre2880Bfor	5'-GTC TGT TAC CGC TGA ATT C-3'
Pre2880Brev	5'-CAT CTC ACC TCC ACG TGG-3'

3.3. Manipulaciones genéticas

3.3.1. Aislamiento de DNA. La purificación de DNA cromosómico de *L. casei* se llevó a cabo según se ha descrito previamente (Posno *et al.*, 1991).

La purificación de DNA plasmídico de *E. coli* se realizó según el protocolo descrito previamente (Birnboim and Doly, 1979). Brevemente, el sedimento celular proveniente de 1,5 ml de cultivo (crecido a saturación en LB adicionado con los antibióticos adecuados) se resuspendió en 150 μ l de una solución de Tris·HCl 25 mM (pH = 8,0); EDTA 10 mM; glucosa 50 mM; y RNAsa A 100 μ g ml⁻¹. Después se agregaron 150 μ l de solución de lisis, conteniendo NaOH 200 mM y SDS 1%, mezclando el tubo por inversión hasta que la suspensión se volvió translúcida. Después de incubar 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 150 μ l de solución de CH₃COOK 3 M (pH = 5,5), se mezcló por inversión, y los tubos se colocaron en hielo durante 10 min. La suspensión se centrifugó a 15.000 g durante 10 min, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se agregaron 900 μ l de etanol absoluto previamente enfriado para precipitar el DNA. La solución resultante se centrifugó a velocidad máxima (15.000 g) durante 20 min para sedimentar el DNA. Se procedió a lavar el pellet con etanol al 70% y tras este lavado se descartó el sobrenadante, y tras secar el sedimento de DNA durante 10 min a temperatura ambiente, se resuspendió en 20 μ l de H₂O deionizada estéril. Para preparaciones de DNA plasmídico de alta pureza, se utilizó el *kit* comercial *illustra plasmidPrep Mini Spin* (GE Healthcare, UK).

3.3.2. Transformación con DNA plasmídico. *E. coli* fue transformada por electroporación con un Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories) siguiendo las recomendaciones del fabricante. *L. casei* fue transformado según se ha descrito previamente (Posno *et al.* 1991).

3.3.3. Reacciones de amplificación de DNA por PCR. Las reacciones de PCR para la obtención de fragmentos de inserción durante la construcción de mutantes y las utilizadas para analizar por secuenciación las mutantes siguieron el mismo protocolo general (Link *et al.*, 1997; Sambrook and Russell., 2001). Las mezclas de reacción de PCR contienen Tris·HCl 10 mM pH 9,0; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,25 mM; 0,1 mM de cada deoxinucleósido trifosfato; 10 µM de cada oligonucleótido cebador; 100 ng de DNA y 1 U de Expand High Fidelity System (Roche). El DNA en la reacción de PCR fue desnaturalizado a 94°C (5 min), y la amplificación se llevó a cabo en 30 ciclos que consistieron de un paso inicial de desnaturalización (30 s a 94°C), unión de los oligonucleótidos a las secuencias homólogas (30 s a 50°C), y extensión (tiempo variable según el tamaño del fragmento de DNA a amplificar a 72°C), seguidos de una extensión final de 5 min a 72°C. Los oligonucleótidos utilizados durante la construcción de mutantes y para la comprobación de las mismas se detallan en el texto en las secciones correspondientes.

3.3.4. Electroforesis en geles de agarosa. Los geles de agarosa para análisis y purificación de fragmentos de DNA fueron preparados de acuerdo a Sambrook y Russell (2001). La concentración de agarosa se varió entre 0,8% y 1%, según el tamaño del fragmento a analizar. Las electroforesis se realizaron utilizando solución TBE (Tris-borate 90 mM, EDTA 2 mM) a 100-120 V en cubetas de electroforesis Ecogen (Barcelona, España). Como marcadores de peso molecular se utilizó DNA del bacteriófago λ digerido con *Pst*I (Fermentas, Canada). Los geles contenían bromuro de etidio 0,01 µl ml⁻¹ y se visualizaron en un trans-iluminador de luz ultravioleta (UV).

3.3.5. Ensayos de retardo en gel. La región de DNA por encima del gen *gmbR* fue amplificada mediante PCR utilizando las siguientes combinaciones de cebadores, Pre2880Afor y Pre2880Arev, Pre2880Bfor y Pre2880Brev y se obtuvieron dos fragmentos de 192pb y 172pb, respectivamente. Ambos fragmentos (250ng)

separadamente fueron incubados 10 min a 37°C en tampón de interacción (20 mM Tris-HCl pH 7, 5 mM MgCl₂, 40 mM KCl y 10% glicerol), después se añadieron diferentes concentraciones de la proteína purificada 6XHis-RegLNB (ver más adelante) en un volumen final de 25 µl y se incubó nuevamente durante 30 min a 37°C.

Los complejos DNA-proteína fueron separados en un gel nativo de poliacrilamida al 6%, utilizando Tris-EDTA (pH 7,5) como tampón de electroforesis. Los fragmentos de DNA fueron observados tras tinción con una solución de bromuro de etidio 0,01 µl ml⁻¹ y se visualizaron en un trans-iluminador UV.

3.3.6. Ensayos de footprinting. Para realizar el ensayo de footprinting se sintetizaron por PCR dos sondas de DNA marcadas con [γ -³²P]. Se utilizó el fragmento de 172 pb descrito en el apartado de “ensayos de retardo en gel” como molde y los oligonucleótidos Pre2880Bfor o Pre2880Brev, que previamente fueron marcados con [γ -³²P] dATP utilizando la enzima Optikinase (Affymetrix), junto con el segundo oligonucleótido correspondiente Pre2880Bfor o Pre2880Brev sin marcar. Las reacciones de interacción se llevaron a cabo en tampón de interacción junto con 30000 dpm de fragmentos de PCR marcados, 0,5 µg de DNA de esperma de arenque y 20 µg de 6xHis-GnbR en un volumen final de 25 µl. Después de incubar por 30 minutos a 37°C, el DNA se digirió con 0,04 U de DNasa I (Roche) en el tampón apropiado (10 mM MgCl₂, 5mM CaCl₂) durante 1 minuto a temperatura ambiente. La reacción fue detenida mediante el agregado de tampón de carga 2X y calentando a 90°C por 3 minutos. Los fragmentos de DNA fueron separados en un gel de secuenciación de poliacrilamida al 7% con urea en tampón 0,5x TBE. Como patrón de referencia se utilizó una reacción de secuenciación generada por el método A+G Maxam and Gilbert (Sambrook *et al.*, 1989) con los mismos oligonucleótidos marcados. Después de la electroforesis el gel se transfirió a un papel Watman y se secó a vacío. Tras exponer durante una noche una pantalla de autoradiografía se reveló por el sistema para muestras fluorescentes y radioactivas FLA-5000 (Fujifilm).

3.3.7. Ensayos de southernblot. El DNA cromosómico fue aislado de las distintas cepas de *Lactobacillus* utilizando el kit de extracción de DNA genómico REALPURE “SSS” (Durviz, Paterna, España). La sonda de DNA fue sintetizada por PCR utilizando como molde DNA cromosómico de *L. casei* BL23, la mezcla de deoxinucleótidos trifosfato marcados con digoxigenina (PCR digoxigenin-labeling mix,

Roche), Taq DNA polimerasa (Expand High Fidelity PCR system, Roche, Manheim, Alemania) y los oligonucleótidos LNB5Fow y LNB5Rev. El DNA cromosómico de las distintas cepas fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*. Posteriormente fue separado en un gel de agarosa al 0,8% y transferido a una membrana de nylon mediante capilaridad (Sambrook *et al.* 1989). La hibridación, lavados y tinciones fueron realizadas según las recomendaciones de la casa comercial utilizando el sustrato quimioluminiscente CDP-Star (Roche) y se obtuvieron las imágenes con el analizador de imagen luminiscente LAS-1000 (Fujifilm)

3.3.8. Búsqueda bioinformática y diseño de oligonucleótidos cebadores. La búsqueda de genes, sitios de restricción, secuencias promotoras y/o reguladoras se realizó utilizando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; disponible a través del sitio de Internet del National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, EE.UU.). Los cebadores para reacciones de PCR se diseñaron con el programa DNAMAN 4.0 (Lynnon BioSoft).

3.3.9. Generación de mutantes derivados de *L. casei* BL23. Se obtuvieron fragmentos internos de los genes *gnbR*, *gnbE*, *gnbF*, *gnbG*, *gnbC*, *bnag*, *manA*, *lacG*, *nagA*, *glk*, *sugK* y *lacAB* mediante PCR, utilizando DNA cromosómico de *L. casei* como molde. En la Fig. 3.1. se muestra como ejemplo la inactivación de *gnbR*. El fragmento de *gnbR* se obtuvo con los oligonucleótidos LNBReg3 y LNBReg4; el de *gnbE* con los oligonucleótidos LNB3Fow y LNB3Rev; el de *gnbF* con los oligonucleótidos LNB4Fow y LNB4Rev; el de *gnbG* con los oligonucleótidos LNB5Fow y LNB5Rev; el de *gnbC* con los oligonucleótidos LNBIICFow y LNBIICRev; el de *bnag* con los oligonucleótidos LNB1Fow y LNB1Rev; el de *manA* con los oligonucleótidos LNB2Fow y LNB2Rev; el de *lacG* con los oligonucleótidos lacGfor y lacGrev; el de *nagA* con los oligonucleótidos nagAfor y nagArev; el de *glk* con los oligonucleótidos 18750for y 18750rev; el de *sugK* con los oligonucleótidos 29280for y 29280rev y el de *lacAB* con los oligonucleótidos lacAfor y lacBrev. Estos fragmentos de DNA fueron purificados y clonados en el vector integrativo pRV300 previamente digerido con *EcoRV*, dando lugar a los plásmidos pRV1gnbR, pRV1gnbE, pRV1gnbF, pRV1gnbG, pRV1gnbC, pRV1bnag, pRV1manA, pRV1lacG, pRVnagA, pRVglk, pRVsugK- y pRV1lacAB, respectivamente. Posteriormente estos plásmidos (con excepción de pRVgnbC, pRVnagA, pRVglk y pRVsugK) fueron digeridos por una

enzima de restricción concreta, SphI, AsuII, BclI, NdeI, SphI, XagI, SphI y NdeI, y tratados con el fragmento Klenow de la polimerasa (Roche), dando lugar a los plásmidos pRVgnbR, pRVgnbE, pRVgnbF, pRVgnbG, pRVbnaG, pRVmanA, pRVlacG y pRVlacAB, respectivamente. Cada uno de estos plásmidos se utilizó para transformar *L. casei* BL23 y se seleccionó un clon resistente a eritromicina de cada gen con el plásmido integrado.

La correcta ubicación de la integración cromosómica fue confirmada mediante PCR, utilizando para ello un oligonucleótido del plásmido y un oligonucleótido externo al gen inactivado. Un clon de cada transformación fue cultivado por 200 generaciones en ausencia de eritromicina y posteriormente se seleccionaron clones sensibles a eritromicina, en los cuales se había producido la segunda recombinación (Fig. 3.1). Para determinar cuáles de estos clones portaban el alelo en el cual se generó el desplazamiento del marco de lectura (habían perdido el sitio de restricción) se utilizó PCR y digestión enzimática. Finalmente cada mutante fue confirmado mediante secuenciación.

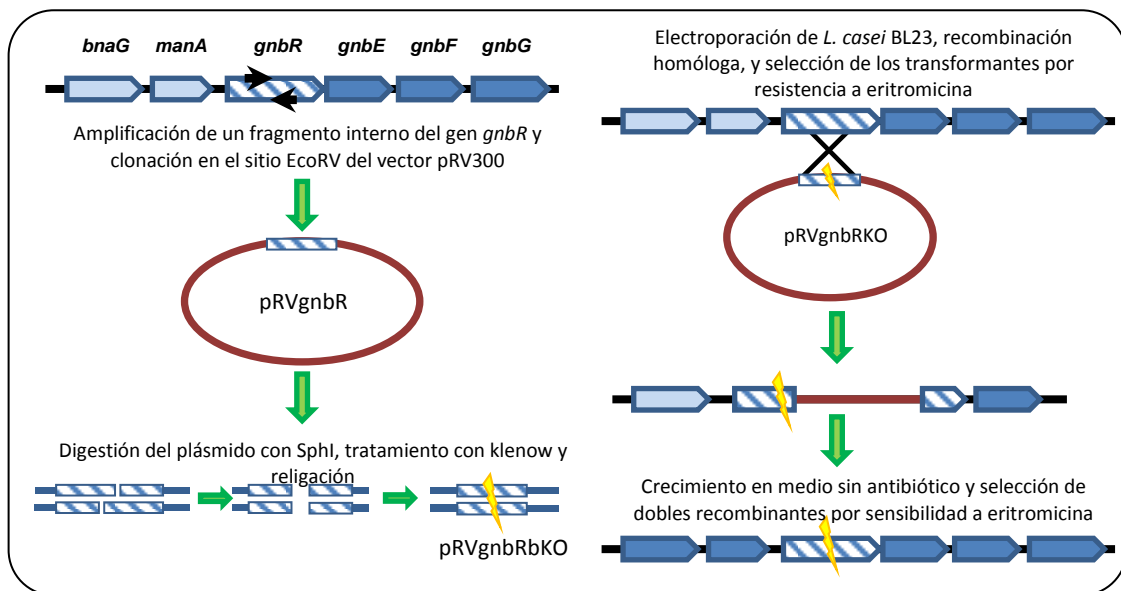


Fig. 3.1. Representación esquemática de la inactivación génica por desplazamiento del marco de lectura en *gnbR* en el cromosoma de *L. casei*. Se indica con flechas negras los oligonucleótidos LNBReg3 y LNBReg4, y con una flecha quebrada amarilla el desplazamiento de marco de lectura.

3.3.10. Secuenciación de DNA y análisis de secuencias. La secuenciación de fragmentos de DNA se realizó en el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia (Burjassot, Valencia, España). En todos los casos, los protocolos de secuenciación se basaron esencialmente en el método de interrupción de cadena por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). El análisis de las secuencias y alineamientos múltiples se llevó a cabo utilizando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; disponible a través del sitio de Internet del National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, EE.UU.).

3.3.11. Aislamiento de RNA, RT-PCR y PCR cuantitativa (RT-qPCR). El aislamiento de RNA de *L. casei* se realizó a partir de células cultivadas hasta una OD₅₅₀ de 0,5 en MRS basal suplementado con 4mM del azúcar correspondiente. Las células fueron recogidas por centrifugación, lavadas con 50mM EDTA a pH 8,0 y resuspendidas en 1ml de Trizol (Invitrogen, Life Technologies). Tras adicionar 1 gramo de esferas de cristal de 0,1 mm de diámetro las células fueron lisadas mecánicamente en un Mini-Beadbeater (Biospec Products, Bartlesville, OK). El RNA total fue aislado según el protocolo proporcionado por el fabricante del Trizol y la determinación de la concentración obtenida se realizó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, California, EE.UU). Cien nanogramos de RNA fueron tratados con DNAsa I, RNAsa free (Fermentas), y 50 ng del RNA tratado fueron retrotranscritos (RT) usando el kit Maxima First Strand cDNA (Fermentas) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El cDNA resultante fue utilizado para realizar PCR cuantitativa (qPCR) de los genes correspondientes utilizando un sistema LightCycler (Roche) y LC Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche). Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 3.4. La expresión relativa basada en la relación entre las condiciones probadas y la condición de referencia fue calculada con el software REST (Pfaffl *et al.*, 2002).

Tabla 3.4. Condiciones de amplificación de las reacciones de qPCR

Paso	Temperatura	Duración	Nº de ciclos
Pre-incubación	95°C	10 minutos	1
Amplificación	95°C	10 segundos	45
	55°C	20 segundos	
	72°C	20 segundos	
Curva de melting	95°C	15 segundos	1
	65°C	10 segundos	
	97°C	continuo	
Enfriamiento	40°C	30 segundos	1

3.4. Métodos analíticos

3.4.1. Determinación de azúcares residuales en el medio de cultivo y productos de hidrólisis enzimática y transglicosidación. La presencia residual de los distintos azúcares (N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina, galactosa, glucosa, manosa, lactosa, LNB, GNB, N-acetil-lactosamina, GlcNAc β 1-3Man, lacto-N-triosa y LNnT) se determinó en los sobrenadantes de cultivo, obtenidos por centrifugación durante 1 min a 15.000 g a 4°C. Los sobrenadantes se filtraron a través de membranas de 0,22 μ m de poro, y se guardaron a 4°C hasta el análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Los azúcares fueron detectados utilizando un equipo HPLC (Jasco PU-2080Plus, Japón) acoplado a un detector de índice de refracción (Jasco RI-2031Plus) con una columna de intercambio aniónico Rezex RCM-Monosacáridos (Phenomenex) según lo descrito previamente (Plaga *et al.*, 1989) con modificaciones. La columna se mantuvo a 80°C y las muestras se eluyeron de modo isocrático utilizando agua como fase móvil a un flujo de 0,6 ml min⁻¹. Los productos de las reacciones de transgalactosidación fueron determinados siguiendo el mismo protocolo, con excepción de la centrifugación inicial.

El sistema Dionex (Thermo Fisher Scientific), con una columna CarboPac PA100 y detector amperométrico de pulsos fue utilizado para analizar las reacciones enzimáticas de las glicosil-hidrolasas purificadas (GnbG, BnaG y LacG) con los distintos oligosacáridos naturales. Se utilizó un gradiente combinado de 100 a 300 mM NaOH y de 0 a 300 mM de ácido acético (100 mM NaOH por 2 minutos, de 100 a 300 mM NaOH en 3 minutos, 300 mM NaOH y de 0 a 300 mM ácido acético en 15 minutos) con un flujo de 1ml min⁻¹. Los oligo- y monosacáridos fueron confirmados por comparación con los tiempos de retención de los estándares correspondientes.

3.4.2. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Para confirmar la estructura de los azúcares LNB y GNB, producidos mediante transglicosidación, las muestras fueron liofilizadas y disueltas en 550 μ l de agua deuterada para ser analizadas mediante RMN. El espectro de RMN fue adquirido a 27°C utilizando un espectrómetro Bruker AvanceII 600Mhz, equipado con una criosonda TCI de 5mm. El espectro monodimensional (1D) de ^1H con presaturación y periodo de mezcla para supresión de agua, y línea base mejorada, fue adquirido con 256 transientes. Los experimentos ^1H - ^{13}C heteronucleares de coherencia cuántica única (HSQC) fueron adquiridos con 200 transientes sobre una anchura espectral de 3,5 (para ^1H) y 30ppm (para ^{13}C) y con 128 puntos en la dimensión indirecta. Los experimentos de correlación espectroscópica total (TOCSY) fueron adquiridos con 32 transientes sobre una anchura espectral de 3,5ppm en ambas dimensiones y 128 puntos en la dimensión indirecta. El espectro de RMN fue procesado con el programa MestReNova 8.1 (© 2013 Mestrelab Research S.L.).

3.5. Manipulación de proteínas

3.5.1. Clonación, expresión y purificación de 6XHis-GnbR, 6XHis-GnbE, 6XHis-GnbF, 6XHis-GnbG, 6XHis-GnbGMutEnd, 6XHis-BnaG, 6XHis-ManA y 6XHis-LacG. Las regiones codificantes de los genes *gnbR*, *gnbE*, *gnbF*, *gnbG*, *bnag*, *manA* y *lacG* fueron amplificadas por PCR utilizando DNA de *L. casei* BL23 como molde y los pares de cebadores: 2880BamHIFw / 2880HindIIIRv, 2890BamHIFw / 2890PstIRv, 2900BamHIFw / 2900HindIIIRv, 2910BamHIFw / 2910HindIIIRv, 2910BamHIFw / 2910HindIIIRvMutEnd, 2860BamHIFw / 2860HindIIIRv, 2870BamHIFw / 2870HindIIIRv y 7280NcoIFw / 7280XhoIRv, respectivamente, con la adición de sitios de restricción en los extremos 5' y 3' de las regiones codificantes. Los fragmentos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes, y clonadas en el vector de expresión pQE80 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Los plásmidos resultantes, pQEgnbR, pQEgnbE, pQEgnbF, pQEgnbG, pQEgnbGMutEnd, pQEbnaG, pQEmanA y pQElacG fueron utilizados para transformar *E. coli* DH10B, previa verificación de la correcta secuencia de los insertos por secuenciación de DNA. La expresión de proteínas a partir de pQEgnbF, pQEgnbG, pQEgnbGMutEnd, pQEbnaG y pQEmanA generó la formación de cuerpos de inclusión y dichas proteínas no pudieron obtenerse en buena cantidad de forma soluble. Esos

plásmidos fueron utilizados para transformar *E. coli* BE50, una cepa que contiene el plásmido pREPGroES/GroEL que codifica para las chaperonas GroES y GroEL de *E. coli*, mejorando la solubilidad de las proteínas recombinantes (Dale *et al.*, 1994). Un clon de cada uno, PE155 (pQEgNB), PE157 (pQEgNB), PE158 (pQEgNB) y PE159 (pQEgNB), Gon31 (pQEgNBGMutEnd), PE168 (pQEgNB), PE169 (pQEgNB) y Gon48 (pQEgNB) fue crecido en 0,5L de medio de cultivo Luria-Bertani con los antibióticos apropiados a 20°C y con agitación. Cuando los cultivos alcanzaron una OD₅₅₀ de 1.0, se añadió IPTG (1mM) y se incubó durante 5 horas. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 5.500 g y 4°C durante 15 minutos y resuspendidas en tampón de lisis (Tris·HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, NaSO₄ 50mM, DDT 0,5 mM y PMSF 1mM). Las suspensiones fueron tratadas con 1 mg ml⁻¹ de lisozima a temperatura ambiente por 30 minutos. La ruptura de las células se realizó por sonicación (Ultrasonic Homogenizer; Cole Parmer Instruments Co., Chicago, Illinois, EE.UU.). Se efectuaron 6 ciclos de sonicación de 20 s cada uno, con intervalos en baño de hielo entre cada ciclo de 40 s. Los restos celulares fueron eliminados mediante centrifugación a 12000 g por 20 minutos a 4°C. Los extractos clarificados fueron cargados en una columna Ni Sepharose 6 Fast Flow (HisTrap affinity columns, GE Healthcare) y las proteínas fueron purificadas utilizando un equipo FPLC Akta Prime (GE Healthcare). Después del lavado de las columnas con tampón A (Tris·HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, NaSO₄ 50mM) suplementado con 10 mM de imidazol, las proteínas fueron eluidas con un gradiente creciente de imidazol 10-500 mM. Las fracciones con las proteínas de interés fueron analizadas por geles SDS-PAGE, dializadas frente a Tris·HCl 100 mM, pH 7,5 con 20% de glicerol y congeladas a -80°C. La concentración final de proteínas fue determinada por la absorbancia medida a 280 nm utilizando un nanodrop (Thermo Fisher Scientific) y mediante el método de Bradford (Lowry *et al.*, 1951).

3.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida. Las electroforesis desnaturizantes en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) se realizaron en una unidad de electroforesis para proteínas vertical moniprotean tetra (10 cm × 10 cm × 1 mm; BioRad Labs.), esencialmente de acuerdo al protocolo descrito por (Laemmli, 1970). Se utilizó una concentración de acrilamida en el gel separador de 10% al 15% dependiendo del peso molecular de la proteína, mientras que la concentración en el gel

concentrador fue de 4,5%. El tampón de electroforesis contuvo Tris 25 mM; glicina 0,2 M; y SDS 3,5 mM. La electroforesis se desarrolló con voltaje constante (120 v).

3.5.3. Ensayo de actividad de las enzimas 6XHis-GnbG, 6XHis-GnbGMutEnd, 6XHis-BnaG y 6XHis-LacG. La actividad de 6XHis-GnbG, 6XHis-GnbGMutEnd, 6XHis-BnaG y 6XHis-LacG purificadas fue ensayada a 37°C utilizando diferentes 2/4-nitrofenil(NP)-azúcares a 5 mM en placas multiwell de 96 pocillos. La liberación de 2/4-NP fue medida siguiendo el cambio continuo en la absorbancia a 404 nm con un lector de microplacas POLARstar Omega (BMG Labtech, Offenburg, Alemania). Las mezclas de reacción (100 µl) con el sustrato en tampón Tris.HCl 100 mM, pH 7,0 fueron iniciadas por la adición de 1 µg de cada enzima purificada. El pH óptimo fue determinado con 5 mM 2-NP-β-D-galactopiranosido (GnbG), 2-NP-β-D-galactopiranosido-6-fosfato (LacG) o 4-NP-N-acetil-β-D-glucosaminido (BnaG) en tampón fosfato-citrato 100 mM (pH 3,0-7,0) y tampón glicina-NaOH 100 mM (pH 7,5-9,5). La temperatura óptima fue analizada en el rango de 20°C a 60°C en el pH óptimo. Los estudios cinéticos fueron realizados en tampón Tris.HCl 100 mM, pH 7 a 37°C con 2-NP-β-D-galactopiranosido (GnbG), 2-NP-β-D-galactopiranosido-6-fosfato (LacG) o 4-NP-N-acetil-β-D-glucosaminido (BnaG) en el rango entre 0,5 a 7,5 mM.

Para determinar la capacidad de estas enzimas de hidrolizar oligosacáridos naturales, varios sustratos fueron probados. Las reacciones (100 µl) fueron realizadas a 37°C durante 16 horas usando 4 mM de sustrato en tampón Tris HCl 100 mM, pH 7,0. Las reacciones fueron analizadas por HPLC como se describió anteriormente.

3.5.4. Ensayo de actividad de las enzimas 6XHis-GnbF (N-Acetilgalactosamina-6P deacetilasa) y 6XHis-GnbE (Galactosamina-6P deaminasa/isomerasa). La actividad de 6XHis-GnbF y 6XHis-GnbE purificadas fue determinada utilizando ambas enzimas en reacciones acopladas como las descritas previamente (Leyn *et al.*, 2012) con algunas modificaciones. El ensayo se basa en la liberación de amonio durante la conversión de galactosamina-6P por la actividad de GnbE. El amonio es acoplado a la oxidación de NADH a NAD⁺ por la glutamato hidrogenasa, y la desaparición de NADH fue medida siguiendo los cambios continuos en la absorbancia a 340 nm utilizando un lector de microplacas POLARstar Omega (BMG Labtech, Offenburg, Alemania). Las reacciones (200 µl) se realizaron a 37°C en tampón Tris HCl 100 mM, pH 7,5, con GalNAc-6P 2 mM, 20 mM MgCl₂, 1 mM α-

ketoglutarato, 0,3 mM NADH, 2 U de glutamato dehidrogenasa (Fluka), 1 μ g de GnbF y 0,5 μ g de GnbE. La actividad también fue ensayada con GlcNAc-6P 2 mM como sustrato. Como control se realizaron reacciones con cada una de las enzimas por separado.

3.5.5. Ensayo de actividad de la enzima 6XHis-ManA (Manosa-6P isomerasa). La actividad de 6XHis-ManA purificada fue ensayada como se ha descrito previamente (Gill *et al.* 1986) con algunas modificaciones. Las reacciones (100 μ l) se realizaron en tampón Tris HCl 50 mM, pH 8, con MgCl₂ 0,5 mM, NADP 1 mM, 0,5 U de fosfoglucosa isomerasa, 1 U de glucosa-6P dehidrogenasa y manosa-6P 3 mM. Las reacciones se iniciaron añadiendo 2 μ g de 6XHis-ManA. La actividad fue ensayada a 37°C en placas multiwell de 96 pocillos, y la formación de NADPH fue monitorizada mediante la medición continua del cambio en la absorbancia a 340 nm utilizando un lector de microplacas POLARstar Omega (BMG Labtech, Offenburg, Alemania). Estudios cinéticos se realizaron con manosa-6P a concentraciones del rango entre 1 y 10 mM. La actividad también fue ensayada utilizando fructosa-6P como sustrato.

3.5.6. Ensayo de actividad β -N-Acetilglucosaminidasa en células enteras y sobrenadantes de cultivo de *L. casei* BL23. Las cepas de *L. casei* fueron cultivadas ON a 37°C en condiciones estáticas en 10 ml de MRS de fermentación suplementado con 0,5% de glucosa o ribosa. Cuando los cultivos alcanzaron una OD₅₅₀ de 1,5 (glucosa) o 1,2 (ribosa), se recolectaron las células por centrifugación a 8000 g durante 10 minutos, y los sobrenadantes fueron sometidos posteriormente a ultracentrifugación a 100000 g durante 60 minutos para remover restos celulares. Los pellets fueron lavados dos veces con tampón fosfato salino (PBS) y resuspendidas en el mismo tampón a una OD₅₅₀ de 2. La actividad β -N-Acetilglucosaminidasa fue determinada a 37°C con 2,5 mM de *p*-NP-*N*-acetil- β -D-glucosaminido (*p*NPGlcNAc) en placas multiwell de 96 pocillos. La liberación del *p*-NP fue monitorizada mediante la medición continua del cambio en la absorbancia a 404 nm utilizando un lector de microplacas POLARstar Omega (BMG Labtech, Offenburg, Alemania). Las reacciones (100 μ l) conteniendo el sustrato en PBS 100 mM pH 6,5 fueron iniciadas añadiendo 75 μ l de suspensión celular o sobrenadantes de cultivo.

3.6. Síntesis y purificación de LNB y GNB

3.6.1. Reacciones de transgalactosidación. Las reacciones (200 μ l) de transgalactosidación con 6xHis-GnbG se realizaron en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, utilizando 40 mM de *o*NP- β -D-galactopiranosido (*o*-NPG) como sustrato donador, y 200 mM de GlcNAc o GalNAc como sustratos aceptores. Las mezclas se calentaron a 98°C para solubilizar completamente el *o*-NPG y después se enfriaron a la temperatura de reacción (42°C). Las reacciones se iniciaron añadiendo 10 U ml⁻¹ de GnbG (definiendo una unidad como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol de *o*NP en una hora). Las muestras fueron sacadas a distintos tiempos y calentadas inmediatamente a 100°C por tres minutos para detener la reacción.

Las reacciones (1 ml) de transgalactosidación destinadas a purificar los disacáridos fueron realizadas en las mismas condiciones, pero en este caso la reacción se detuvo a los 120 minutos.

Las reacciones utilizadas para comparar las actividades de 6xHis-GnbG y 6xHis-GnbGMutEnd se realizaron en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, utilizando 40 mM de *o*NP- β -D-galactopiranosido (*o*-NPG) como sustrato donador, y 200 mM de GlcNAc o GalNAc como sustratos aceptores. Las mezclas se calentaron a 98°C para solubilizar completamente el *o*-NPG y después se enfriaron a la temperatura de reacción (42°C). Las reacciones se iniciaron añadiendo 17 μ g de 6xHis-GnbG o 6xHis-GnbGMutEnd en un volumen de 500 μ l de reacción.

3.6.2. Purificación de LNB y GNB. Los productos de las reacciones de transgalactosidación fueron purificados por HPLC utilizando una columna preparativa RCM-Monosacáridos (Phenomenex, Torrance, CA, EEUU). La columna se mantuvo a 80°C y las muestras se eluyeron de modo isocrático utilizando agua como fase móvil a un flujo de 4,0 ml min⁻¹ y recolectando fracciones de 1ml. Las fracciones adecuadas se juntaron y se concentraron utilizando un rotavapor.

3.7. Ensayo del potencial prebiótico

3.7.1. Cultivo de las cepas. La lista de cepas de distintas especies del género *Lactobacillus* utilizada en los ensayos se muestra en la Tabla 3.2. Todas las cepas se cultivaron a partir de glicerizados a -80°C en placas de MRS agar por 72 horas a 37°C. A partir de colonias aisladas se sembraron 10 ml de MRS en condiciones estáticas a

Tabla 3.2. Cepas de *Lactobacillus* utilizadas en el ensayo de potencial prebiótico.

Cepa	Especie	Fuente o referencia
BL1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CECT 278
BL2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CECT 276
BL3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CECT 275
BL8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 748
BL14	<i>Lactobacillus curvatus</i>	CECT 904
BL17	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CECT 903
BL23	<i>Lactobacillus casei</i>	CECT 5275
BL28	<i>Lactobacillus casei</i>	64 H
BL32	<i>Lactobacillus casei</i>	CECT 4040
BL33	<i>Lactobacillus delbruckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CECT 4005
BL35	<i>Lactobacillus pentosus</i>	CECT 4023
BL82	<i>Lactobacillus casei</i>	CECT 277
BL83	<i>Lactobacillus casei</i>	CECT 4043
BL86	<i>Lactobacillus casei</i>	CECT 4045
BL87	<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 11578
BL90	<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334
BL91	<i>Lactobacillus casei</i>	CECT 4646
BL93	<i>Lactobacillus casei</i>	61 BG
BL94	<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 393
BL95	<i>Lactobacillus zae</i>	ATCC 15820
BL158	<i>Lactobacillus salivarius</i>	CECT 4063
BL261	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	AD99
BL166	<i>Lactobacillus plantarum</i>	NCIMB 8826
BL257	<i>Lactobacillus zae</i>	IFI-CA
BL277	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CECT 4479
BL280	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CECT 4179
BL281	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	CECT 289
BL287	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	DSM 10533
BL288	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	DSM 6629
BL327	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CECT 288
BL340	<i>Lactobacillus taiwanensis</i>	DSM 21041
BL358	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	HN001
BL377	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 53103

^aBL, Colección de cultivos de nuestro laboratorio.

^bCECT, Colección Española de Cultivos Tipo; ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo; DSM, Colección Alemana de Microorganismos; NCIMB, Colección Nacional de Bacterias Industriales, Alimenticias y Marinas, Reino Unido; *L. casei* 64H y 61BG son descritas en (Gasser and Mandel, 1968); *L. rhamnosus* HN001, también conocida como DR20, es descrita en (Prasad *et al.*, 1998,); *L. zae* BL257 fue aislada de vino (Moreno-Arribas and Polo, 2008); *L. johnsonii* BL261 fue aislada de intestino de rata (Sarmiento-Rubiano *et al.*, 2007).

37°C por una noche. Con 100 µl de estos cultivos se inocularon 10 ml de MRS basal en condiciones estáticas a 37°C. Después de una noche los cultivos fueron diluidos a una OD₅₅₀ de 0,1 en 100 µl de MRS basal sin suplementar y suplementado con 4 mM de GNB o LNB. El crecimiento bacteriano fue monitorizado por 30 horas o 70 horas, dependiendo de las cepas, mediante mediciones espectrofotométricas cada 30 minutos a 550 nm en placas de 96 pocillos a 37°C sin agitación en un lector de microplacas POLARstar Omega (BMG Labtech, Offenburg, Alemania). Tres réplicas biológicas independientes fueron utilizadas para cada curva de crecimiento. Los resultados fueron expresados como la media de las tres réplicas. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

3.8. Ensayos del potencial inmunomodulador

3.8.1. Cultivo de células de epitelio intestinal (IEC). La línea celular HT-29, derivada de adenocarcinoma de colon humano (ATCC, HTB-38; pases 136-150), fueron utilizadas como modelo celular de epitelio intestinal. Para ello se cultivaron en frascos de 25 cm² (Greiner, Frickenhausen, Alemania) en medio McCoy's 5A (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, EE.UU) suplementado con 10% de FCS (suero fetal de ternera) inactivado por calor (Gibco), penicilina (100 U ml⁻¹) y estreptomicina (100 U ml⁻¹) (Sigma, UK). Las células fueron mantenidas en un incubador con atmosfera controlada a 37°C y 5% de CO₂. El medio fue cambiado cada 2 o 3 días y se realizaron cultivos en frascos nuevos una vez por semana.

3.8.2. Purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las PBMC humanas fueron aisladas a partir de bolsas de sangre de donadores sanos (Sanquin, Amsterdam, Holanda). Las PBMC fueron purificadas mediante una centrifugación por gradiente en tubos Ficoll-Paque Plus (GE, Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia) a 1000 g durante 20 minutos. Tras recolectar las PBMC fueron lavadas en PBS (NaCl 8 g l⁻¹, KCl 0,2 g l⁻¹, Na₂HPO₄ 1,44 g l⁻¹, KH₂PO₄ 0,24 g l⁻¹ a un pH ajustado a 7,4) suplementado con 2% FCS. Los eritrocitos remanentes fueron eliminados mediante la adición de 5 ml de tampón de lisis (4,14 g NH₄Cl, 0,5 g KHCO₃, 18,6 mg Na₂EDTA en 500 ml de agua desmineralizada y esterilizada por filtración a un pH ajustado a 7,4) durante 5 minutos en hielo. Las PBMC fueron resuspendidas en medio PBMC (RPMI 1640 (Lonza, Veviers, Bélgica) suplementado con 2,5% de FCS, penicilina (100 U ml⁻¹) y estreptomicina (100 U ml⁻¹) (Sigma).

3.8.3. Modelo de co-cultivo en placas transwell. Una semana antes de los experimentos fueron sembradas células HT-29 con una dilución 1/5 en filtros de 0,4 μm , y 1 cm^2 (Costar, Corning Incorporated, NY, EE.UU) y crecidas a confluencia. La confluencia de células HT-29 no polarizadas fue determinada por microscopía de luz, ya que estas células no producen un cambio en la resistencia eléctrica transepitelial tras su diferenciación (TER, aproximadamente $150\Omega \times \text{cm}^2$). El TER de los filtros vacíos fue de $125\Omega \times \text{cm}^2$. Las monocapas confluentes de células HT-29 crecidas en los filtros fueron co-cultivadas en placas transwells (12 pocillos) con 1,5 ml de PBMC aisladas previamente (2×10^6 células ml^{-1}) (van Hoffen *et al.*, 2010), en medio PBMC y en condiciones controladas de 37°C y 5% de CO_2 . Las PBMC fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3 (clon CLB-T3/2) y anti-CD28 (clon CLB-CD28), ambos en diluciones 1:10000 (Sanquin). Por otra parte, fueron añadidos de forma apical, a la monocapa de células HT-29 en 0,5 ml, tanto agonistas de TLR (TLR4: LPS purificado de *E. coli* 0111:B4 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Invivogen, San Diego, EE.UU; TLR9: M362 oligonucleotidos CpG tipo C, 5 μM , Invivogen), como los diferentes oligosacáridos estudiados (LNB, GNB, Fuc- α 1-3GlcNAc y Fuc- α 1-6GlcNAc). Después de 24 horas se recolectaron las PBMC del compartimento basolateral para analizar la población de linfocitos T reguladores (T_{reg}) y se recogieron los sobrenadantes, los cuales fueron guardados a -20°C hasta la medición de las citoquinas. Además, tras 24 horas de co-cultivo, se trasladó el filtro con las IEC a una nueva placa con medio de cultivo fresco por 24 horas más para determinar la liberación de mediadores en el compartimento basolateral por las IEC. Al cabo de las 48 horas se utilizaron las IEC para hacer un ensayo de viabilidad celular (WST-1).

3.8.4. Modelo de incubación directa. Para este modelo se utilizaron placas multiwell de 48 pocillos y fondo plano (Costar 3548). En cada pocillo se sembraron 0,5 ml de PBMC aisladas previamente (2×10^6 células ml^{-1}) (van Hoffen *et al.*, 2010), en medio PBMC y en condiciones controladas de 37°C y 5% de CO_2 . Las PBMC fueron ensayadas en 3 condiciones, no estimuladas, estimuladas con anticuerpos anti-CD3 (clon CLB-T3/2) y estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (clon CLB-CD28), ambos en diluciones 1:10000 (Sanquin). En cada una de las condiciones se realizaron 4 tratamientos distintos en forma de dosis respuesta, cada uno de ellos con uno de los oligosacáridos sintetizados previamente en el laboratorio (LNB, GNB, Fuc-

α 1-3GlcNAc y Fuc- α 1-6GlcNAc), comenzando en 1 mM, hasta 0,0156 mM, y después un pocillo control sin oligosacárido. Tras incubar 24 horas se recogieron 150 μ l de sobrenadante los cuales fueron guardados a -20°C hasta la medición de las citoquinas, y se añadió medio PBMC fresco nuevo. Al cabo de 48 horas se recogió el sobrenadante final.

3.8.5. ELISA. La producción de citoquinas en los sobrenadantes recolectados de las PBMC e IEC fue medida mediante ELISA en un lector de absorbancia en microplaca iMARK (Bio-Rad). La concentración de IL-10 (U-CyTech), IL13 (eBioscience), TNF- α (Invitrogen), INF- γ (Invitrogen), fueron medidas según las instrucciones de las casas comerciales.

3.8.6. Ensayo de viabilidad. El ensayo se realizó con el kit “Cell Proliferation Reagent WST-1” según las instrucciones de la casa comercial (Roche), utilizando un lector de absorbancia en microplaca iMARK (Bio-Rad).

3.8.7. Análisis fenotípico de células T CD4+. Después del co-cultivo con las IEC, las PBMC fueron recolectadas y analizadas por citometría de flujo utilizando un equipo FACSCantoII (BD Biosciences). Para determinar la población de linfocitos T_{reg} se realizó un primer marcaje extracelular con anticuerpos anti CD4-PerCP-Cy5 y anti CD25-FITC (eBioscience 53-0259-42). Posteriormente se realizó el marcaje intracelular con un anticuerpo anti Foxp3-PE (eBioscience 17-4777-42), utilizando el set de tinción FoxP3 según el protocolo del fabricante (eBioscience).

3.8.8. Análisis estadístico. Los resultados están presentados como media \pm desviación estándar (DS) de al menos cinco experimentos independientes. Para corregir las diferencias entre las DS se aplicó la transformación logarítmica en base 10 (LOG). La producción de citoquinas o los efectos en el fenotipo celular de las PBMC después de los tratamientos fueron comparados utilizando un oneway ANOVA, seguido por un test de Bonferroni. Los análisis se realizaron con el programa Graphpad Prism 6.0. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4. Resultados



Capítulo 4.1

Metabolismo de
lacto-N-biosa,
galacto-N-biosa y
N-acetil-galactosamina
en
Lactobacillus casei



4.1.1 *Lactobacillus casei* fermenta galacto-N-biosa (GNB) y lacto-N-biosa (LNB) y las hidroliza utilizando el mismo enzima

Para estudiar si la cepa de *L. casei* BL23 es capaz de metabolizar oligosacáridos se realizó una búsqueda en su genoma (GenBank nº de acceso FM177140) (Mazé et al., 2010) de genes que codifican para hipotéticas β -glicosidasas. Este análisis reveló que esa cepa contiene un gen *bgaC* (LCABL_02910), renombrado aquí como *gnbG*, anotado como una hipotética β -galactosidasa 3 (EC.3.2.1.23), aunque como se demuestra más adelante es una fosfo- β -galactosidasa, y pertenece a la familia 35 de glicosil hidrolasas de la “carbohydrate active enzyme classification” (GH 35; <http://www.cazy.org>). El gen *gnbG* codifica para una proteína de 598 aminoácidos, sin péptido señal o motivo de anclaje a pared. Para caracterizar esta enzima, se clonó el gen *gnbG* en *E. coli* y se purificó la proteína con una etiqueta de histidinas (6XHis-GnbG). La proteína purificada mostró un peso molecular de 68 kDa que coincide con el calculado para la masa de la proteína sumado a la etiqueta de histidinas (68.275 kDa; Fig. 4.1.1).

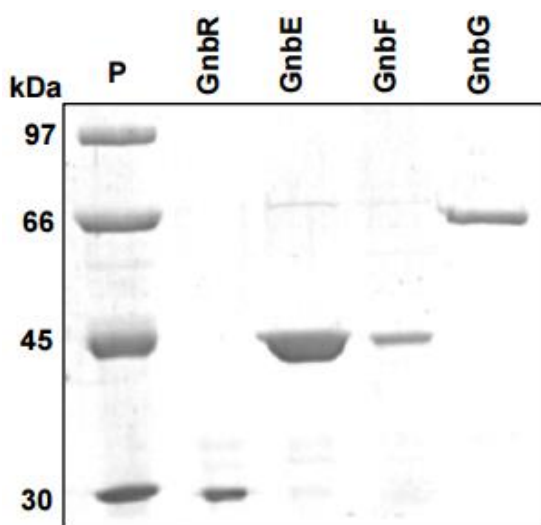


Fig. 4.1.1. Gel SDS-PAGE 10% teñido con azul de coomasie, donde se observan las proteínas clonadas y purificadas con tag de histidinas. GnbR (regulador transcripcional), GnbE (Galactosamina-6P isomerasa deaminasa), GnbF (N-acetilgalactosamina-6P deacetilasa) y GnbG (fosfo- β -galactosidasa). P (marcador de peso molecular). Los números en la izquierda corresponden a los pesos moleculares del marcador en kDa.

La enzima 6xHis-GnbG fue ensayada por su capacidad de hidrolizar una serie de compuestos artificiales y naturales (Tabla 4.1.1). Se demostró que la 6xHis-GnbG hidroliza *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (*o*-NPG), aunque con una baja eficiencia, como demuestra el valor alto de la K_m y bajo de la V_{max} (Tabla 4.1.1). El pH óptimo es de 7,0 y la temperatura óptima de 45°C. Entre los oligosacáridos naturales ensayados GnbG fue capaz de hidrolizar GNB, LNB, de liberar galactosa a partir de lacto-N-tetraosa (LNT), y de hidrolizar muy ineficientemente el disacárido Gal β 1-6GlcNAc.

Tabla. 4.1.1. Actividad y caracterización de 6xHis-GnbG.

Sustrato	Actividad
<i>o</i> -NP- β -D-galactopiranosido	+
<i>p</i> -NP- β -D-glucopiranosido	-
<i>o</i> -NP-1-thio- β -D-galactopiranosido	-
<i>p</i> -NP- β -D-glucuronido	-
<i>p</i> -NP- <i>N</i> -acetil- β -D-glucosaminido	-
<i>p</i> -NP- α -D-glucopiranosido	-
<i>p</i> -NP- α -D- galactopiranosido	-
<i>p</i> -NP- α -L- fucopiranosido	-
Galacto- <i>N</i> -biosa (Gal β 1-3GalNAc)	+
Lacto- <i>N</i> -biosa (Gal β 1-3GlcNAc)	+
Lacto- <i>N</i> -triosa (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)	-
Lacto- <i>N</i> -tetraosa (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)	+
Lacto- <i>N</i> -neotetraosa (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)	-
6'-Galactopiranosil-GlcNAc (Gal β 1-6GlcNAc)	+/-
3'- <i>N</i> -Acetilgalactosaminil-Gal (GalNAc β 1-3Gal)	-
3'- <i>N</i> -Acetilglucosaminil-Man (GlcNAc β 1-3Man)	-
4'-Manopiranosil-GlcNAc (Man β 1-4GlcNAc)	-
4'-Galactofuranosil-GlcNAc (Gal β 1-4GlcNAc)	-
Lactosa (Gal β 1-4Glc)	-
<i>N</i> -acetil-lactosamina (Gal β 1-4GlcNAc)	-
Lactulosa (Gal β 1-4Fru)	-
Maltosa (Glc α 1-4Glc)	-
Maltotriosa (Glc α 1-4Glc α 1-4Glc)	-
Sacarosa	-
Caracterización	
V_{max} (μ mol (mg proteína ⁻¹ min ⁻¹))	1,7
K_m (mM)	2,3
pH óptimo	7,0
Temperatura óptima (°C)	45

Carbohidratos utilizados como sustrato: NP, nitrofenil; Glc, glucosa; Gal, galactosa; GlcNAc, *N*-acetilglucosamina; GalNAc, *N*-acetilgalactosamina; Man, manosa; Fru, fructosa. El sustrato fue total (+) o parcialmente (+/-) hidrolizado, o no se detectó actividad (-), después de 16 h de reacción en las condiciones descritas en “Materiales y Métodos”. La caracterización enzimática (V_{max} , K_m pH óptimo y temperatura) fue realizada utilizando *o*-NPG como sustrato.

L. casei BL23 se cultivó en medio MRS basal suplementado con 4 mM de GNB, LNB o LNT, y se observó que es capaz de crecer en presencia de GNB y LNB como fuentes de carbono, pero no es capaz de fermentar la LNT (Fig. 4.1.2). Como control positivo se utilizó el patrón de crecimiento en lactosa (Fig. 4.1.2). En presencia de este azúcar y GNB se obtuvo una densidad celular similar, aunque el periodo de adaptación a la fuente de carbono fue menor para la GNB que para la lactosa. Los niveles de densidad celular alcanzados en LNB fueron menores comparados con la lactosa y GNB. Puesto que el análisis de contenido en azúcar de los sobrenadantes de los cultivos demostraron que los tres disacáridos habían sido consumidos completamente, esos resultados indican que la LNB es una fuente de carbono y energía menos eficiente que la lactosa y la GNB para *L. casei* BL23.

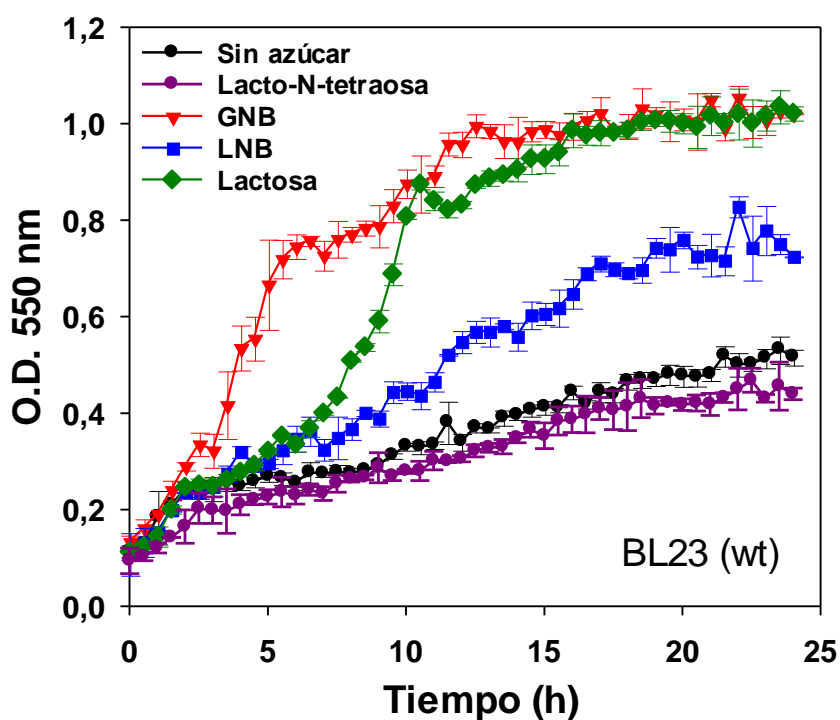


Fig. 4.1.2. Curvas de crecimiento de *Lactobacillus casei* BL23 en MRS basal sin suplementar (negro), suplementado con GNB (rojo), LNB (azul), o con lactosa (verde). Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error.

Para determinar si la β -galactosidasa GnbG estaba implicada en la utilización de GNB y/o LNB en *L. casei* BL23 se construyó un mutante en *gnbG* (cepa BL384). Esta cepa se cultivó en medio MRS basal suplementado con 4 mM de GNB o LNB. El mutante exhibió un crecimiento en estos disacáridos comparable al del control negativo (MRS basal sin suplementar con fuente de carbono) (Fig. 4.1.3), indicando que GnbG es necesaria para la utilización de GNB y LNB. El análisis de la presencia de azúcares en

los sobrenadantes del medio de cultivo detectó GNB y LNB, respectivamente, en los sobrenadantes de la cepa BL384 (*gnbG*).

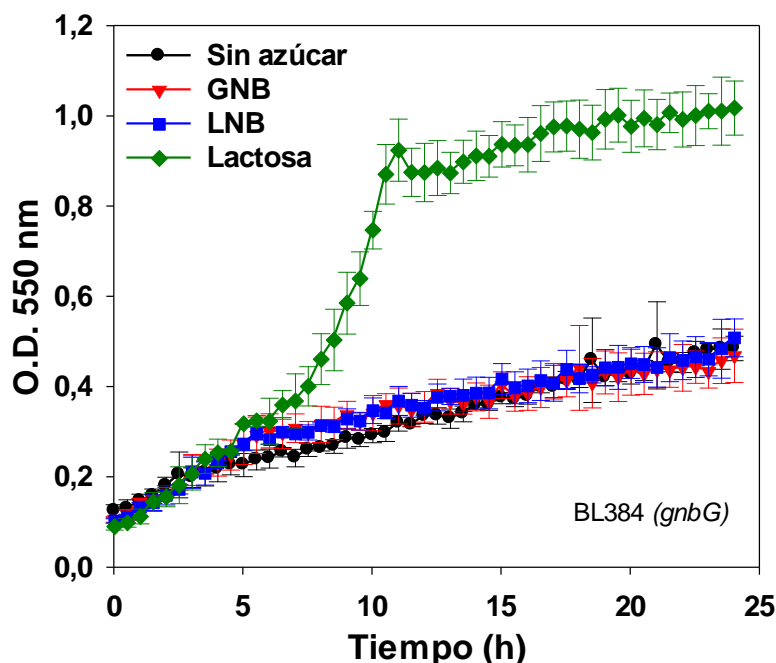


Fig. 4.1.3. Curvas de crecimiento de la cepa mutante *Lactobacillus casei* BL384 (*gnbG*) en MRS basal sin suplementar (negro), suplementado con GNB (rojo), LNB (azul), o con lactosa (verde). Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error.

4.1.2. GNB, LNB y GalNAc son transportados por el PTS^{Gnb}

El gen *gnbG* está organizado dentro de un hipotético operón (*gnbREFGBCDA*) con genes que codifican para un regulador transcripcional de la familia GntR (LCABL_02880), para enzimas catabólicas (LCABL_02890, LCABL_02900) y para proteínas con homología a los componentes de un sistema de transporte PTS de la clase manosa, EIIB, EIIC, EIID y EIIA (LCABL_02920, LCABL_02930, LCABL_02940 y LCABL_02950) (Fig. 4.1.4A). Para determinar si este PTS está implicado en la internalización de GNB y LNB en *L. casei* BL23, se construyó un mutante para el gen que codifica para el dominio EIIC (cepa BL385). Esta cepa fue incapaz de crecer en presencia de GNB o LNB como fuente de carbono (Fig. 4.1.5A). El análisis del contenido en azúcares de los sobrenadantes demostró que ambos disacáridos no habían sido consumidos, indicando que el dominio EIIC codificado por *gnbC* está involucrado en el transporte de GNB y LNB.

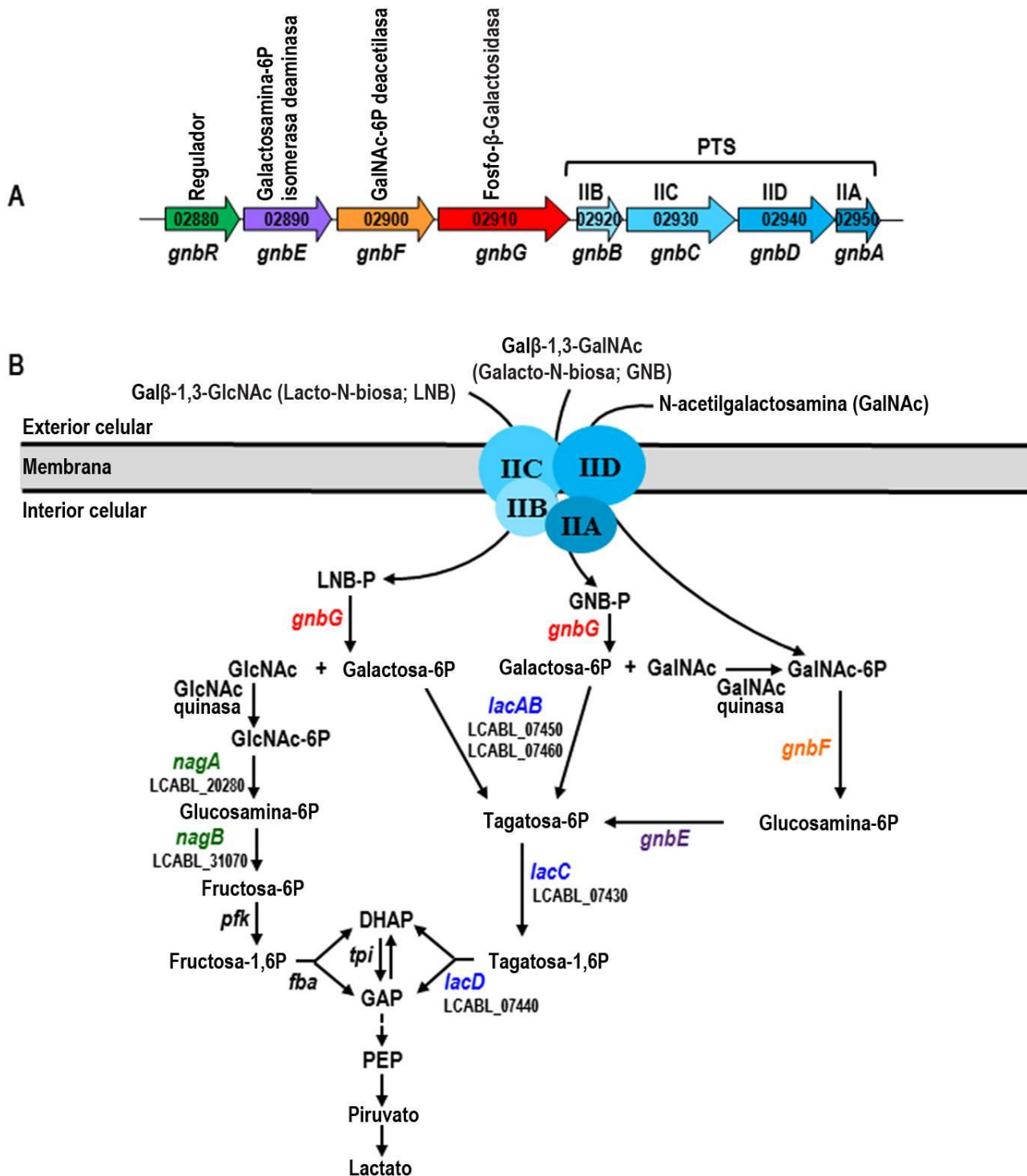


Fig. 4.1.4. A) Representación esquemática del operón *gnb* en el cromosoma de *L. casei*. Se indican los distintos genes. La representación no se encuentra a escala. nt, nucleótido; aa, aminoácido. B) Representación esquemática de las rutas metabólicas de la GNB, LNB y GalNAc en *L. casei* BL23. PTS, sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; GAP, gliceraldehido 3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; *nagB*, glucosamina-6P deaminasa; *lacAB*, galactosa-6P isomerasa; *lacC*, tagatosa-6P quinasa; *lacD*, tagatosa-1,6P aldolasa; *pfk*, fosfofructo-1-quinasa; *fba*, fructosa-1,6P aldolasa; *tpi*, triosa fosfato isomerasa.

Se ha demostrado anteriormente que en *L. casei* el PTS puede llevar a cabo el transporte de carbohidratos sin estar acoplado a su fosforilación (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2012a), así que con el objeto de analizar la función del PTS^{Gnb} en el transporte y fosforilación de la GNB y LNB, se determinó el patrón de crecimiento de la cepa BL126 (*ptsI*), mutante en la enzima I, componente general de los sistemas PTS (Viana *et al.*, 2000), en presencia de GNB o LNB (Fig.4.1.5B). El ensayo confirmó que la utilización de ambos disacáridos es dependiente de un PTS completamente funcional. Como era de esperar, la cepa BL126 fue capaz de crecer en glucosa, pero no en lactosa, un azúcar transportado únicamente por sistemas PTS en *L. casei* (Viana *et al.*, 2000) (Fig. 4.1.5.B). Estos resultados sugieren que GNB y LNB son internalizados como derivados fosforilados.

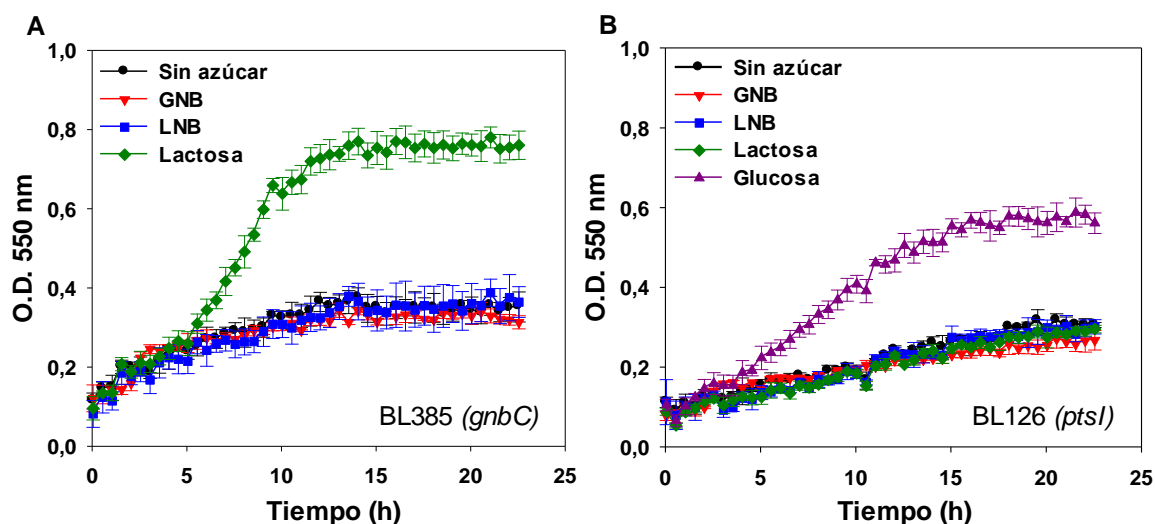


Fig. 4.1.5. Curvas de crecimiento de las cepas mutantes *Lactobacillus casei* BL385 (*gnbC*) (A) y BL126 (*ptsI*) (B), en MRS basal sin suplementar (negro), suplementado con GNB (rojo), LNB (azul), lactosa (verde) o glucosa (violeta). Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error.

A continuación se ensayó si *L. casei* BL23 era capaz de crecer utilizando como única fuente de carbono la N-acetilgalactosamina (GalNAc), uno de los monosacáridos constituyentes de la GNB, para la cual no existe ningún trabajo previo sobre su utilización por lactobacilli, y como se describirá más adelante, es inductor del operón *gnb*. Se observó que *L. casei* BL23 crece en MRS basal suplementado con 4 mM de GalNAc (Fig. 4.1.6A).

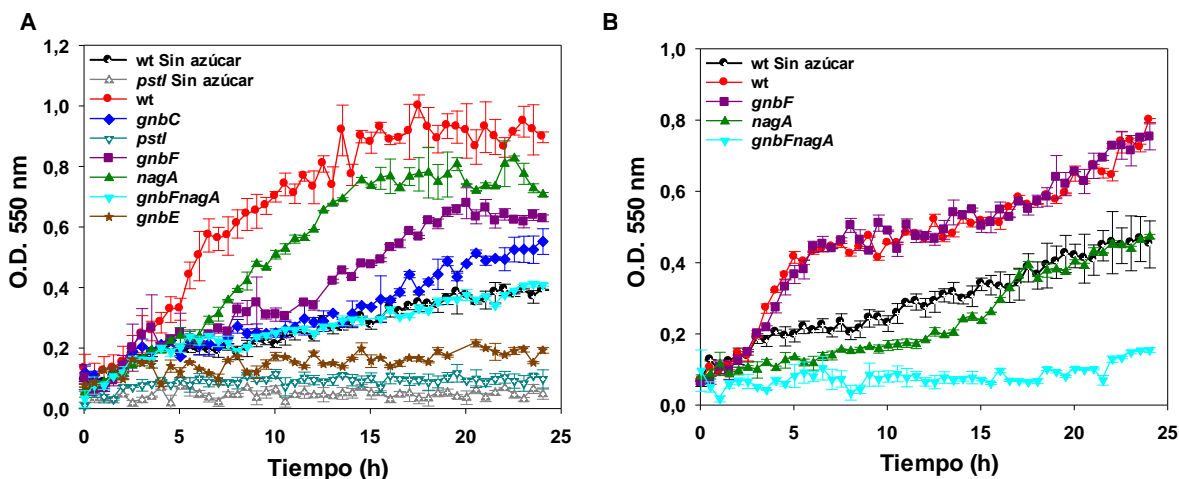


Fig. 4.1.6. Curvas de crecimiento de: A) *Lactobacillus casei* BL23 (rojo) y las cepas mutantes *L. casei* BL126 (*ptsI*) (turquesa oscuro), BL383 (*gncF*) (violeta), BL385 (*gncC*) (azul), BL388 (*nagA*) (verde), BL389 (*gncFnagA*) (turquesa), y BL397 (*gncE*) (marron) en MRS basal suplementado con GalNAc. BL23 (negro) y BL126 (gris) en MRS sin suplementar. B) *L. casei* BL23 (rojo) y las cepas mutantes BL383 (*gncF*) (violeta), BL388 (*nagA*) (verde) y BL389 (*gncFnagA*) (turquesa) en MRS basal suplementado con GlcNAc. BL23 (negro) en MRS sin suplementar. Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error.

Además se demostró que el PTS^{Gnb} está involucrado en la fermentación de GalNAc, ya que la cepa mutante BL385 (*gncC*) mostró una menor tasa de crecimiento ($0,031 \text{ h}^{-1}$) en comparación con la cepa parental BL23 ($0,128 \text{ h}^{-1}$), mientras que la cepa BL126 ($\Delta ptsI$) no creció en absoluto en presencia de GalNAc (Fig. 4.1.6A). Estos resultados indican que el PTS^{Gnb} de *L. casei* BL23 además de transportar GNB y LNB, también es el responsable del transporte de GalNAc.

4.1.3. GnbE y GnbF son necesarios para el metabolismo de la GNB, pero no de la LNB

Por encima de *gncG* se encuentran dos genes, *gncE* (LCABL_02890) y *gncF* (LCABL_02900) (Fig.4.1.4A), anotados como tagatosa-6P ketosa/aldolasa isomerasa y GlcNAc-6P deacetilasa, respectivamente. A partir de esta información hipotetizamos que estas enzimas podrían ser parte de la vía catabólica de las N-acetilhexosaminas-P resultantes del transporte de GalNAc por el PTS^{Gnb}, o liberadas por la hidrólisis de GNB-P o LNB-P mediante la fosfo β -galactosidasa GncG (Fig. 4.1.4B). En este último caso las N-acetilhexosaminas deberían ser fosforiladas por quinasas específicas. Para comprobar esta hipótesis, GncE y GncF fueron expresadas en *E. coli* con una etiqueta de histidinas y purificadas (Fig. 4.1.1). Las actividades enzimáticas propuestas fueron

ensayadas utilizando GlcNAc-6P y GalNAc-6P como sustrato en una reacción acoplada descrita en la sección de “Materiales y Métodos”. La presencia simultánea de ambas enzimas GnbE y GnbF fue necesaria para la conversión de GalNAc-6P a Tagatosa-6P, demostrando que GnbF deacetiló GalNAc-6P a galactosamina-6P, la cual posteriormente fue convertida en tagatosa-6P por la acción de GnbE (Fig. 4.1.7). Esto confirma que GnbF es una N-acetilhexosamina-6P deacetilasa, mientras que GnbE exhibe una actividad deaminasa e isomerasa en galactosamina-6P. Ninguna actividad fue detectada al utilizar como sustrato inicial GlcNAc-6P (Fig. 4.1.7).

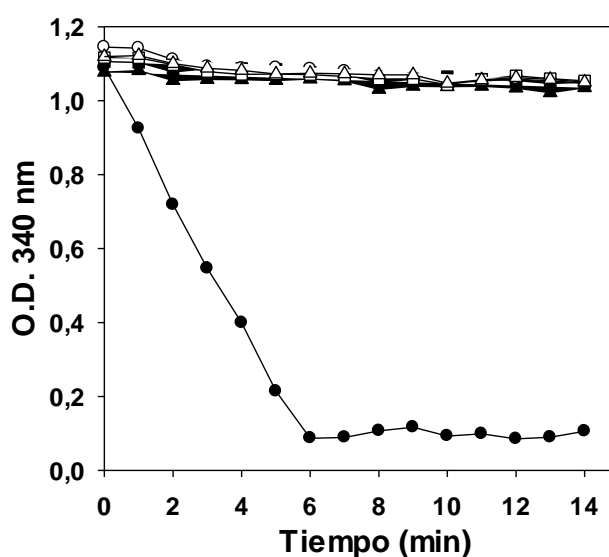


Fig. 4.1.7. Cinética de absorbancia de NADH determinada en el ensayo espectrofotométrico descrito en materiales y métodos. Sustratos: N-acetilgalactosamina-6P (figuras llenas), o N-acetilglucosamina-6P (figuras vacías). Enzimas utilizadas en las reacciones: GnbF y GnbE (círculos), GnbF (cuadrados) o GnbE (triángulos).

De acuerdo con las actividades enzimáticas ensayadas, la cepa mutante que se construyó para el gen *gnbF* (cepa BL383) mostró una tasa de crecimiento en medio suplementado con GNB ($0,041 \text{ h}^{-1}$) (Fig. 4.1.8A) menor que la de la cepa parental BL23 ($0,192 \text{ h}^{-1}$) (Fig. 4.1.2), mientras que en medio suplementado con LNB la tasa de crecimiento ($0,042 \text{ h}^{-1}$) fue comparable a la cepa parental BL23 ($0,044 \text{ h}^{-1}$). Del mismo modo, de acuerdo con la actividad enzimática de GnbF en GalNAc-6P, la cepa BL383 (*gnbF*) mostró una tasa de crecimiento en GalNAc ($0,044 \text{ h}^{-1}$) (Fig. 4.1.6A) menor que la cepa parental BL23 ($0,128 \text{ h}^{-1}$), mientras que en GlcNAc, la tasa de crecimiento fue idéntica a la cepa BL23 (Fig. 4.1.6B). De forma similar, la cepa mutante BL397 (*gnbE*) no fue capaz de crecer en GNB, mientras que ningún efecto fue observado en el

crecimiento en LNB o GlcNAc. La presencia de GNB (Fig. 4.1.8D) o GalNAc (Fig. 4.1.6A) pero no de LNB (Fig. 4.1.8D) resultaron tóxicas en la cepa mutante BL397 (*gnbE*), observado en un menor crecimiento de esta cepa, comparando con el crecimiento basal en el medio MRS basal sin suplementar (Fig.4.1.8D).

Los resultados anteriores indican que *gnbE* y *gnbF* son necesarios para el metabolismo de GNB pero no de LNB. Por lo tanto, la vía catabólica de LNB debe contar con una segunda N-acetilhexosamina-P deacetilasa, capaz de actuar en la GlcNAc-6P generada a partir de LNB (Fig. 4.1.4B). Hemos especulado que esta actividad podría ser producto de la proteína codificada por otro gen presente en el genoma, *nagA* (LCABL_20280), cuyo producto tiene una identidad del 39% con GnbF. Para comprobar esto se construyó una cepa con una interrupción en el gen *nagA* (cepa BL388). La tasa de crecimiento de esta cepa mutante en MRS basal suplementado con LNB ($0,035 \text{ h}^{-1}$) fue similar al control en medio sin suplementar ($0,032 \text{ h}^{-1}$) (Fig. 4.1.8B). El crecimiento en GNB de esta misma cepa apenas fue afectado (Fig. 4.1.8B), mientras que en GalNAc (Fig. 4.1.6A) el crecimiento fue reducido, mostrando que tanto NagA como GnbF son necesarias para obtener un crecimiento completo en este azúcar. Como era de esperar, la cepa mutante *nagA* no fue capaz de crecer en medio suplementado con GlcNAc como fuente de carbono (Fig. 4.1.6A), indicando que *nagA* está involucrado en el metabolismo de este monosacárido, así como también en el metabolismo de la fracción correspondiente a GlcNAc producto de la hidrólisis de LNB. Se construyó a continuación una cepa doble mutante en *gnbF nagA* (cepa BL389), la cual tampoco ha sido capaz de crecer en GlcNAc, GalNAc (Fig. 4.1.6), GNB o LNB (Fig. 4.1.8C). Estos resultados sugieren que la capacidad residual de la cepa BL383 (*gnbF*) de crecer en GNB fue probablemente debido a la actividad de NagA sobre GalNAc-6P, mientras que GnbF solo puede reemplazar parcialmente la actividad de NagA. Además, sugieren que la acumulación de los azúcar fosfatos GalNAc-6P, GlcNAc-6P o galactosamina-6P tiene un efecto tóxico en la viabilidad de *L. casei* BL23, ya que la galactosa liberada de GNB o LNB no es capaz de sostener el crecimiento en la cepa doble mutante BL389 ni en la cepa BL397 (*gnbE*). De hecho, se ha demostrado con anterioridad que los azúcares fosforilados son altamente tóxicos en bacterias (Phong *et al.*, 2013; Swiatek *et al.*, 2012).

De forma similar a la actividad de GnbE sobre galactosamina-6P, la deaminación e isomerización de glucosamina-6P generada a partir del metabolismo de LNB a fructosa-6P, podría ser catalizada por el producto del gen *nagB* (LCABL_31070) que codifica hipotéticamente para una glucosamina-6P deaminasa. Se han realizado varios intentos de interrumpir *nagB* en el cromosoma de *L. casei* BL23 pero ninguno ha sido exitoso, lo cual confirma resultados previos que sugieren que NagB juega un rol esencial en los flujos de carbono de *L. casei* BL23 (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2012b).

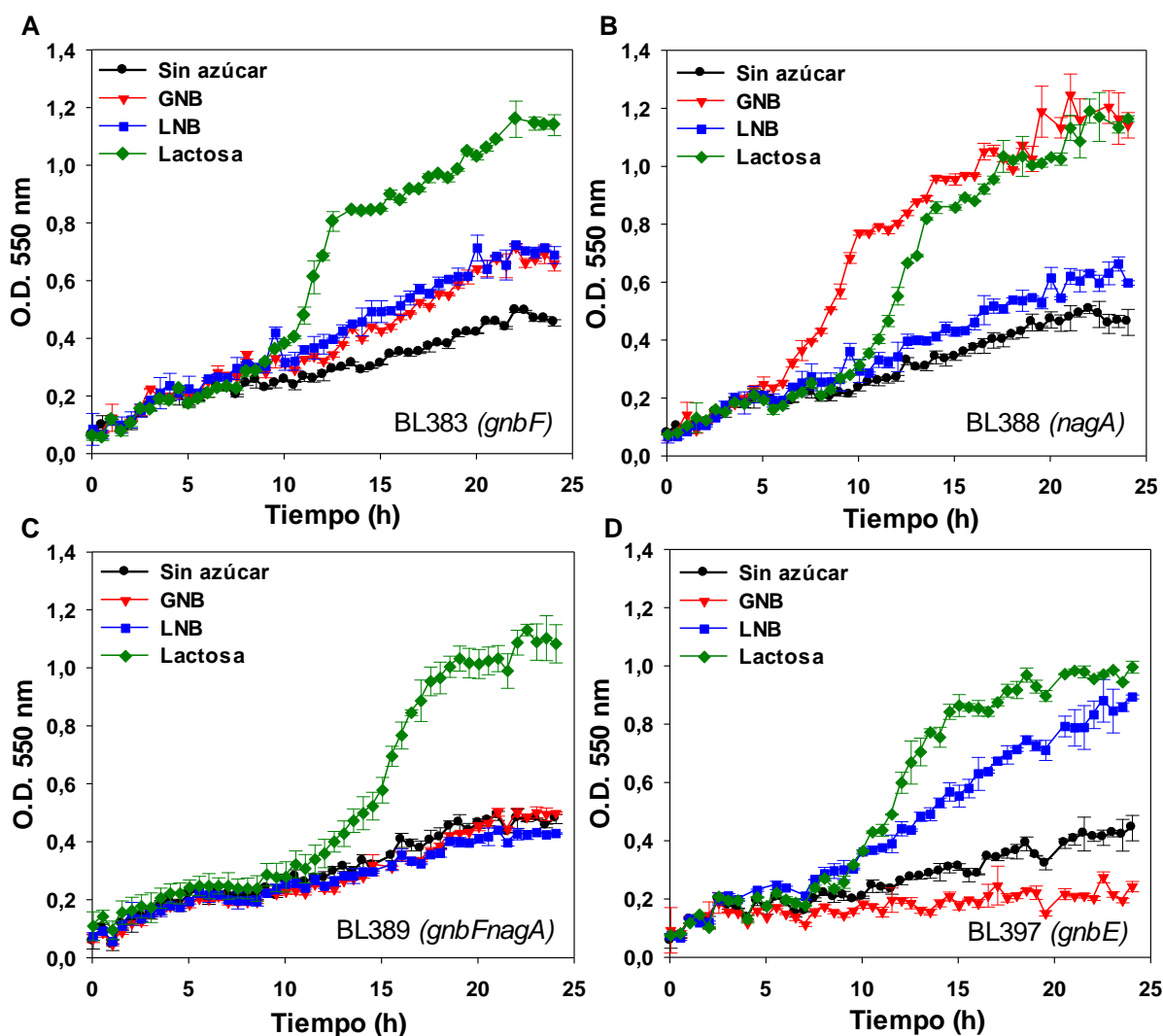


Fig. 4.1.8. Curvas de crecimiento de las cepas mutantes *Lactobacillus casei* BL383 (*gnbF*) (A), BL388 (*nagA*) (B), BL389 (*nagAgnbF*) (C), y BL397 (*gnbE*) (D), en MRS basal sin suplementar (negro) o suplementado con GNB (rojo), LNB (azul) o lactosa (verde) como fuente de carbono. Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error.

Como se mencionó al principio de este apartado, la GalNAc y GlcNAc liberadas por la hidrólisis de GNB-P y LNB-P respectivamente, mediante la fosfo β -galactosidasa GnbG, tienen que ser fosforiladas antes de ser sustrato para las enzimas, GnbF y NagA (Fig. 4.1.4B). Con el objeto de encontrar las quinasas responsables de esta fosforilación, se hizo una búsqueda en el genoma de *L. casei* BL23 (Maze *et al.*, 2010) utilizando el programa BLAST y la secuencia deducida de aminoácidos de la N-acetilglucosamina 6-quinasa (NagK) de *E. coli* (Uehara and Park, 2004). Se encontraron tres quinasas de azúcares putativas: LCABL_18750 (anotada como *glk*), LCABL_28340 y LCABL_29280 (nombrada aquí como *sugK* por quinasa de azúcar en inglés). La LCABL_28340 fue descartada por encontrarse dentro de un operón hipotético de un manosil-sacárido. Para analizar si *glk* o *sugK* están implicadas en el metabolismo de GNB y LNB, se construyeron dos cepas mutantes, BL391 (*glk*) y BL392 (*sugK*). Estas cepas se cultivaron en medio MRS basal suplementado con GNB o LNB, y las dos presentaron un patrón de crecimiento comparable al de la cepa silvestre BL23 (Fig. 4.1.9). Estos resultados indican que los genes *glk* y *sugK* no están implicados en el metabolismo de GNB y LNB en *L. casei* o que los productos de ambos presentan una actividad redundante y se complementan.

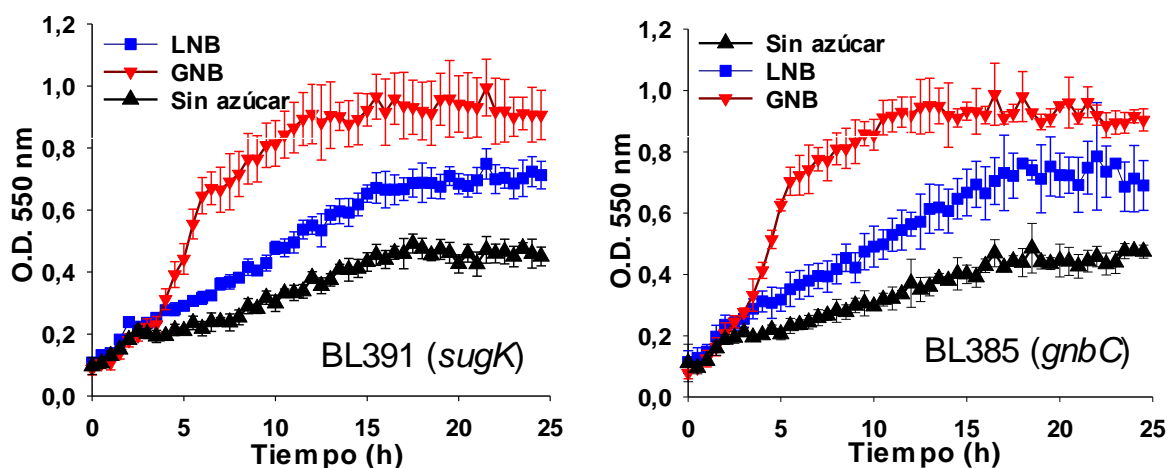


Fig. 4.1.9. Curvas de crecimiento de las cepas mutantes *Lactobacillus casei* BL391 (*sugK*) (A) y BL392 (*glk*) (B), en MRS basal sin suplementar (negro) o suplementado con GNB (rojo) o LNB (azul) como fuente de carbono. Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error.

4.1.4. Identificación de la ruta de la Tagatosa-6P en *L. casei* y evaluación de su participación en el metabolismo de GNB y LNB

Los resultados mostrados anteriormente sugieren que GNB y LNB son transportados y fosforilados por el PTS^{Gnb} y posteriormente hidrolizados por la fosfo-β-galactosidasa GnbG en la correspondiente N-acetilhexosamina y Gal-6P (Fig. 4.1.4B). Con el objeto de demostrar esto, se investigó si la ruta de la tagatosa-6P (Tag-6P) está involucrada o no en el catabolismo de GNB y LNB. Está aceptado que la Gal-6P, la cual también es generada durante el transporte de galactosa mediante el PTS^{Gal} o del metabolismo de la lactosa, es metabolizada por la ruta de la Tag-6P en *L. casei* (Alpert and Siers, 1997; Bettenbrock *et al.*, 1999), sin embargo esto nunca ha sido investigado a nivel genético. Tras un análisis del genoma de *L. casei* BL23 (Nº de acceso en GenBank FM177140) (Maze *et al.*, 2010) se encontraron cinco genes *lacRIABD2C* (LCABL_07470 al LCABL_07430) que codificarían una ruta de Tag-6P putativa (Fig. 4.1.4B), incluyendo un regulador transcripcional LacR1, las dos subunidades de la isomerasa heteromérica de Gal-6P (*lacAB*), una kinasa de Tag-6P (*lacC*) y una aldolasa de Tag-1,6-bifosfato (*lacD2*). Se construyó una cepa mutante con una delección (204 pb) en el extremo 3' terminal de *lacA* y 5' terminal de *lacB* (339 pb) (cepa BL393). Esta cepa mostró unas tasas de crecimiento en GNB (0,073 h⁻¹) y en LNB (0,036 h⁻¹) menores que la cepa parental BL23 en estos disacáridos (0,192 h⁻¹ y 0,044 h⁻¹ respectivamente), y al mismo tiempo BL393 no fue capaz de crecer en galactosa (Fig. 4.1.10). Estos resultados sugieren que la utilización de GNB y LNB en *L. casei* BL23 emplea la ruta de la Tag-6P para el catabolismo de la galactosa liberada, y que el crecimiento producido en la cepa BL393 (*lacAB*) en estos disacáridos es producto del metabolismo de la N-acetilhexosamina correspondiente. Esto también apoya la hipótesis de que la hidrólisis de GNB-P y LNB-P da como uno de sus productos Gal-6P.

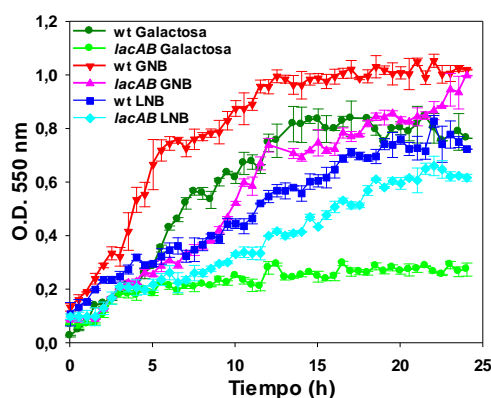


Fig. 4.1.10. Curvas de crecimiento de *Lactobacillus casei* BL23 en MRS basal suplementado con galactosa (verde oscuro), GNB (rojo), o LNB (azul) como fuente de carbono, y la cepa mutante *L. casei* BL393 (*lacAB*) en MRS basal suplementado con galactosa (verde), GNB (rosa), o LNB (turquesa), como fuente de carbono. Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error.

4.1.5. Regulación del operón *gnb*

4.1.5.1. Análisis transcripcional del operón *gnb*

La estructura del operón *gnbREFGBCDA* (Fig. 4.1.4A) sugiere una transcripción coordinada en respuesta a la disponibilidad de GNB, LNB y/o GalNAc. Se realizaron análisis de RT-qPCR a partir de RNA aislado de cultivos de *L. casei* BL23 en medio MRS basal suplementado con GNB, LNB, GalNAc, GlcNAc, galactosa o glucosa (Fig. 4.1.11). Tomando como referencia los niveles de transcritos en cultivos en presencia de glucosa, los genes *gnbR*, *gnbE*, *gnbF*, *gnbG* y *gnbC* fueron inducidos por GNB y GalNAc. Los niveles de inducción fueron del rango de 3,2 a 38,8 veces y 7,1 a 12,8 veces en GNB y GalNAc, respectivamente. Por el contrario, el crecimiento en LNB y GlcNAc apenas induce los genes *gnb*. De hecho, los resultados presentados anteriormente con los cultivos de las distintas cepas mutantes ha demostrado que el catabolismo de LNB solo requiere de algunas de las proteínas codificadas por el operón *gnb* (el PTS^{Gnb} y GnbG) mientras que otras no son necesarias (GnbE y GnbF), y el metabolismo de GlcNAc es totalmente independiente de este operón. Los niveles de transcritos de los genes *gnb* disminuyeron en un rango de entre 4,2 a 7,3 veces en los cultivos suplementados con galactosa, por lo tanto existe una represión del operón *gnb* en presencia de la fracción hexosa de GNB y LNB. Este efecto ha sido observado anteriormente en algunos genes de *Streptococcus mutans*, incluyendo varios genes relacionados con el metabolismo energético, los cuales han mostrado una menor expresión en cultivos crecidos en galactosa comparados a glucosa (Abranches *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2013).

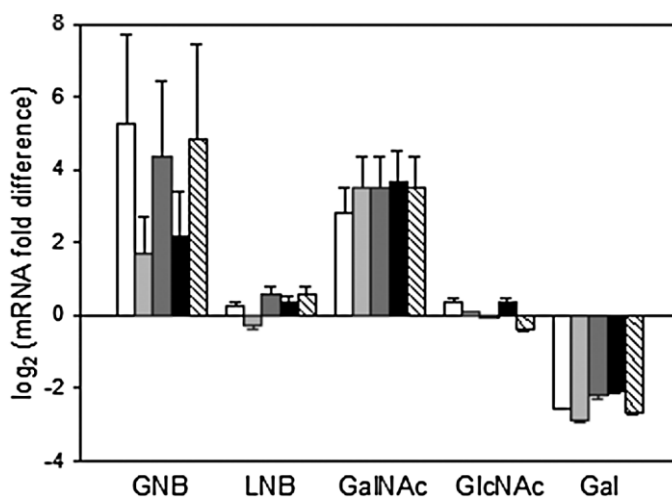


Fig. 4.1.11. Análisis transcripcional por RT-qPCR de *gnbR* (barras blancas), *gnbE* (gris claro), *gnbF* (gris oscuro), *gnbG* (negras) y *gnbC* (líneas diagonales), en *Lactobacillus casei* BL23 crecido en MRS basal suplementado con galacto-N-biosa (GNB), lacto-N-biosa (LNB), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc) o galactosa (Gal). Se utilizó como referencia los niveles de expresión obtenidos en MRS basal suplementado con glucosa. Datos representados como la media de tres réplicas de al menos dos muestras biológicas independientes. Desviación estándar indicada con barras de error.

4.1.5.2. *gnbR* codifica un represor transcripcional *gnb*

El gen *gnbR* (Fig. 4.1.4A) codifica para una proteína con homología a reguladores transcripcionales putativos. Contiene un dominio N-terminal de unión al DNA hélice-giro-hélice (WHTH) conservado (residuos aminoacídicos de 5 al 69) en la familia de reguladores transcripcionales GntR, y un dominio de unión a ligando (aminoácidos del 90 al 230) en el extremo C-terminal, homólogo al dominio (UTRA) del regulador transcripcional UbiC. Este dominio posee un plegamiento similar a los miembros de la subfamilia HutC de los reguladores tipo GntR (Rigali *et al.*, 2002). Para determinar la participación de GnbR en la regulación de la utilización de GNB y LNB en *L. casei* BL23, se construyó la cepa BL382, mutante en *gnbR*. La tasa de crecimiento de esta cepa en medio MRS basal suplementado con GNB ($0,210 \text{ h}^{-1}$) es similar a la de la cepa parental BL23 ($0,192 \text{ h}^{-1}$), sin embargo, al cultivar la cepa en LNB la tasa de crecimiento ($0,180 \text{ h}^{-1}$) fue significativamente mayor que en la cepa parental ($0,044 \text{ h}^{-1}$) (Fig. 4.1.12A).

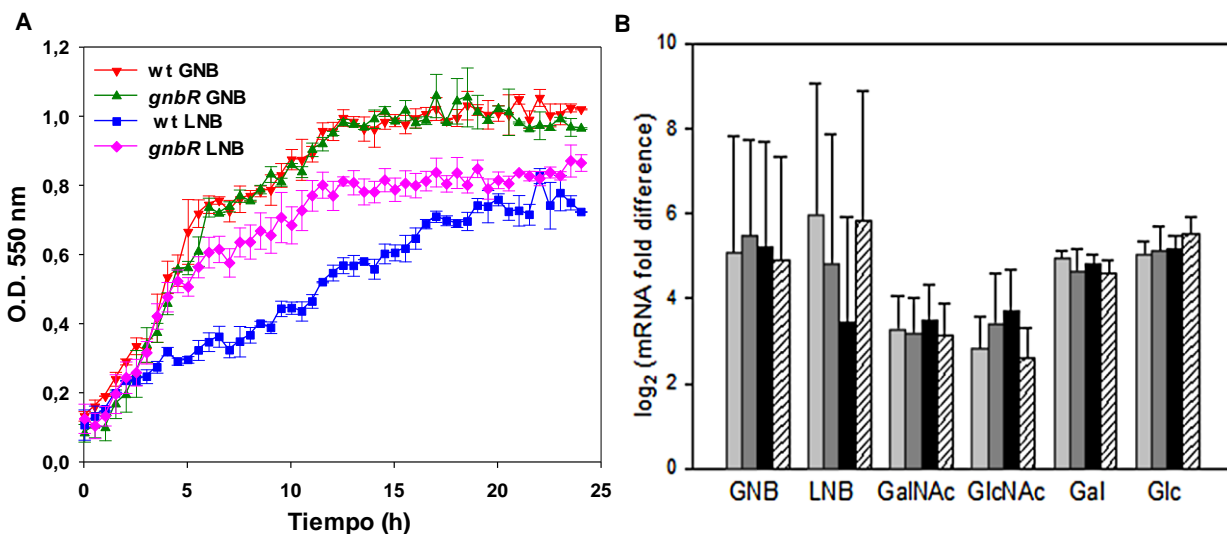


Fig. 4.1.12. A) Curvas de crecimiento de *Lactobacillus casei* BL23 en MRS basal suplementado con GNB (rojo) y LNB (azul), y BL382 (*gnbR*) en MRS basal suplementado con GNB (verde) y LNB (rosa) como fuente de carbono. Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error. B) Análisis transcripcional por RT-qPCR de *gnbE* (barras gris claro), *gnbF* (gris oscuro) *gnbG* (negras) y *gnbC* (líneas diagonales), en *L. casei* BL382 (*gnbR*) crecido en MRS basal suplementado con galacto-N-biosa (GNB), lacto-N-biosa (LNB), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa (Gal) o glucosa (Glc). Se utilizó como referencia los niveles de expresión de *L. casei* BL23 crecida en MRS basal suplementado con glucosa. Datos representados como la media de tres réplicas de al menos dos muestras biológicas independientes. Desviación estándar indicada con barras de error.

Los niveles de transcripción de los genes *gnbE*, *gnbF*, *gnbF* y *gnbC* en la cepa BL382 fueron similares independientemente del azúcar utilizado para suplementar el medio de cultivo (GNB, LNB, GalNAc, GlcNAc, galactosa o glucosa) (Fig. 4.1.12B). Además, estos niveles fueron superiores comparados con los de la cepa parental BL23 cultivada en glucosa, indicando que GnbR actúa como un represor transcripcional de los genes *gnb*.

4.1.5.3. Unión de GnbR al promotor de *gnbREFGBCDA*

Para comprobar si el efecto regulatorio de GnbR se debe a una interacción directa con la región promotora del operón *gnb* se expresó y purificó GnbR con una etiqueta de histidinas (Fig. 4.1.1). Esta proteína se utilizó para hacer un ensayo de cambio en la movilidad electroforética en gel (“band shift”) con dos fragmentos diferentes de DNA abarcando completamente la región intergénica entre *gnbR* y el gen más próximo río arriba (*manA*, LCABL_02870): el primero de 192 pb cercano al extremo 3' de *manA*, y el segundo de 172 pb, inmediatamente río arriba de *gnbR* (Fig. 4.1.13A). Los resultados muestra que 6XHis-GnbR generó un retardo en el fragmento de 172 pb pero no así en el de 192 pb (Fig. 4.1.13A). Después de acotar la región de unión a tan solo 172 pb, y a fin de identificar el sitio exacto de unión al DNA dentro del promotor de *gnb*, realizamos un ensayo de footprinting DNasa I con 6XHis-GnbR (Fig. 4.1.13B). El análisis de la imagen reveló una región protegida de 26 bases, desde la posición -9 a la -34 respecto del codón de inicio de *gnbR*. Esta secuencia protegida de 26 pb contiene tres repeticiones invertidas que podrían ser el motivo de reconocimiento de GnbR (Fig. 4.1.13C). Un posterior alineamiento de la secuencia de unión al DNA determinada para GnbR con el de otros promotores identificados experimentalmente con anterioridad, los cuales son regulados por reguladores transcripcionales de la familia GntR/HutC, reveló un núcleo conservado de 2T/2A en todos los operadores (Fig. 4.1.13C).

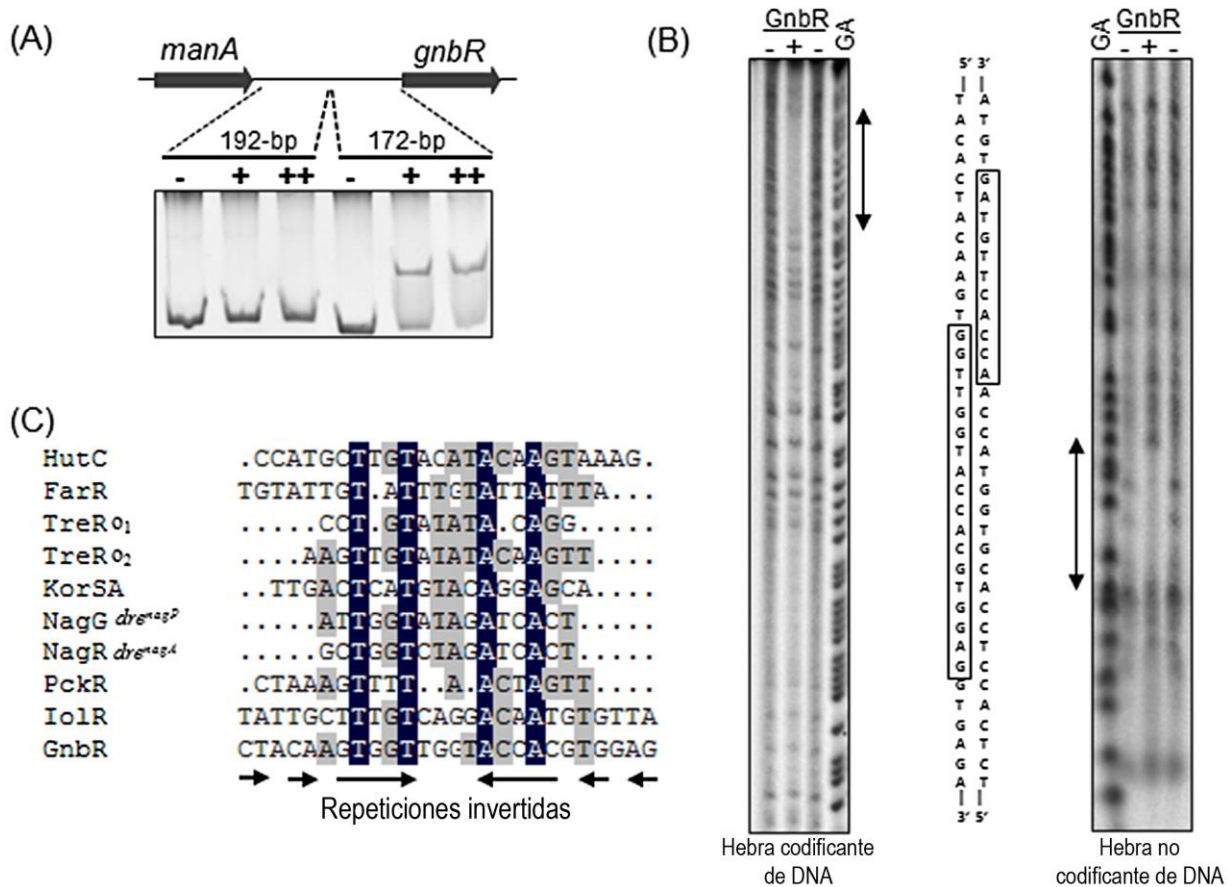


Fig. 4.1.13. A) Ensayo de cambio de movilidad electroforética en gel con los dos fragmentos de DNA (192-pb o 172-pb) que cubren la región intergénica entre los genes *manA* y *gnbR*, sin (-), con 2 μ g (+), o 5 μ g (++) de 6XHis-GnbR.

B) Análisis mediante “DNasa I footprinting” de la unión de 6XHis-GnbR a la región promotora del operón *gnb* (fragmento de 172-pb). Se muestra la digestión de ambas hebras de DNA, codificante y no codificante, en presencia (+) o ausencia (-) de 6XHis-GnbR. Las regiones protegidas por GnbR se indican con flechas verticales y las secuencias correspondientes se muestran dentro de los rectángulos verticales. GA, líneas con los productos de reacción de Maxam y Gilbert A+G.

C) Alineamiento de la región protegida por GnbR con regiones promotoras de la familia de reguladores transcripcionales GntR/HutC: HutC (Hu *et al.*, 1989); FarR (Quail *et al.*, 1994); TreR₀₁ y TreR₀₂ (Schock and Dahl, 1996); KorSA (Sezonov *et al.*, 2000); NagR^{dre^{nagP}} y NagR^{dre^{nagP}} (Bertram *et al.*, 2011); PckR (Hyeon *et al.*, 2012); IolR (Klaffl *et al.*, 2013). Las bases conservadas en todas las secuencias se marcan con fondo negro, y las conservadas en al menos cinco de las diez secuencias con fondo gris. Repeticiones invertidas en el sitio de unión de GnbR se encuentran marcadas con flechas.

Capítulo 4.2

Metabolismo de
lacto-N-triosa en
Lactobacillus casei



4.2.1 La β -N-acetilglucosaminidasa BnaG de *L. casei* es una proteína extracelular anclada a pared

El análisis del entorno genómico del operon *gnb*, descrito en el capítulo 4.1 de esta tesis, y responsable de la utilización de lacto-N-biosa (LNB), galacto-N-biosa (GNB) y N-acetil-galactosamina (GalNAc) en *L. casei* BL23, reveló la presencia de dos genes, uno llamado *bnag* (LCABL_02860) y otro llamado *manA* (LCABL_02870), anotados respectivamente como un hipotético precursor de β -N-acetilglucosaminidasa y una hipotética manosa-6P isomerasa (Fig. 4.2.1A). El análisis de la secuencia deducida de aminoácidos de *bnag* mostró un dominio proteico conservado GH20_DapB_LnbB (cd06564), desde el aminoácido 38 al 377 (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Este dominio catalítico está clasificado dentro de la familia 20 de glicosil hidrolasas de la “carbohydrate active enzyme classification” (GH20; <http://www.cazy.org>) y está presente en la dispersina B (DspB), la lacto-N-biosidasa (LnbB) y proteínas relacionadas. La dispersina B es una β -N-acetilglucosaminidasa soluble que hidroliza polímeros de GlcNAc unidos por enlaces β -(1,6) (Manuel *et al.*, 2007), y la lacto-N-biosidasa hidroliza lacto-N-tetraosa (LNT) liberando LNB y lactosa (Wada *et al.*, 2008). Previamente se ha descrito en BnaG un dominio de anclaje a la pared dependiente de sortasa en su extremo C-terminal, desde el aminoácido 533 al 569 (Munoz-Provencio *et al.*, 2012). Un análisis de la secuencia utilizando el programa SignalP (versión 4.0) (<http://www.cs.dtu.dk>) mostró además que BnaG contiene un péptido señal para secreción en su extremo N-terminal, desde el aminoácido 1 al 32. Para demostrar si el producto del gen *bnag* era el responsable de la actividad β -N-acetilglucosaminidasa presente en células enteras de *L. casei* BL23 (Munoz-Provencio *et al.*, 2012), se construyó una cepa mutante en *bnag* (BL380). Los resultados mostraron que la cepa parental BL23 posee una actividad β -N-acetilglucosaminidasa más alta cuando es cultivada en medio MRS basal suplementado con ribosa que cuando se cultiva en ese medio suplementado con glucosa (Tabla 4.2.1), confirmando las observaciones de estudios previos donde se demostró que la actividad N-acetilglucosaminidasa en *L. casei* estaba sujeta a represión catabólica por glucosa (Monedero *et al.*, 1997). La actividad β -N-acetilglucosaminidasa no solo fue encontrada en células enteras sino que también se encontró en los sobrenadantes de cultivo (Tabla 4.2.1), lo cual sugiere que parte de la enzima es liberada al medio de cultivo como enzima libre. Tanto las células enteras como los sobrenadantes de la cepa BL380 no presentaron actividad

β -N-acetilglucosaminidasa (Tabla 4.2.2), indicando que la proteína codificada por el gen *bnaG* es la responsable de la actividad β -N-acetilglucosaminidasa en *L. casei* BL23.

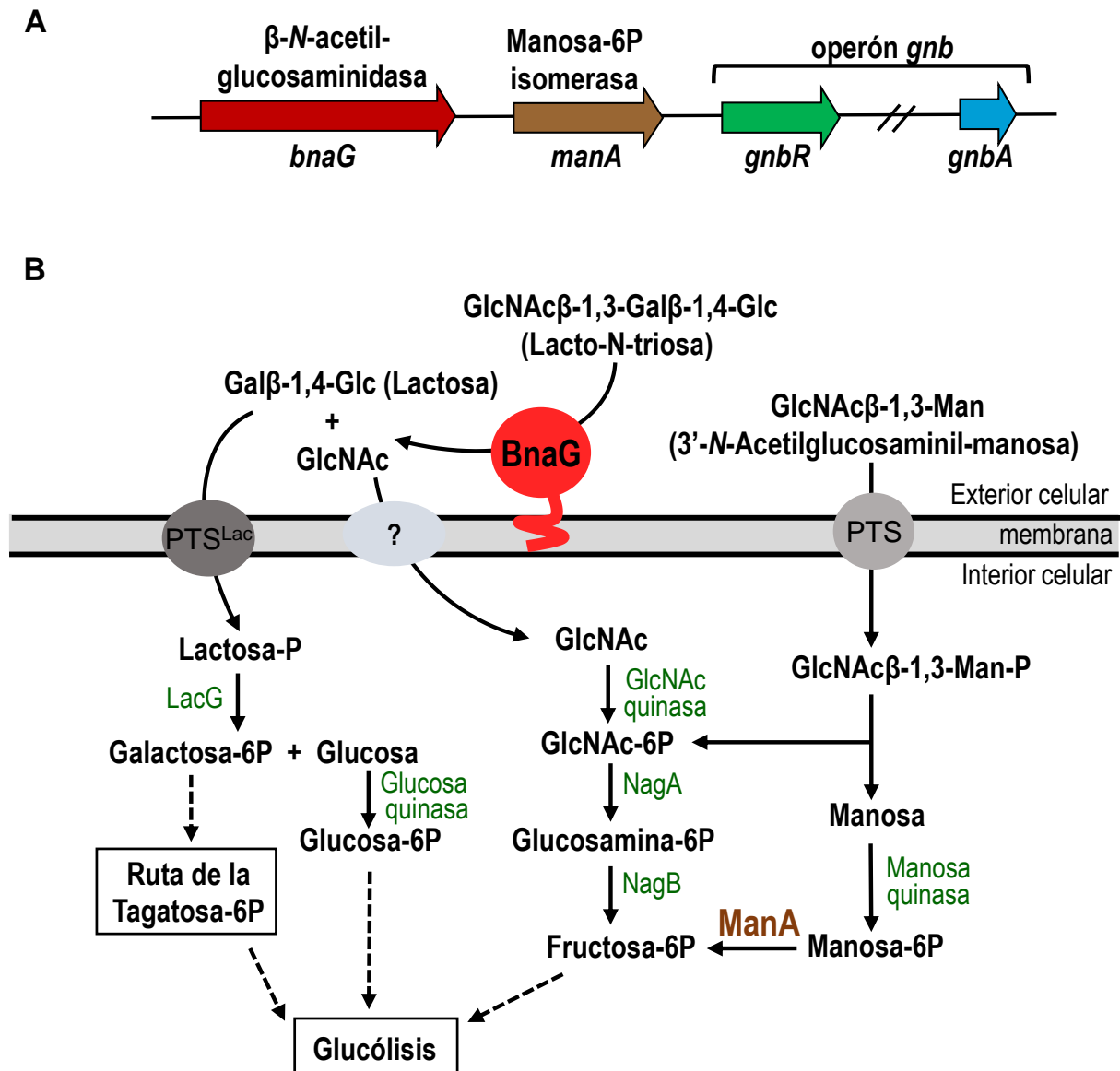


Fig. 4.2.1. A) Representación esquemática del fragmento de DNA de *L. casei* BL23 de 11,2 kpb por encima del operón *gnb*, donde se encuentra el precursor de la β -N-acetilglucosaminidasa y la manosa-6P –isomerasa. B) Representación esquemática de las rutas metabólicas propuestas para la lacto-N-triosa y la 3'-N-Acetilglucosaminil-manosa en *L. casei* BL23. PTS, sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato; GlcNAc, N-acetilglucosamina; Gal, galactosa; Man, manosa; LacG, fosfo- β -galactosidasa; NagA, N-acetilglucosamina-6P deacetilasa; NagB, Glucosamina-6P deaminasa.

Tabla. 4.2.1. Actividad β -N-acetilglucosaminidasa en células enteras y sobrenadantes de *L. casei* BL23 crecido en MRS de fermentación suplementado con glucosa o ribosa.

Cepas	*Actividad β -N-acetilglucosaminidasa (nmol/min/OD) en medio con:	
	Glucosa	Ribosa
Células enteras		
BL23 (WT)	0.223 \pm 0.015	2.962 \pm 0.011
BL380 (<i>bnag</i>)	0.0 \pm 0.013	0.0 \pm 0.015
Sobrenadantes		
BL23 (WT)	0.247 \pm 0.003	0.934 \pm 0.075
BL380 (<i>bnag</i>)	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

*La actividad β -N-acetilglucosaminidasa fue determinada con 4-NP-N-acetil- β -D-glucosaminido. Los valores representan la media de cuatro mediciones diferentes \pm la desviación estándar.

4.2.2 Especificidad de sustrato y características enzimáticas de la β -N-acetilglucosaminidasa BnaG de *L. casei* BL23

Para realizar la caracterización enzimática de la proteína BnaG, ésta se ha clonado y expresado en *E. coli* con una etiqueta de histidinas, sin el péptido señal en la región N-terminal y sin el dominio de anclaje a la pared celular del extremo C-terminal. La proteína purificada mostró un peso molecular de 55 kDa, que coincide con el peso molecular calculado para la proteína modificada 6xHis-BnaG (55.250 Da; Fig. 4.2.2).

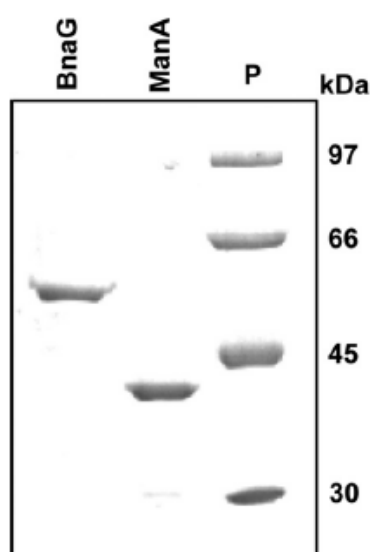


Fig. 4.2.2. Gel SDS-PAGE 10% teñido con “coomasie blue”, donde se observan las proteínas purificadas. BnaG (6xHis- β -N-acetilglucosaminidasa), y ManA (6xHis-Manosa-6P-isomerasa). P (marcador de peso molecular). Los números en la derecha corresponden a los pesos moleculares del marcador en kDa.

La enzima BnaG recombinante es capaz de hidrolizar *p*-NP-GlcNAc y el *o*-NP- β -D-galactopiranosido, sin embargo éste último es hidrolizado de forma ineficiente

(Tabla 4.2.2). A pesar del alto grado de homología (91% de identidad) encontrado entre la secuencia aminoacídica de BnaG y la β -N-acetilglucosaminidasa de *L. casei* ATCC 27092 (Senba *et al.*, 2000), la K_m , el pH óptimo y la temperatura óptima fueron diferentes. La K_m (6.4 μ M) de la enzima de la cepa ATCC 27092 muestra una afinidad por el sustrato *p*-NP-GlcNAc de 350 veces mayor que la de BnaG. Las modificaciones descritas arriba sobre la secuencia de la proteína BnaG purificada aquí podrían influir en las diferencias entre las dos β -N-acetilglucosaminidasas. De hecho la enzima de la cepa ATCC 27092 posee un peso molecular de 39 kDa, bastante menor al determinado para BnaG. Respecto a los oligosacáridos naturales, BnaG es capaz de hidrolizar lacto-N-triosa liberando GlcNAc y lactosa. Sin embargo no hidroliza ni LNT ni lacto-N-neotetraosa, las cuales poseen el mismo enlace glicosídico GlcNAc- β -1,3-lactosa, esto indica que BnaG tiene actividad exoglicosidasa pero no endoglicosidasa. BnaG también es capaz de degradar los disacáridos 3'-N-acetilglucosaminil-manosa, 3'-N-acetilgalactosaminil-galactosa, GNB y LNB, sin embargo los dos últimos son hidrolizados ineficientemente (Tabla 4.2.2). Estos resultados indican que la β -N-acetilglucosaminidasa BnaG de *L. casei* BL23 tiene alta especificidad por los enlaces glicosídicos β -(1,3), y dentro de estos, los azúcares con enlaces β -(1,3) a las N-acetilhexosaminas (GlcNAc y GalNAc) son mejores sustratos que los azúcares con las correspondientes hexosas (Glc y Gal).

4.2.3. *L. casei* BL23 fermenta la lacto-N-triosa y la hidroliza utilizando la β -N-acetilglucosaminidasa BnaG

Para determinar la capacidad de *L. casei* BL23 de metabolizar la lacto-N-triosa, 3'-N-acetilglucosaminil-manosa, y 3'-N-acetilgalactosaminil-galactosa, que eran sustratos *in vitro* para la BnaG, se analizó el perfil del crecimiento en MRS basal suplementado con 2 mM de cada uno de estos oligosacáridos de forma independiente. *L. casei* BL23 fue capaz de crecer utilizando lacto-N-triosa y 3'-N-acetilglucosaminil-manosa como fuentes de carbono (Fig. 4.2.3A). Por el contrario, la presencia de 3'-N-acetilgalactosaminil-galactosa generó una disminución en el crecimiento de la cepa en comparación con el crecimiento residual en el medio MRS basal sin suplementar (Fig. 4.2.3A), lo cual sugiere un efecto tóxico de este disacárido. En la misma gráfica se puede observar el control positivo, en este caso se utilizó el crecimiento de *L. casei*

Tabla. 4.2.2. Actividad y caracterización de BnaG.

Sustrato	Actividad
<i>p</i> -NP-N-acetil- β -D-glucosaminido	+
<i>o</i> -NP- β -D-galactopiranosido	+/-
<i>p</i> -NP- β -D-glucopiranosido	-
<i>o</i> -NP-1-thio- β -D-galactopiranosido	-
<i>p</i> -NP- β -D-glucuronido	-
<i>p</i> -NP- α -D-glucopiranosido	-
<i>p</i> -NP- α -D- galactopiranosido	-
<i>p</i> -NP- α -L- fucopiranosido	-
Lacto-N-triosa (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)	+
3'-N-Acetilglucosaminil-Manosa (GlcNAc β 1-3Man)	+
3'-N-Acetilgalactosaminil-Galactosa (GalNAc β 1-3Gal)	+
Galacto-N-biosa (Gal β 1-3GalNAc)	+/-
Lacto-N-biosa (Gal β 1-3GlcNAc)	+/-
Lacto-N-tetraosa (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)	-
Lacto-N-neotetraosa (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)	-
6'-Galactopiranosil-GlcNAc (Gal β 1-6GlcNAc)	-
4'-Manopiranosil-GlcNAc (Man β 1-4GlcNAc)	-
4'-Galactofuranosil-GlcNAc (Gal β 1-4GlcNAc)	-
Lactosa (Gal β 1-4Glc)	-
N-acetil-lactosamina (Gal β 1-4GlcNAc)	-
Lactulosa (Gal β 1-4Fru)	-
Maltosa (Glc α 1-4Glc)	-
Maltotriosa (Glc α 1-4Glc α 1-4Glc)	-
Caracterización	
V_{max} (μ mol (mg proteína/min)	33,3
K_m (mM)	2,3
pH óptimo	6,5
Temperatura óptima ($^{\circ}$ C)	53

Carbohidratos utilizados como sustrato: NP, nitrofenil; Glc, glucosa; Gal, galactosa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; GalNAc, N-acetilgalactosamina; Man, manosa; Fru, fructosa. El sustrato fue totalmente hidrolizado (+), parcialmente hidrolizado (+/-), o no se detectó actividad (-), después de 16 h de reacción en las condiciones descritas en “Materiales y Métodos”. La actividad enzimática fue determinada con 4-NP-N-acetil- β -D-glucosaminido.

BL23 en el medio suplementado con lactosa (Fig. 4.2.3A). La lacto-N-triosa resultó ser una fuente de carbono más eficiente en comparación a la lactosa o la 3'-N-acetilglucosaminil-manosa. En la gráfica se puede observar que el cultivo de *L. casei* en

presencia de lacto-N-triosa alcanzó una densidad óptica mayor, lo cual es coherente con la utilización de sus tres monosacáridos en lugar de los dos de la lactosa o la 3'-N-acetilglucosaminil-manosa.

Para determinar si la β -N-acetilglucosaminidasa BnaG estaba involucrada en la utilización de la lacto-N-triosa y la 3'-N-acetilglucosaminil-manosa, se cultivó la cepa mutante BL380 (*bnag*) en MRS basal suplementado con estos oligosacáridos como única fuente de carbono. El patrón de crecimiento de esta cepa en lacto-N-triosa fue similar al del control negativo crecido en medio de cultivo sin suplementar, indicando que BnaG es necesaria para la utilización de este trisacárido (Fig. 4.2.3B). Se analizó por HPLC el contenido en azúcares de los sobrenadantes del medio de cultivo de la cepa BL380 y se detectó la presencia de lacto-N-triosa, mientras que en la cepa parental BL23 este trisacárido es consumido por completo. En ésta última cepa los productos de la hidrólisis de lacto-N-triosa (GlcNAc y lactosa) también fueron consumidos. Los resultados presentados hasta aquí en este capítulo sugieren que BnaG es una enzima extracelular y que por lo tanto hidrolizaría la lacto-N-triosa fuera de las células en lactosa y GlcNAc.

Un análisis de las secuencias genómicas disponibles de las especies del género *Lactobacillus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>) mostró que el gen *bnag* se encuentra presente solo en las especies de *L. casei* y *L. paracasei*. Curiosamente este gen no está conservado en *L. rhamnosus*, que es una especie filogenéticamente relacionada con las anteriores. Con el objeto de analizar si esta última especie podía metabolizar la lacto-N-triosa, se cultivaron las cepas de *L. rhamnosus* BL327, BL358 y BL377 (CECT 288, HN001 y ATCC 53103 [GG], respectivamente) en MRS basal suplementado con 2 mM de este trisacárido (Fig. 4.2.3C). Los resultados han demostrado que las cepas BL327 y BL377 no metabolizan la lacto-N-triosa, pero la cepa BL358 si es capaz de crecer en este carbohidrato como fuente de carbono (Fig. 4.2.3C), sugiriendo que además de BnaG, las especies de lactobacilli tienen otras enzimas involucradas en el catabolismo de la lacto-N-triosa.

A pesar de que la 3'-N-acetilglucosaminil-manosa es un sustrato *in vitro* de BnaG, la tasa de crecimiento de la cepa BL380 en este disacárido ($0,120 \text{ h}^{-1}$) es similar a la de la cepa parental BL23 ($0,113 \text{ h}^{-1}$) (Fig. 4.2.3), sugiriendo que el metabolismo es independiente de esta glicosidasa. Esto coincide con los análisis por HPLC de los

azúcares presentes en los sobrenadantes de los cultivos, en los cuales no se detectó 3'-N-acetilglucosaminil-manosa en ninguna de las dos cepas. Para determinar si este disacárido es transportado por algún PTS al interior celular se determinó el patrón de crecimiento de la cepa BL126 (*ptsI*) (Viana et al., 2000) en presencia de este disacárido (Fig. 4.2.3D). Esta cepa mutante es incapaz de crecer utilizando 3'-N-acetilglucosaminil-manosa como fuente de carbono, indicando que su transporte en *L. casei* es dependiente de un sistema PTS.

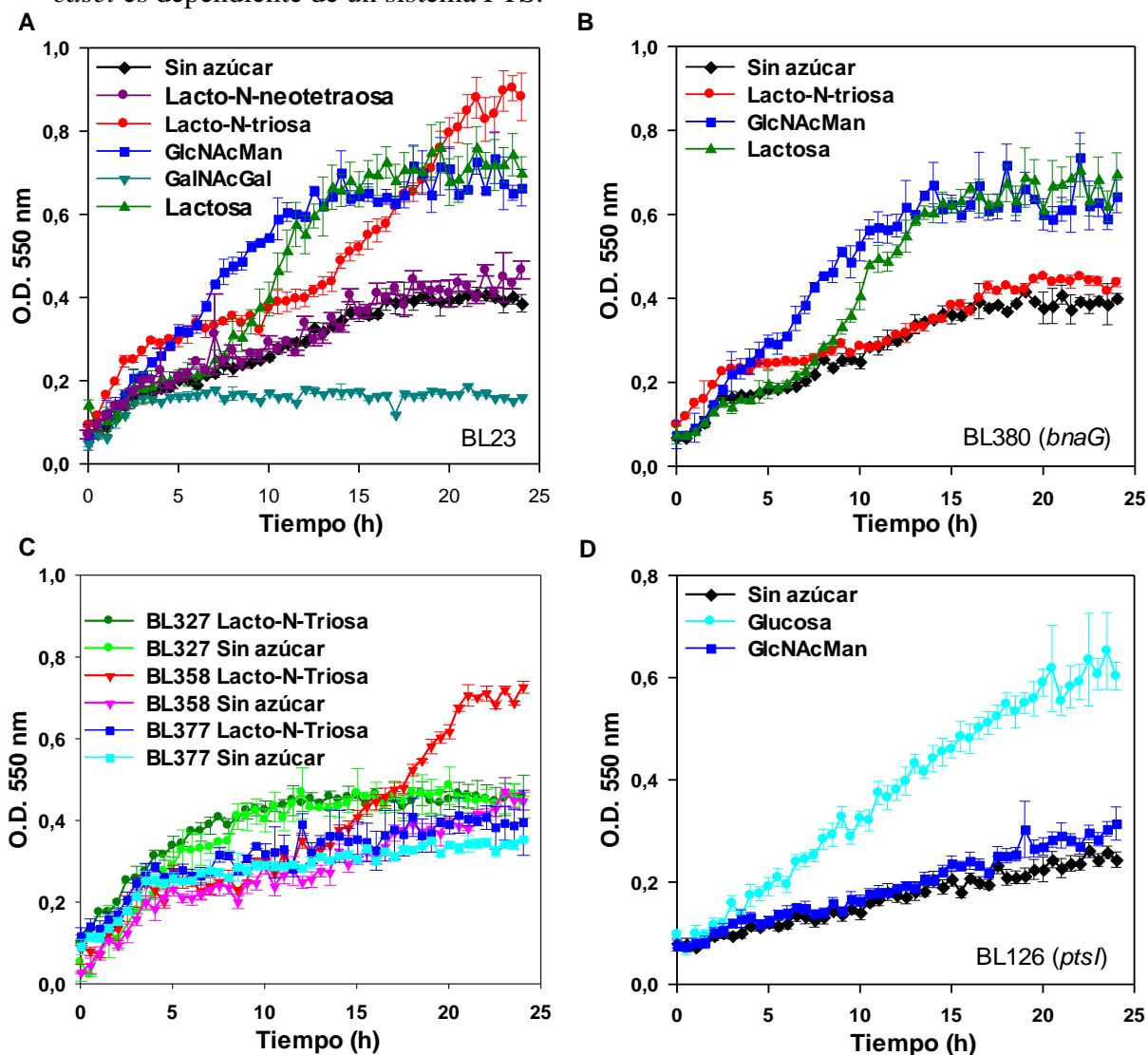


Fig. 4.2.3. Curvas de crecimiento de A) *L. casei* BL23 en MRS basal sin suplementar (negro) o suplementado con lacto-N-triosa (rojo), 3'-N-acetilglucosaminil-manosa (azul), 3'-N-acetilgalactosaminil-galactosa (cyan oscuro), lactosa (verde) o lacto-N-neotetraosa (violeta). B) *L. rhamnosus* BL327 en MRS basal sin suplementar (verde claro) o suplementado con lacto-N-triosa (verde oscuro), BL358 en MRS basal sin suplementar (rosa) o suplementado con lacto-N-triosa (rojo) y BL377 en MRS basal sin suplementar (celeste) o suplementado con lacto-N-triosa (azul). C) *L. casei* BL380 (*bnaG*) en MRS basal sin suplementar (negro) o suplementado con lacto-N-triosa (rojo), 3'-N-acetilglucosaminil-manosa (azul) o lactosa (verde). D) *L. casei* BL126 (*ptsI*) en MRS basal sin suplementar (negro) o suplementado con, 3'-N-acetilglucosaminil-manosa (azul) o glucosa (cyan). Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error.

4.2.4. La enzima ManA es necesaria para el metabolismo de manosa y del disacárido 3'-N-Acetilglucosaminil-manosa en *L. casei* BL23

Como se mostró anteriormente, la 3'-N-acetilglucosaminil-manosa es una fuente de carbón aprovechable por *L. casei* BL23, y como uno de sus monosacáridos constituyentes es manosa, hemos analizado si el gen *manA* estaba involucrado en el metabolismo de este disacárido. La secuencia deducida de aminoácidos de *manA* presenta un 53% y 48% de identidad con secuencias de las manosa-6P-isomerasas de tipo 1 caracterizadas (EC.5.3.1.8) en *Streptococcus mutans* (Sato *et al.*, 1993) y *Bacillus subtilis* (Yeom *et al.*, 2009), respectivamente. El gen *manA* de *L. casei* BL23 codifica para una proteína de 323 aminoácidos, sin péptido señal o secuencia de anclaje a la pared celular, que fue clonada y expresada en *E. coli*. La proteína purificada mediante una etiqueta de histidinas mostró un peso molecular de 37 kDa, que coincide con el peso molecular calculado para la proteína 6xHis-Man (36.815 Da; Fig. 4.2.2). La actividad enzimática de ManA fue analizada a través del seguimiento de la conversión de manosa-6P a fructosa-6P (Fig. 4.2.4), y se obtuvo una V_{max} de 1.11 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína/min, y una K_m de 2,78 mM.

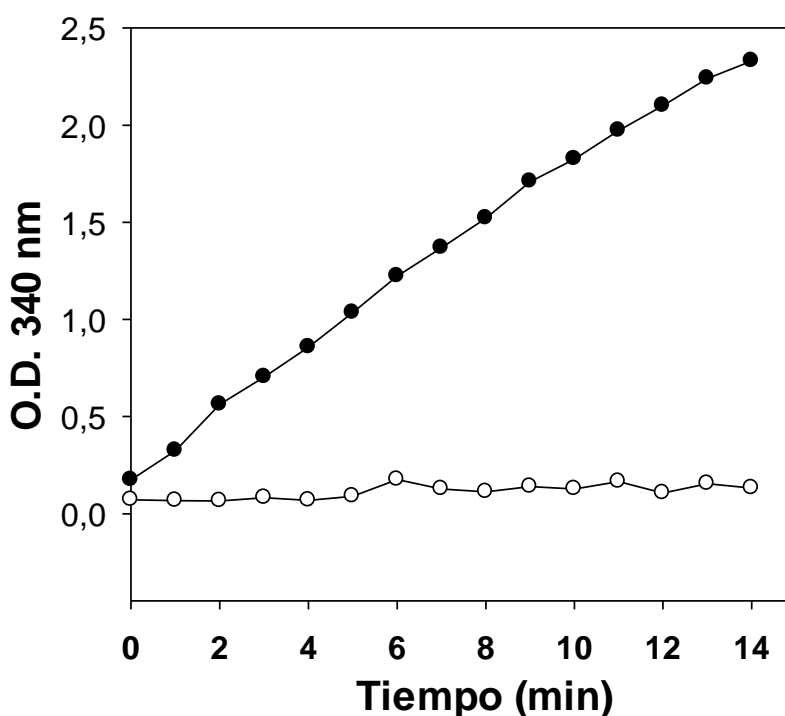


Fig. 4.2.4. Cinética de absorción de NADH determinada en el ensayo espectrofotométrico para determinar la actividad de la enzima ManA descrito en materiales y métodos. Sustratos: Manosa-6P (círculos llenos), o Fructosa-6P (círculos vacíos).

Para determinar si la manosa-6P isomerasa ManA estaba involucrada en el metabolismo de la 3'-N-acetilglucosaminil-manosa en *L. casei* BL23 se construyó la cepa BL381, un mutante en el gen *manA*. Esta cepa mostró una tasa de crecimiento ($0,064 \text{ h}^{-1}$) más baja que la cepa parental BL23 ($0,113 \text{ h}^{-1}$) en MRS basal suplementado con este disacárido (Fig. 4.2.5), indicando que el producto de *manA* participa en el metabolismo de la 3'-N-acetilglucosaminil-manosa en *L. casei* BL23. A pesar de esto, la manosa no fue detectada en los sobrenadantes de cultivo de la cepa BL381, lo cual concuerda con el hecho de que la densidad celular máxima alcanzada fue similar a la cepa parental BL23. La tasa de crecimiento de la cepa BL381 (*manA*) en MRS basal suplementado con manosa como fuente de carbono ($0,026 \text{ h}^{-1}$) fue menor que la del control negativo de la misma cepa crecido en el mismo medio sin suplementar ($0,038 \text{ h}^{-1}$) (Fig. 4.2.5B), indicando que ManA es necesaria para la utilización de manosa en *L. casei* BL23. Curiosamente, después de 24 horas de cultivo, la densidad óptica alcanzó un valor similar a la del control, lo cual indica que el crecimiento de la cepa BL381 fue recuperado. Estos resultados, junto con el perfil de crecimiento de la cepa BL381 en presencia de la 3'-N-acetilglucosaminil-manosa sugieren que el crecimiento sostenido por el consumo de la GlcNAc, podría permitir la expresión de otros genes implicados en el metabolismo de la manosa.

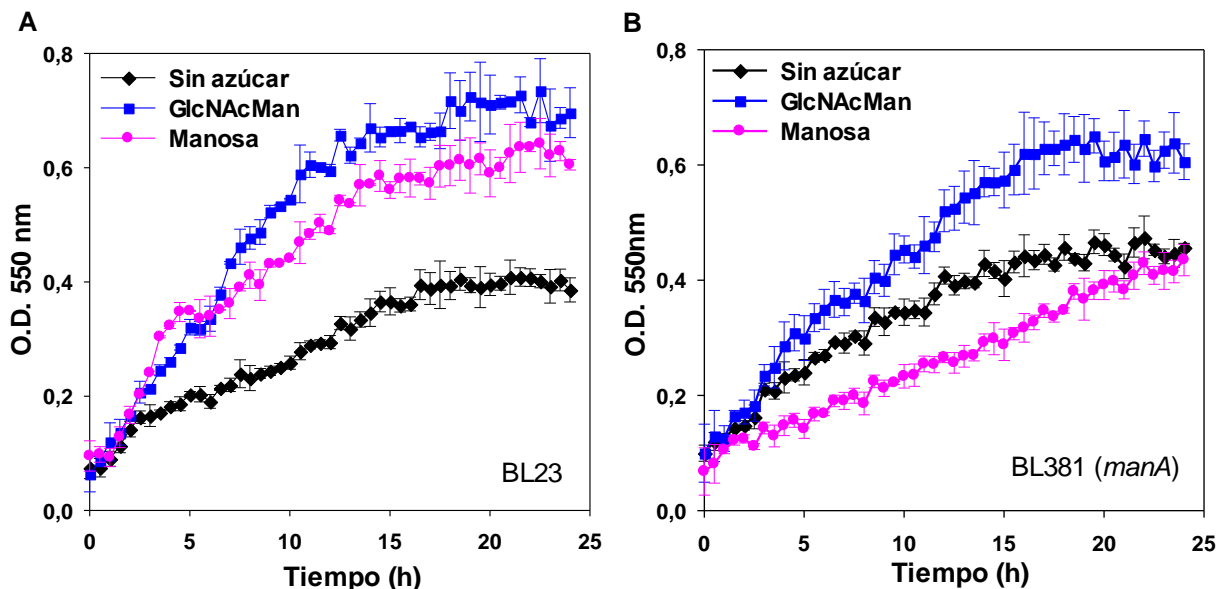


Fig. 4.2.5. Curvas de crecimiento de *L. casei* BL23 (A) y la cepa mutante BL381 ($\Delta manA$) (B), en MRS basal sin suplementar (negro) o suplementado con 3'-N-acetilglucosaminil-manosa (azul) o manosa (rosa). Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error.

Capítulo 4.3

Metabolismo de N-acetilactosamina en *Lactobacillus casei*



4.3.1. *L. casei* BL23 fermenta la N-acetilactosamina (LacNAc)

En los capítulos anteriores de esta Tesis se ha caracterizado la capacidad de la cepa *L. casei* BL23 de metabolizar la LNB, que constituye el núcleo de los OLH de tipo 1, la GNB, que es el núcleo principal de la O-glicosidación en glicoproteínas y la lacto-N-triosa, que forma parte de la estructura tanto de los OLH del tipo 1 como del tipo 2. En este capítulo se ha analizado en *L. casei* BL23 el metabolismo de la LacNAc, que constituye el núcleo de los OLH de tipo 2. Para ello se ha cultivado esta cepa en medio de cultivo MRS basal suplementado con 4 mM de LacNAc. Los resultados han demostrado que *L. casei* BL23 es capaz de crecer en presencia de este disacárido como fuente de carbono fermentable (Fig. 4.3.1). Como control positivo se utilizó el patrón de crecimiento de esta cepa en presencia de lactosa (Fig. 4.3.1). La densidad celular alcanzada por *L. casei* BL23 fue similar en ambos disacáridos, aunque el periodo de adaptación a los azúcares fue mayor en LacNAc que en lactosa.

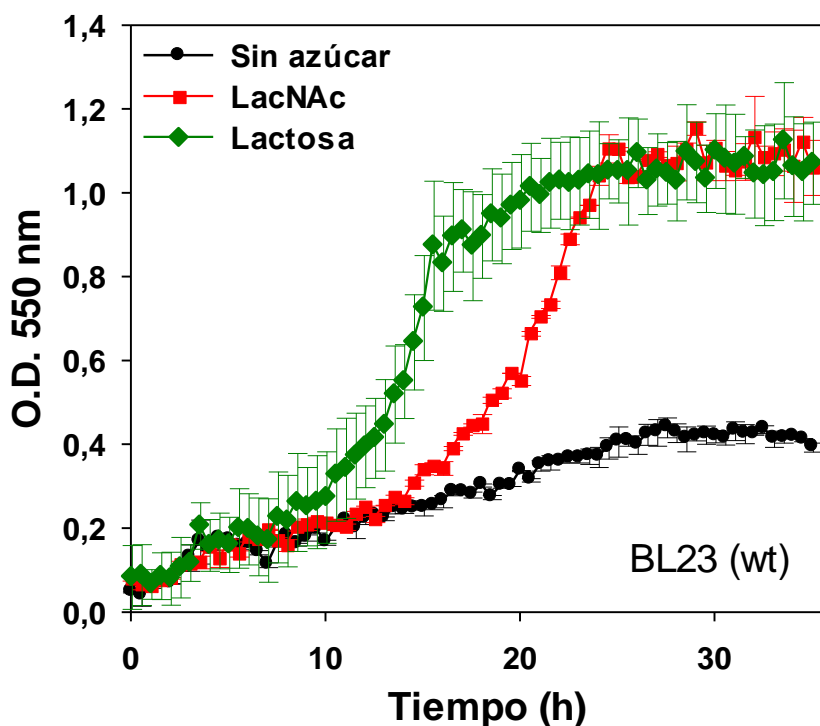


Fig. 4.3.1. Curvas de crecimiento de *Lactobacillus casei* BL23 en MRS basal sin suplementar (negro), suplementado con N-acetilactosamina (LacNAc) (rojo), o con lactosa (verde). Los datos están representados como la media de al menos tres réplicas. La desviación estándar está indicada con barras de error.

4.3.2. La LacNAc es transportada por el PTS de la lactosa

La mayoría de los PTS son específicos para un carbohidrato, sin embargo hay PTS que pueden transportar dos o más azúcares relacionados estructuralmente, este es el caso del PTS descrito en el primer capítulo de esta tesis y otros PTS que transportan β -glucósidos (Deutscher *et al.*, 2006; Le Coq *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 2011). Así que analizamos si la LacNAc (Gal β 1-4GlcNAc), que es estructuralmente similar a la LNB (Gal β 1-3GlcNAc), y a la lactosa (Gal β 1-4Glc), era transportada en *L. casei* BL23 por el PTS^{Gnb} (Fig. 4.1. 4A) o por el PTS^{Lac} (Fig. 4.3.2), implicados en el transporte de la LNB y lactosa, respectivamente. Se ensayó la capacidad de fermentar LacNAc en la cepa mutante BL385 (*gncC*) (Tabla 3.1), y las cepas BL153 (*lacE*) y BL155 (*lacF*) construidas previamente (Gosalbes *et al.*, 1999), y que son mutantes para las subunidades EIICB y EIADel PTS^{Lac}, respectivamente. La cepa BL385 fue capaz de crecer utilizando la LacNAc como fuente de carbono, de igual forma a la cepa parental BL23 (Fig. 4.3.3A). Por el contrario las cepas BL153 y BL155 no crecieron en presencia de LacNAc (Fig. 4.3.3 B y C). Se utilizó la glucosa como control positivo de crecimiento y lactosa como control negativo. El análisis del contenido en azúcares de los sobrenadantes demostró que en estas dos últimas cepas el disacárido no fue consumido, indicando que los dominios EIICB y EIAD codificados por *lacE* y *lacF* respectivamente, están involucrados en el transporte de la LacNAc. Se ha demostrado anteriormente que en *L. casei* el PTS puede llevar a cabo el transporte de carbohidratos sin estar acoplado a su fosforilación (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2012a), así que con el objeto de analizar la función del PTS^{Lac} en el transporte y fosforilación de la LacNAc, se determinó el patrón de crecimiento de la cepa BL126 (*ptsI*) (Viana *et al.*, 2000) en presencia de este disacárido (Fig.4.3.3D). Los resultados han demostrado que esta cepa mutante en la enzima I, que es un componente general de los sistemas PTS, es incapaz de crecer utilizando la LacNAc como fuente de carbono, sugiriendo que es internalizada como un derivado fosforilado. Como control positivo se ha cultivado la cepa BL126 en glucosa, y como control negativo en lactosa, ya que ésta es transportada únicamente por el sistema PTS en *L. casei* (Viana *et al.*, 2000) (Fig. 4.3.3D).

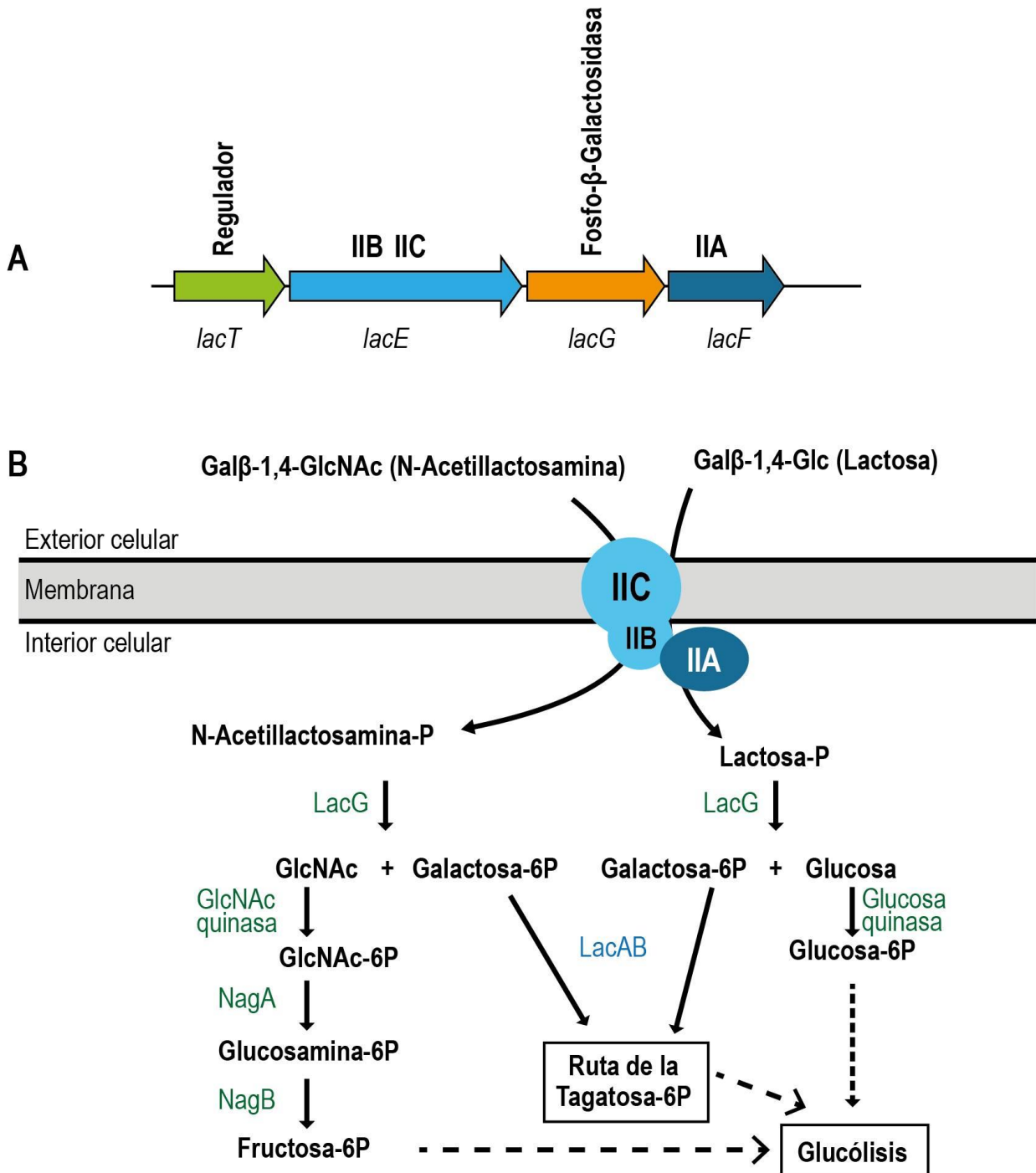


Fig. 4.3.2. A) Representación esquemática del operón *lac* en el cromosoma de *L. casei* BL23. Se indican los distintos genes. B) Representación esquemática de las rutas metabólicas de la lactosa y la N-acetil-lactosamina en *L. casei* BL23. IIB, IIC y IIA, subunidades del sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS); LacG, fosfo- β -galactosidasa; NagA, N-acetil-glucosamina deacetilasa; NagB, glucosamina-6P deaminasa; LacAB, galactosa-6P isomerasa

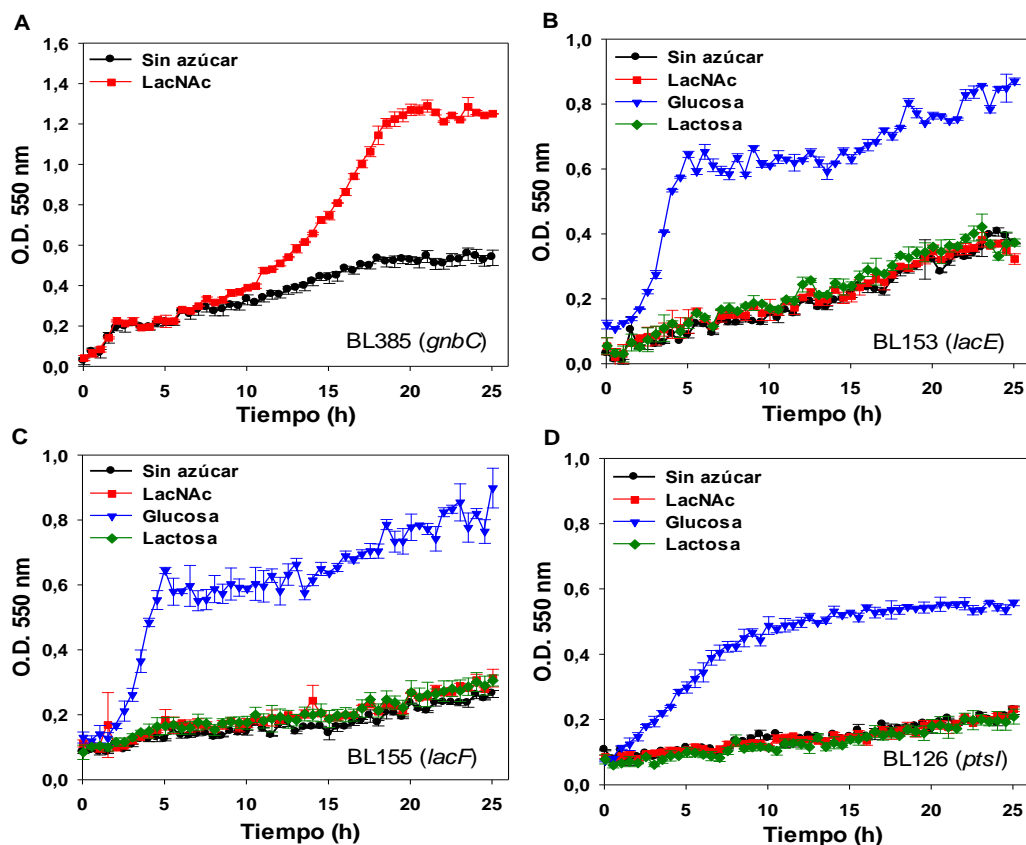


Fig. 4.3.3. Curvas de crecimiento de las cepas mutantes *Lactobacillus casei* BL385 (*gnbC*) (A), BL153 (*lacE*) (B), BL155 (*lacF*) (C), y BL126 (*ptsI*) (D), en MRS basal sin suplementar (negro) o suplementado con LacNAc (rojo), glucosa (azul) o lactosa (verde) como fuente de carbono. Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error.

4.3.3. LacG es la enzima responsable de hidrolizar LacNAc

Para determinar si la fosfo- β -galactosidasa LacG está involucrada en la utilización de la LacNAc en *L. casei* BL23 se construyó un mutante en el gen *lacG* (cepa BL400). Esta cepa se cultivó en medio MRS basal suplementado con 4 mM de LacNAc y los resultados demuestran un patrón de crecimiento en este sustrato comparable con el del control negativo (MRS basal sin suplementar con fuente de carbono) (Fig. 4.3.4). Tampoco se observó crecimiento en presencia de lactosa, único sustrato descrito anteriormente para el operón *lac* (Gosalbes *et al.*, 2000; Gosalbes *et al.*, 1997; Gosalbes *et al.*, 1999). Estos resultados sugieren que LacG es necesaria para la utilización de ambos disacáridos, siendo esta la responsable de la hidrólisis de los mismos. El análisis de la presencia de azúcares en los sobrenadantes del medio de cultivo de la cepa BL400 (*lacG*) detectó lactosa y LacNAc, respectivamente, mientras que no se detectaron en los sobrenadantes de la cepa parental BL23.

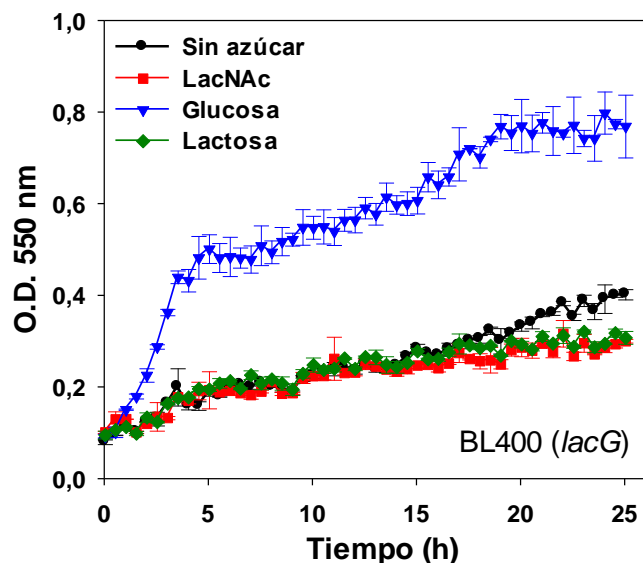


Fig. 4.3.4. Curvas de crecimiento de la cepa mutante *Lactobacillus casei* BL400 (*lacG*) en MRS basal sin suplementar (negro) o suplementado con LacNAc (rojo), glucosa (azul) o lactosa (verde) como fuente de carbono. Los datos están representados como la media de al menos tres réplicas. La desviación estándar está indicada con barras de error.

LacG (EC 3.2.1.85) pertenece a la familia 1 de glicosil hidrolasas (GH 1; <http://www.cazy.org>) y con el objeto de caracterizarla se expresó en *E. coli* y se purificó como una proteína con una etiqueta de histidinas. La proteína purificada mostró un peso molecular de 55 kDa de acuerdo con el calculado para la masa de la proteína más la etiqueta de histidinas (54,8 kDa; Fig. 4.3.4). La enzima 6xHis-LacG no presenta actividad sobre el sustrato *o*-NP- β -D-galactopiranosido, sin embargo si es capaz de hidrolizarlo cuando está fosforilado (Tabla 4.3.1). En este caso se ha determinado para el sustrato *o*-NP- β -D-galactopiranosido-6-fosfato una K_m de 3,03 mM y una V_{max} de 1,43 μ moles/min.mg proteína (Tabla 4.3.1). El enzima tiene un pH óptimo de 7,0 y una temperatura óptima de 41°C. 6xHis-LacG no fue capaz de hidrolizar ninguno de los oligosacáridos naturales ensayados, probablemente esto se deba a que esta enzima es específica para sustratos fosforilados.

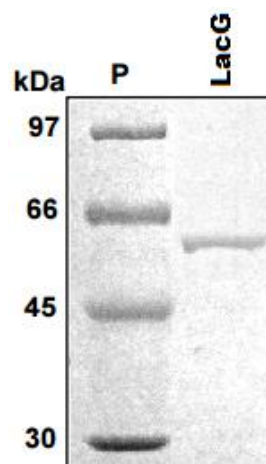


Fig. 4.3.4. Gel SDS-PAGE 10% teñido con azul de coomasie, donde se observa la proteína purificada 6xHis-LacG (LacG). P (marcador de peso molecular). Los números en la izquierda corresponden a los pesos moleculares del marcador en kDa.

Tabla. 4.3.1. Actividad y caracterización de 6xHis-LacG.

Sustrato	Actividad
<i>o</i> -NP- β -D-galactopiranosido	-
<i>p</i> -NP- β -D-glucopiranosido	-
<i>o</i> -NP-1-thio- β -D-galactopiranosido	-
<i>p</i> -NP- β -D-glucurónido	-
<i>p</i> -NP- <i>N</i> -acetil- β -D-glucosamínido	-
<i>p</i> -NP- α -D-glucopiranosido	-
<i>p</i> -NP- α -D-galactopiranosido	-
<i>p</i> -NP- α -L-fucopiranosido	-
<i>o</i> -NP- β -D-galactopiranosido-6-fosfato	+
Lacto-N-biosa (Gal β 1-3GlcNAc)	-
Galacto-N-biosa (Gal β 1-3GalNAc)	-
Lacto-N-tetraosa (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)	-
Lacto-N-neotetraosa (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)	-
3'-N-Acetilgalactosaminil-Gal (GalNAc β 1-3Gal)	-
3'-N-Acetilglucosaminil-Man (GlcNAc β 1-3Man)	-
4'-Galactofuranosil-GlcNAc (Gal β 1-4GlcNAc)	-
Fucosil- α 1-3GlcNAc	-
Lactosa (Gal β 1-4Glc)	-
N-acetil-lactosamina (Gal β 1-4GlcNAc)	-
Lactulosa (Gal β 1-4Fru)	-
Maltosa (Glc α 1-4Glc)	-
Maltotriosa (Glc α 1-4Glc α 1-4Glc)	-
Caracterización	
V_{max} (μ mol (mg proteína ⁻¹ min ⁻¹))	1,43
K_m (mM)	3,03
pH óptimo	7,0
Temperatura óptima (°C)	41

Carbohidratos utilizados como sustrato: NP, nitrofenil; Glc, glucosa; Gal, galactosa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; GalNAc, N-acetilgalactosamina; Man, manosa; Fru, fructosa. El sustrato fue totalmente hidrolizado (+), parcialmente hidrolizado (+/-), o no se detectó actividad (-), después de 16 h de reacción en las condiciones descritas en “Materiales y Métodos”. La caracterización enzimática (V_{max} , K_m , pH óptimo y temperatura) fue realizada utilizando *o*-NP- β -D-galactopiranosido-6-fosfato.

4.3.4. Participación de la ruta de la Tagatosa-6P en el metabolismo de lactosa y LacNAc en *L. casei*

Los resultados mostrados anteriormente sugieren que al igual que la lactosa, la LacNAc es transportada y fosforilada por el PTS^{Lac} y posteriormente hidrolizada por la fosfo- β -galactosidasa LacG en GlcNAc y Gal-6P (Fig. 4.3.2B). Está aceptado que la

Gal-6P, generada durante el transporte de galactosa por el PTS^{Gal} o del metabolismo de la lactosa, es metabolizada por la ruta de la Tag-6P en *L. casei* (Alpert and Siebers, 1997; Bettenbrock *et al.*, 1999), sin embargo esto nunca ha sido investigado a nivel genético. Para demostrar si la Gal-6P generada durante el catabolismo de la lactosa y de la LacNAc se metaboliza a través de la ruta de la tagatosa-6P se ha utilizado la cepa mutante BL393 (*lacAB*) descrita en el capítulo 4.1 y que es deficiente en la Gal-6P isomerasa. Esta cepa mostró unas tasas de crecimiento en lactosa ($0,029 \text{ h}^{-1}$) y en LacNAc ($0,031 \text{ h}^{-1}$) menores que la cepa parental BL23 en estos disacáridos ($0,101 \text{ h}^{-1}$ y $0,052 \text{ h}^{-1}$, respectivamente) (Fig. 4.3.5). Estos resultados sugieren que la galactosa liberada durante el catabolismo de la lactosa y la LacNAc en *L. casei* BL23 se lleva a cabo a través de la ruta de la Tag-6P, y que el crecimiento observado en la cepa BL393 (*lacAB*) en estos disacáridos se debe al metabolismo de la glucosa o GlcNAc, resultantes de la hidrólisis de la lactosa o la LacNAc, respectivamente.

4.3.5. Participación de *nagA* en el metabolismo de LacNAc en *L. casei*

Con el objeto de investigar la ruta metabólica de la GlcNAc liberada durante el catabolismo de la LacNAc en *L. casei*, se ha analizado si el gen *nagA*, que codifica para la GlcNAc-6P deacetilasa, está implicado en su metabolismo. Para ello se ha analizado el crecimiento de la cepa mutante BL388 (*nagA*), descrita en el capítulo 4.1, en medio MRS basal suplementado con 4 mM de LacNAc. Los resultados demostraron para esta cepa una tasa de crecimiento en LacNAc ($0,043 \text{ h}^{-1}$) menor que la cepa parental BL23 ($0,052 \text{ h}^{-1}$) (Fig. 4.3.5), sugiriendo que *nagA* está implicado en el metabolismo de la GlcNAc resultante de la hidrólisis del disacárido.

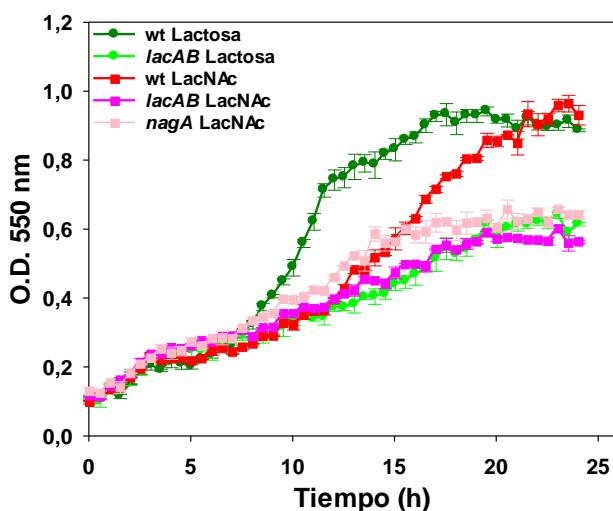


Fig. 4.3.5. Curvas de crecimiento de *Lactobacillus casei* BL23 (wt) en MRS basal suplementado con lactosa (verde oscuro) o LacNAc (rojo) como fuente de carbono, la cepa mutante *L. casei* BL393 (*lacAB*) en MRS basal suplementado con lactosa (verde), o LacNAc (fucsia), como fuente de carbono, y la cepa mutante *L. casei* BL388 (*nagA*) en MRS basal suplementado con LacNAc (rosa). Los datos están representados como la media de al menos tres réplicas. La desviación estándar está indicada con barras de error.

4.3.6. El antiterminador transcripcional LacT está implicado en el metabolismo de la LacNAc en *L. casei* BL23

El operón *lac* de *L. casei* BL23 está sujeto a la inducción por lactosa a través de un mecanismo de antiterminación transcripcional, en el cual el antiterminador LacT está regulado negativamente por las enzimas EII^{Lac} involucradas en el transporte de la lactosa (Gosalbes *et al.*, 2002). Con el objeto de analizar la implicación de LacT en el metabolismo de LacNAc, se cultivó la cepa mutante BL195 (*lacT*) (Gosalbes *et al.*, 2002) en medio MRS basal suplementado con LacNAc. Se utilizaron cultivos en presencia de glucosa y lactosa como controles positivo y negativo, respectivamente. Los resultados demostraron que esta cepa mutante exhibía un crecimiento en presencia de LacNAc comparable al del control negativo (Fig. 4.3.6), confirmando que el antiterminador transcripcional LacT, que regula la expresión del operon *lac*, está involucrado en el metabolismo de la LacNAc.

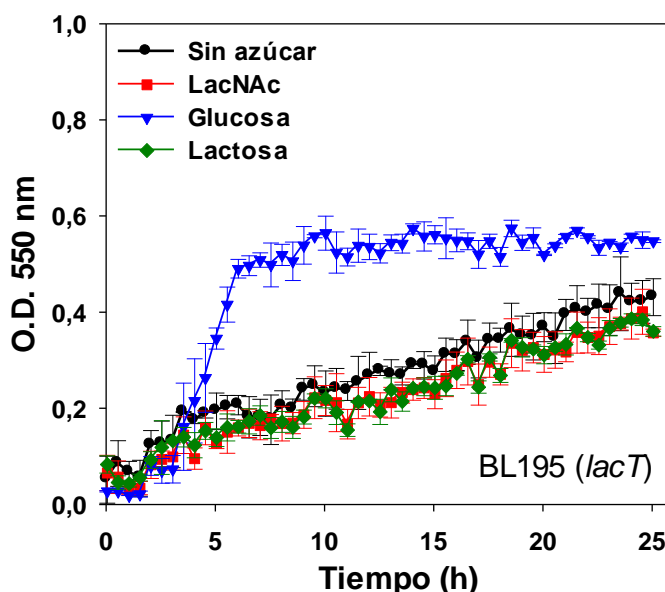


Fig. 4.3.6. Curvas de crecimiento de la cepa mutante *Lactobacillus casei* BL195 (*lacT*) en MRS basal sin suplementar (negro) o suplementado con LacNAc (rojo), glucosa (azul) o lactosa (verde) como fuente de carbono. Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error.

4.3.7. Análisis transcripcionales del operón *lac* mediante RT-qPCR.

Análisis de Northern blot han demostrado previamente que el operón *lacTEGF* (Fig. 4.3.2A) en *L. casei* BL23 está inducido por lactosa y reprimido por glucosa (Gosalbes *et al.*, 1999). Para comprobar si la transcripción de los genes *lac* está también

regulada por la LacNAc se han realizado análisis de RT-qPCR a partir de RNA aislado de cultivos de *L. casei* BL23 en medio MRS basal suplementado con galactosa, GlcNAc, glucosa, LacNAc o LacNAc + glucosa (Fig. 4.3.7). Para confirmar por RT-qPCR los resultados obtenidos previamente por Northern blot se ha utilizado también RNA de cultivos en presencia de lactosa y lactosa + glucosa. Tomando como referencia los niveles de los transcritos de células cultivadas en glucosa, los genes *lacT*, *lacE*, *lacG*, y *lacF* fueron inducidos por LacNAc y por lactosa. Los niveles de inducción fueron del rango de 130 a 320 veces y de 100 a 200 veces en LacNAc y lactosa respectivamente (Fig. 4.3.7). Por el contrario, no se observa un aumento de la expresión de los genes *lac* en las mezclas de estos disacáridos con glucosa. Estos resultados indican que el operon *lac* está inducido por LacNAc, y confirman los resultados previos de su inducción por lactosa y represión catabólica por glucosa. En presencia de los monosacáridos constituyentes galactosa o GlcNAc, la expresión no aumenta en ninguno de los genes *lac*, lo cual demuestra que es el disacárido y no los monosacáridos resultantes de su hidrólisis el responsable de la inducción del operon *lac*.

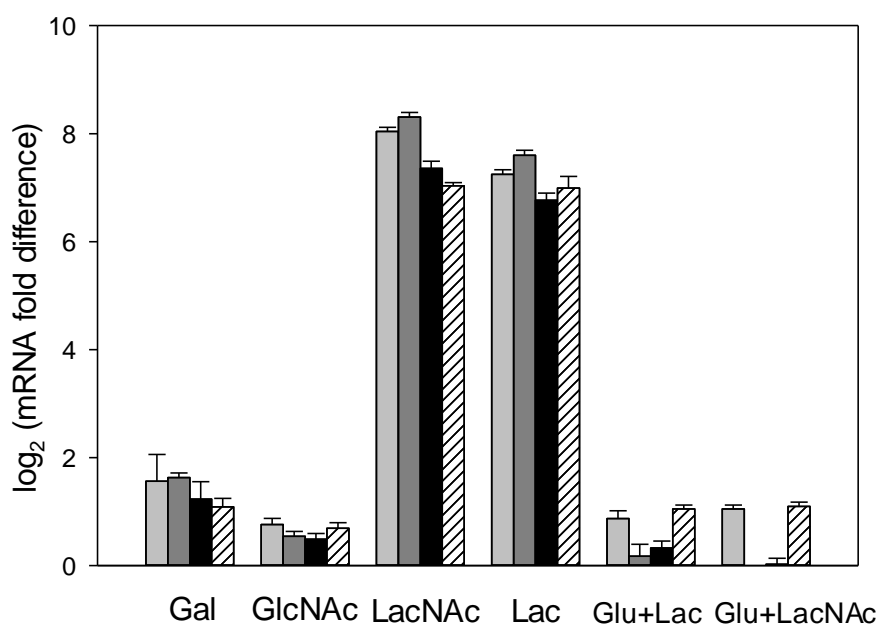


Fig. 4.3.7. Análisis transcripcional por RT-qPCR de *lacT* (barras gris claro), *lacE* (gris oscuro), *lacG* (negras), y *lacF* (líneas diagonales), en *L. casei* BL23 crecido en MRS basal suplementado con Gal, GlcNAc, LacNAc, Lac, Glu+Lac y Glu+LacNAc. Se utilizó como referencia los niveles de expresión de *L. casei* BL23 crecida en MRS basal suplementado con glucosa. Datos representados como la media de tres réplicas de al menos dos muestras biológicas independientes. Error estándar indicado con

Capítulo 4.4

Síntesis y purificación
de lacto-N-biosa y
galacto-N-biosa:
evaluación de su
potencial prebiótico
e inmunomodulador



4.4.1. Actividad de transglucosidación de la fosfo- β -galactosidasa GnbG

La fosfo- β -galactosidasa GnbG de *Lactobacillus casei* BL23 ha sido descrita en el capítulo 4.1 de esta tesis y los resultados demostraron que esta enzima es capaz de hidrolizar LNB y GNB. La especificidad de sustrato de esta enzima nos ha llevado a plantear la posibilidad de utilizar GnbG en reacciones de transglucosidación para sintetizar estos disacáridos. La actividad de transglucosidación de 6xHis-GnbG se ha evaluado utilizando *o*-NP- β -D-galactopiranosido (*o*-NPG) como sustrato donador y GlcNAc o GalNAc como sustratos aceptores. Los análisis por HPLC de las reacciones sugirieron que se estaban sintetizando disacáridos en cada reacción de transglucosidación cuyos tiempos de retención coincidían con los estándares de LNB y GNB, respectivamente. Para analizar la cinética de la transglucosidación por 6xHis-GnbG se tomaron muestras a diferentes tiempos durante las reacciones y se determinó la presencia de LNB o GNB (Fig. 4.4.1). Los rendimientos máximos se obtuvieron a las 3 h de reacción y fueron de 69 ± 4 % para LNB y 71 ± 1 % para GNB, respecto al *o*-NPG utilizado.

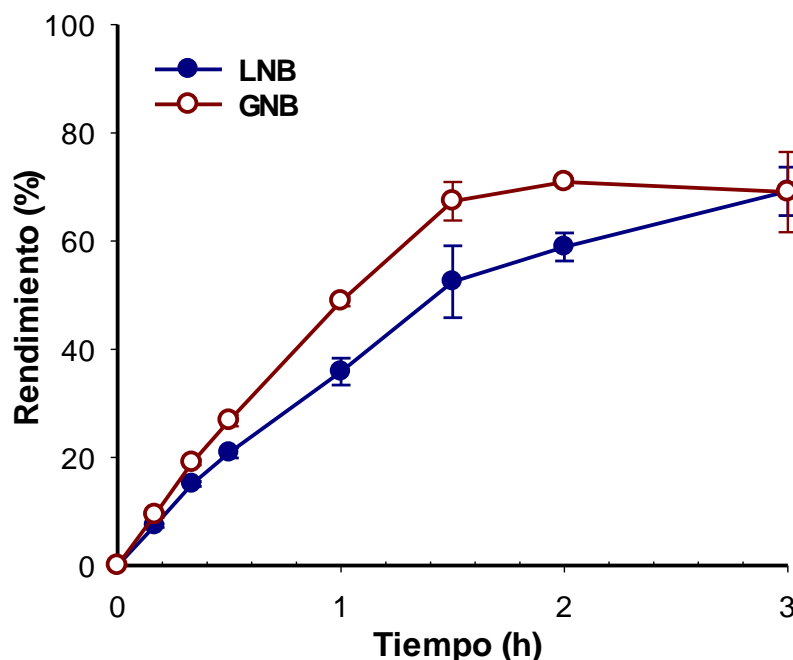


Fig. 4.4.1. Síntesis de lacto-*N*-biosa (círculos llenos) y galacto-*N*-biosa (círculos vacíos) mediante transglucosidación catalizada por la fosfo- β -galactosidasa GnbG de *L. casei* BL23. El rendimiento se expresa como porcentaje respecto a la concentración del sustrato donador *o*-NPG (40 mM).

4.4.2. Síntesis y purificación de lacto-N-biosa (LNB) y galacto-N-biosa (GNB) a escala preparativa

Las reacciones de transglicosidación para sintetizar LNB y GNB se escalaron desde μl a ml según las condiciones descritas en la sección de Materiales y Métodos. Ambas reacciones, utilizando GlcNAc o GalNAc como sustratos aceptores respectivamente, fueron inyectadas en una columna cromatográfica de exclusión iónica de $250 \times 21,2 \text{ mm}$ (escala semi-preparativa) y las fracciones correspondientes de LNB y GNB fueron recolectadas (Fig. 4.4.2.). Los rendimientos máximos obtenidos fueron de $10.7 \pm 0.2 \text{ g/l}$ de LNB y $10.8 \pm 0.3 \text{ g/l}$ de GNB.

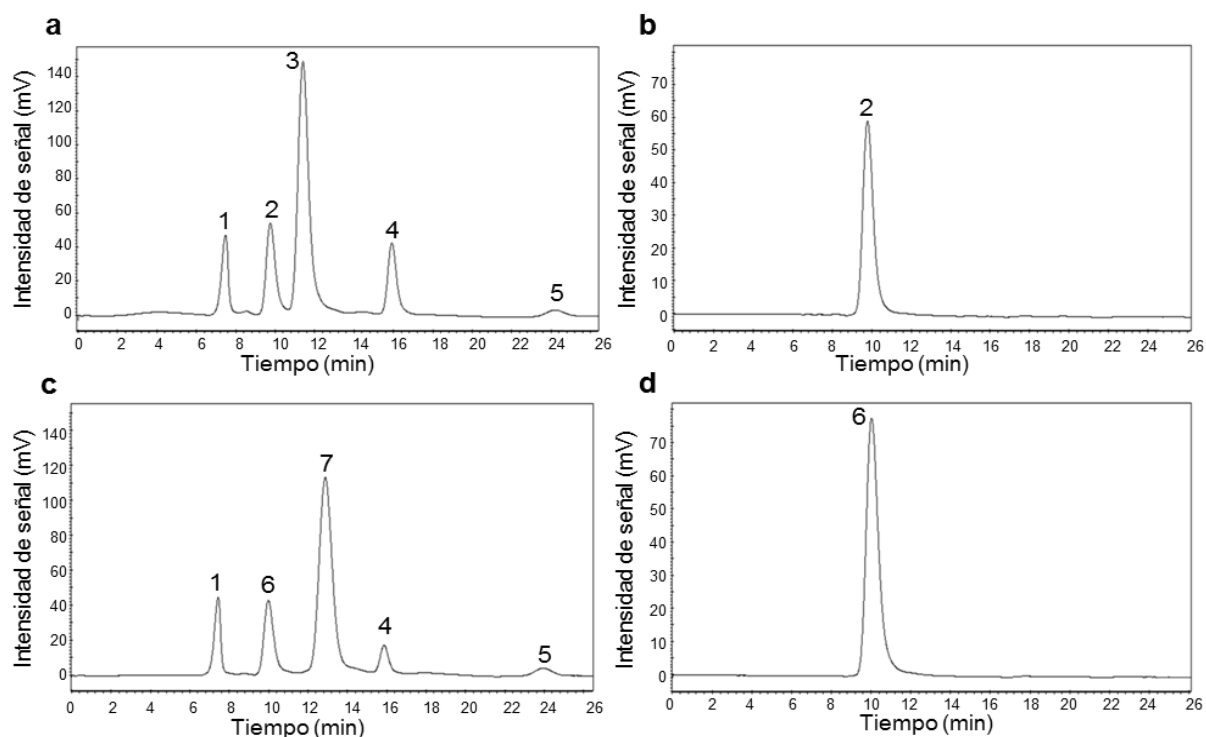


Fig. 4.4.2. Cromatogramas de HPLC de los productos de reacción de las reacciones de transglicosidación de GnbG utilizando GlcNAc (a) o GalNAc(c) como sustratos aceptores; Cromatogramas de HPLC de las fracciones recolectadas con la columna semi-preparativa correspondientes a LNB (b) y GNB (d). 1. Tris-HCL; 2. Lacto-N-biosa; 3. GlcNAc; 4. Glicerol; 5. O-NPG; 6. Galacto-N-biosa; 7. GalNAc

Para verificar la estructura y la pureza de los disacáridos sintetizados en el laboratorio (LNB y GNB) se analizaron mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), y se las comparó con los disacáridos disponibles comercialmente de LNB y GNB (Fig. 4.4.3 y Fig. 4.4.4). El análisis de los espectros

HSQC 1D ^1H y 2D ^1H - ^{13}C (Fig. 4.4.3) mostró valores de desplazamiento químico ^1H y ^{13}C idénticos entre los disacáridos purificados y los comerciales. Además, los experimentos TOCSY 2D (Fig. 4.4.4) mostraron exactamente los mismos patrones de acoplamiento de “spin” entre los disacáridos sintetizados y los estándares comerciales. El conjunto de estos análisis confirmó las estructuras de la LNB y GNB sintetizadas en el laboratorio, a la vez que demostró la ausencia de estereoisómeros o subproductos de la reacción en las muestras purificadas.

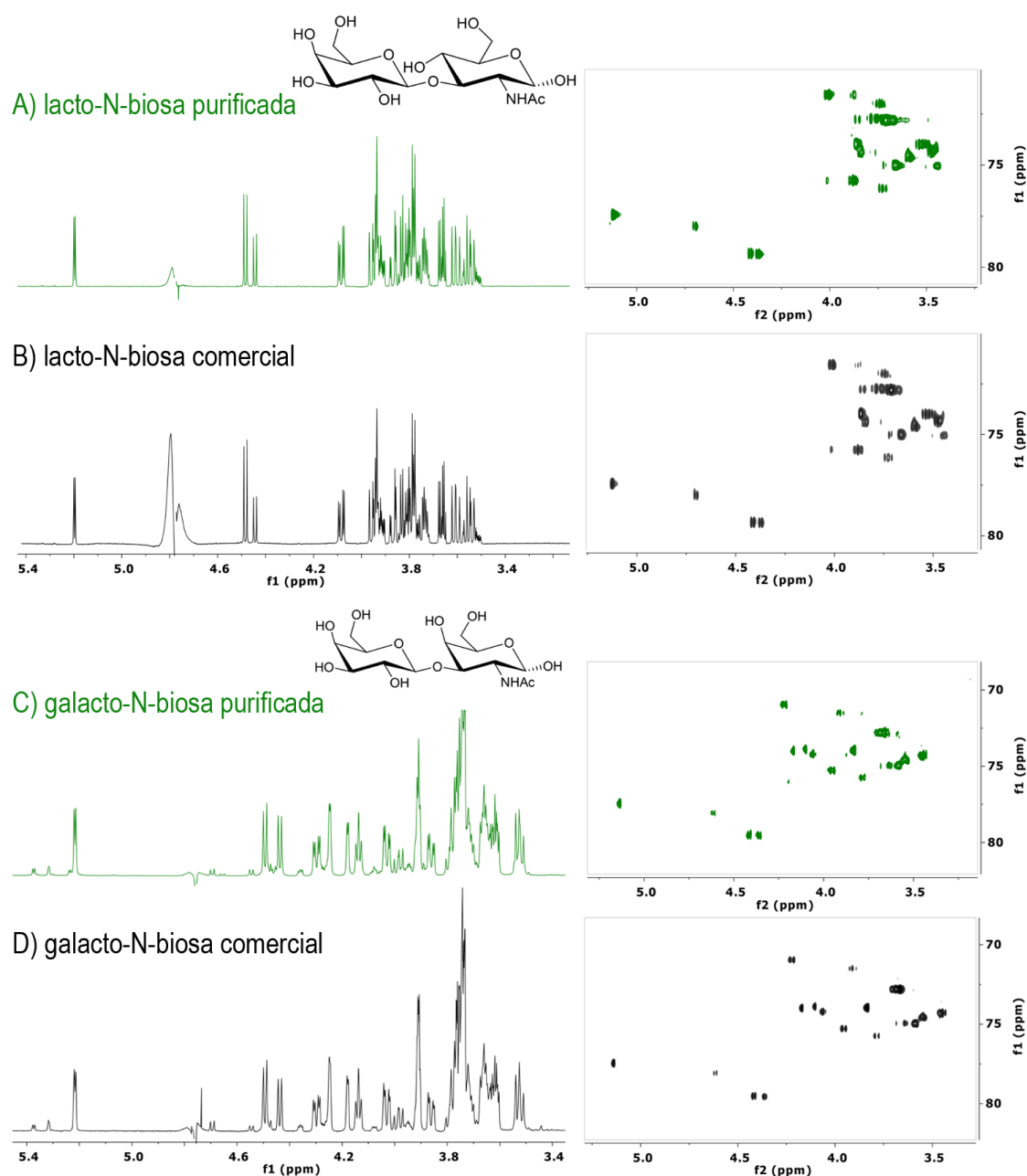


Fig. 4.4.3. Espectros de coherencia cuántica única heteronuclear 1D y 2D de NMR adquiridos a 600 MHz y 27°C ^1H - ^{13}C de LNB sintetizada y purificada (A), LNB comercial (B), GNB sintetizada y purificada (C) y GNB comercial (D).

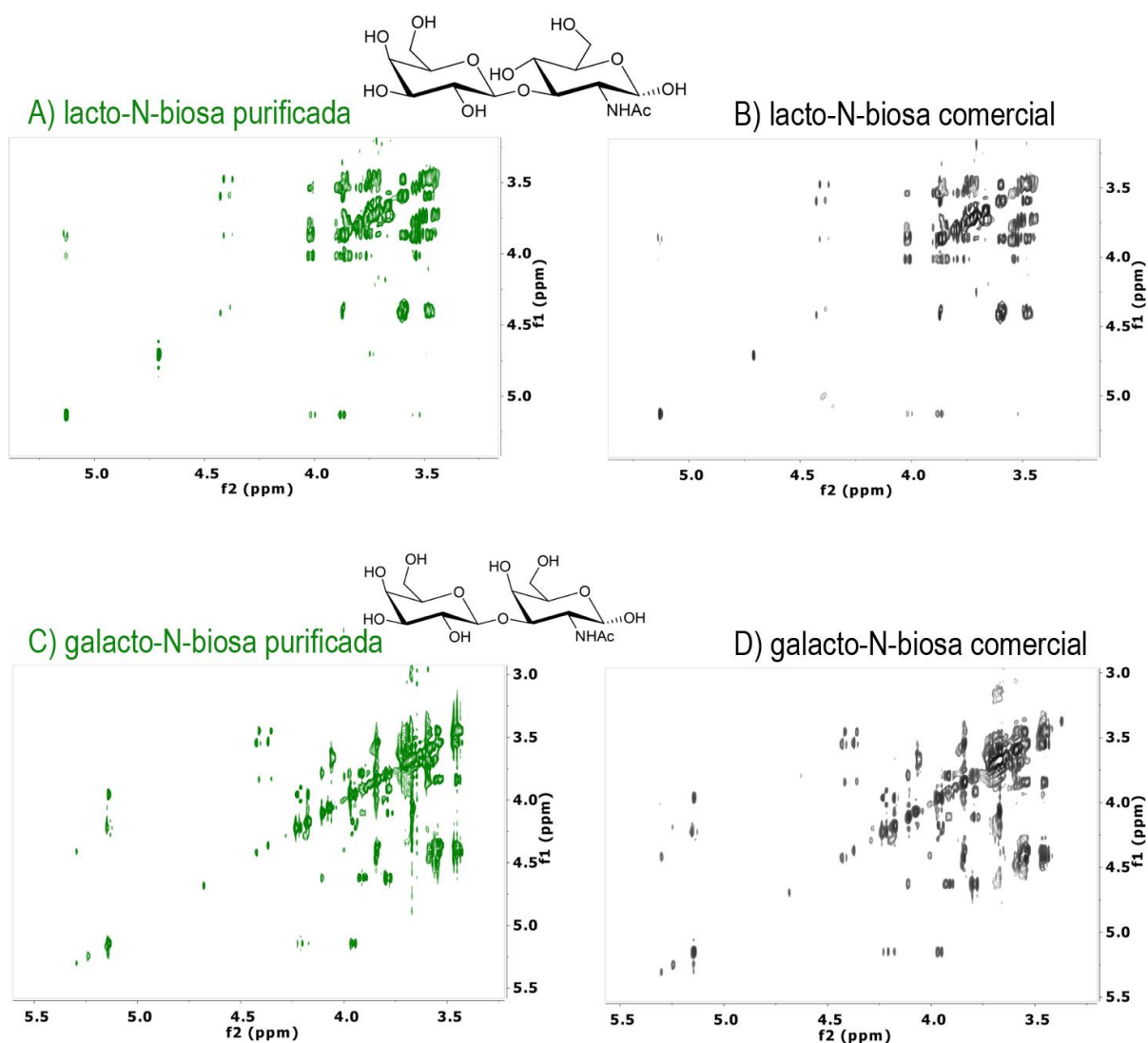


Fig. 4.4.4. Correlación espectroscópica total 2D (TOCSY) de NMR adquiridas a 600MHz y 27°C ^1H - ^{13}C de LNB sintetizada y purificada (A), LNB comercial (B), GNB sintetizada y purificada (C) y GNB comercial (D).

4.4.3. Construcción de una variante de la enzima GnbG por mutagénesis dirigida

Con el objeto de conocer la interacción de los substratos con GnbG y diseñar una enzima con un potencial de transgalactosidación mejorado, se determinó la estructura tridimensional de la enzima GnbG mediante difracción de Rayos X sobre cristales producidos a partir de dicho enzima en la Unidad de Cristalografía de Moléculas del Instituto de Biomedicina de Valencia. Los resultados obtenidos por el Dr. Alberto Marina (Anexo I) están incluidos aquí por aportar información valiosa acerca de la enzima GnbG caracterizada en este trabajo.

El análisis de la estructura tridimensional de GnbG (Anexo I) reveló que los tres residuos carboxi terminales de ácido glutámico (Glu596, Glu597 y Glu598) podrían desempeñar un papel importante en la actividad catalítica de este enzima. Así que se construyó un enzima mutante (6xHis-GnbGMutEnd) con esos tres residuos delecionados. La estructura tridimensional de la enzima mutante también fue determinada (Anexo I). Esta enzima se expresó en *E. coli*, se purificó y se ensayó su actividad hidrolítica. 6xHis-GnbGMutEnd presentó una velocidad máxima (V_{max}) para la actividad hidrolítica de 0,4 micromoles/min/mg de proteína frente a 1,7 micromoles/min/mg de proteína de la enzima silvestre, mostrando una reducción del 76% en la actividad hidrolítica.

Posteriormente se ensayó la síntesis de LNB y GNB por la glicosidasa 6xHis-GnbGMutEnd, y se comparó respecto a la enzima silvestre. En las condiciones de reacción ensayadas (ver materiales y métodos) 6xHis-GnbGMutEnd presentó un rendimiento máximo del 72% para la síntesis de LNB (Fig. 4.4.5A) y del 76% (Fig. 4.4.5B) para GNB respecto al substrato donador. Los resultados demostraron que los productos sintetizados, tanto LNB como GNB, son más estables a lo largo del tiempo en la reacción catalizada con la enzima mutante que con la parental, debido probablemente a que la mutante presenta una actividad hidrolítica más baja.

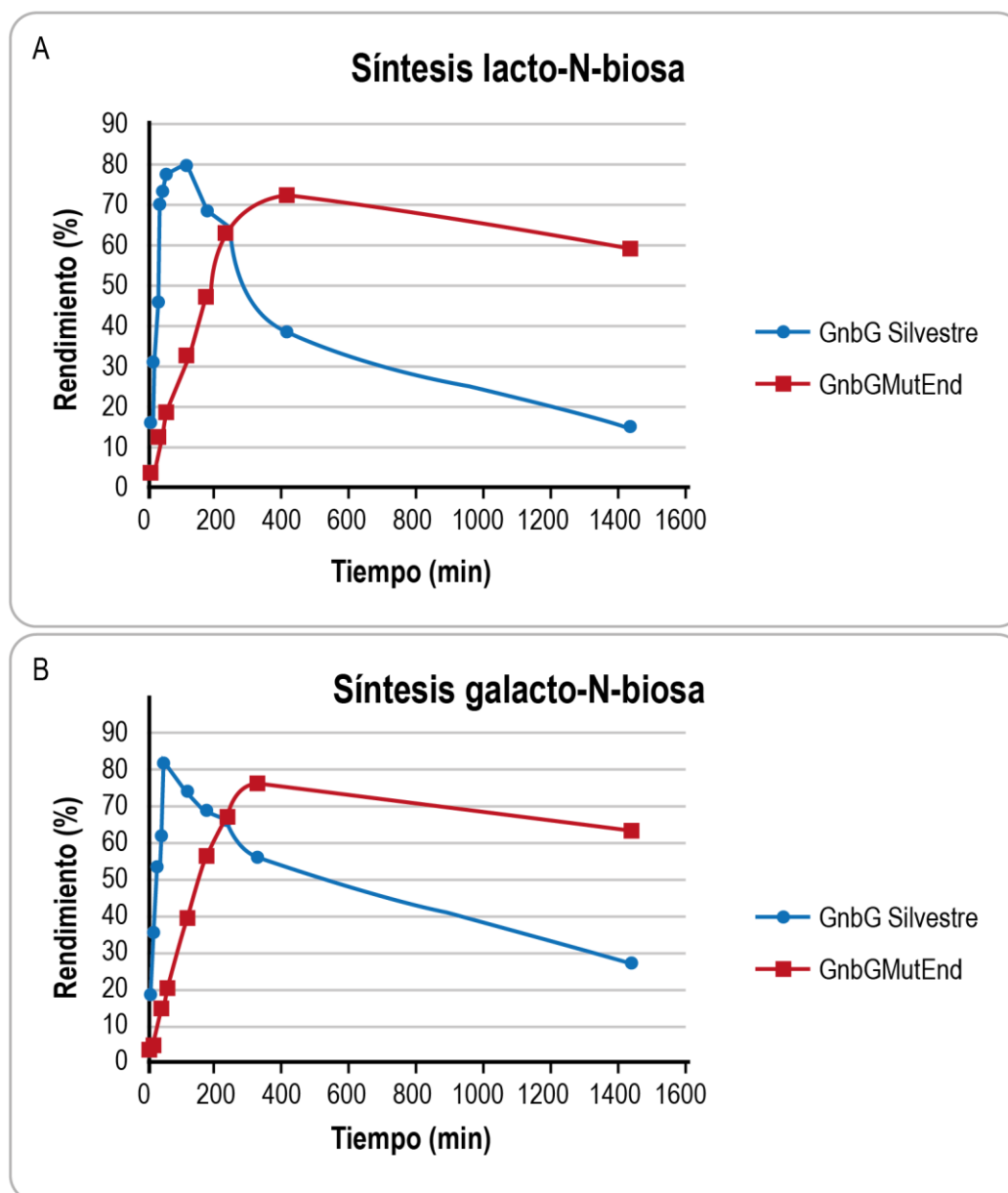


Fig. 4.4.5. Síntesis de lacto-N-biosa (A) y galacto-N-biosa (B) mediante trannglicosidación catalizada por la enzima GnbG silvestre (rojo) y la mutante GnbGMutEnd (azul). El rendimiento se expresa como porcentaje respecto a la concentración del sustrato donador *o*-NPG (40 mM).

4.4.4. Fermentación *in vitro* de LNB y GNB por cepas de *Lactobacillus*

La utilización de LNB y GNB por especies del género *Bifidobacterium* ha sido descrita previamente (Nishimoto and Kitaoka, 2007; Satoh *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2010). Sin embargo, el metabolismo de estos disacáridos por bacterias del género

Lactobacillus, género que cuenta con numerosas cepas probióticas, nunca ha sido estudiado. Así que con el objeto de analizar la capacidad de metabolizar LNB y GNB por parte de distintas especies del género *Lactobacillus*, se determinó su crecimiento en medio de cultivo MRS basal suplementado con estos disacáridos producidos en el laboratorio. No se observó crecimiento en presencia de LNB o GNB en las cepas ensayadas de *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. acidophilus*, *L. delbruckii* subsp. *bulgaricus*, *L. pentosus*, *L. salivarius*, *L. intestinalis* y *L. taiwanensis* (Fig. 4.4.6). Por el contrario, se observó crecimiento en cepas de *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. zaeae*, *L. gasseri* and *L. johnsonii*. Así, 10 de las 11 cepas de *L. casei* utilizaron ambos disacáridos (Fig. 4.4.7), incluyendo la cepa BL23 utilizada como control positivo, cuya capacidad de fermentar LNB y GNB se ha descrito en el capítulo 4.1. La única cepa ensayada de esta especie que no pudo metabolizar los disacáridos fue la BL90.

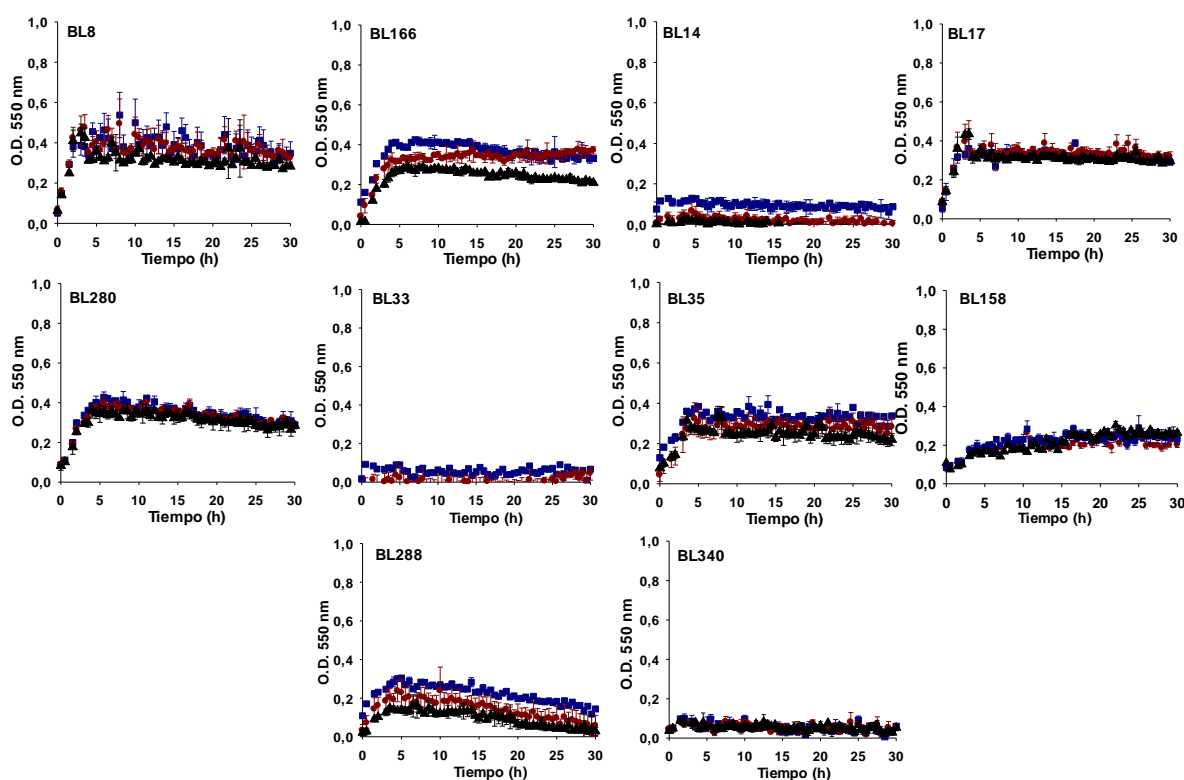


Fig. 4.4.6. Curvas de crecimiento de las cepas de *L. plantarum* BL8 y BL166, *L. curvatus* BL14, *L. acidophilus* BL17 y BL280, *L. delbruckii* subsp. *bulgaricus* BL33, *L. pentosus* BL35, *L. salivarius* BL158, *L. intestinalis* BL288 y *L. taiwanensis* BL340 en medio MRS basal sin suplementar (triángulos negros), suplementado con LNB (cuadrados azules) o suplementado con GNB (círculos rojos) como única fuente de carbono. Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error.

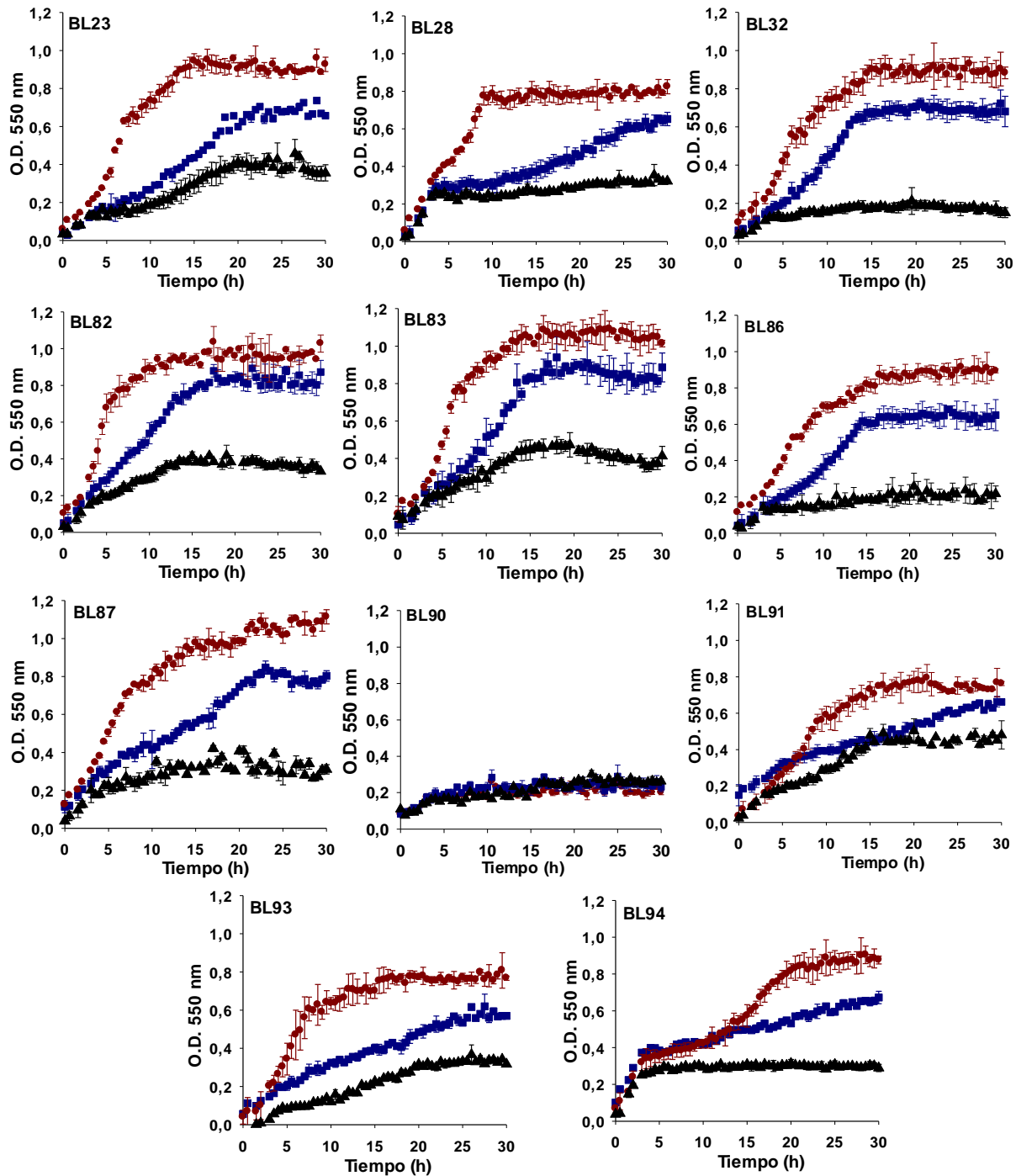


Fig. 4.4.7. Curvas de crecimiento de las cepa de *L. casei* BL23, BL28, BL32, BL82, BL83, BL86, BL87, BL90, BL91, BL93 y BL94 en medio MRS basal sin suplementar (triángulos negros), suplementado con LNB (cuadrados azules) o suplementado con GNB (círculos rojos) como única fuente de carbono. Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error.

Respecto a las cepas de *L. rhamnosus* ensayadas, 5 de las 6 cepas fueron capaces de fermentar LNB y GNB (Fig. 4.4.8), siendo la cepa BL377 (también conocida como LGG) la única incapaz de metabolizar estos disacáridos. Al analizar el genoma de esta cepa (número de acceso al genoma en GenBank FM179322) se encontró el operón *gnb*, pero con un marco de lectura abierto extra, que codifica para una proteína hipotética de 82 aminoácidos que se solapa con el extremo 3' del gen *gnbG* y podría estar afectando la transcripción y/o traducción de los genes *gnb* por debajo de ese gen. El análisis del contenido en azúcares en los sobrenadantes de los cultivos detectó LNB y GNB, respectivamente, en los sobrenadantes de la cepa BL377, mientras que fueron consumidos por el resto de las cepas ensayadas de *L. casei* y *L. rhamnosus*.

Las dos cepas de *L. zeae* (BL95 y BL257), una especie filogenéticamente cercana al grupo *L. casei/paracasei/rhamnosus* también fueron capaces de metabolizar LNB y GNB (Fig. 4.4.9). Igualmente, la cepa de *L. gasseri* (BL277) y las 3 cepas de *L. johnsonii* (BL261, BL281 y BL287) ensayadas, fueron capaces de metabolizar los disacáridos, observándose en ambos casos un fenotipo autolítico (Fig. 4.4.9).

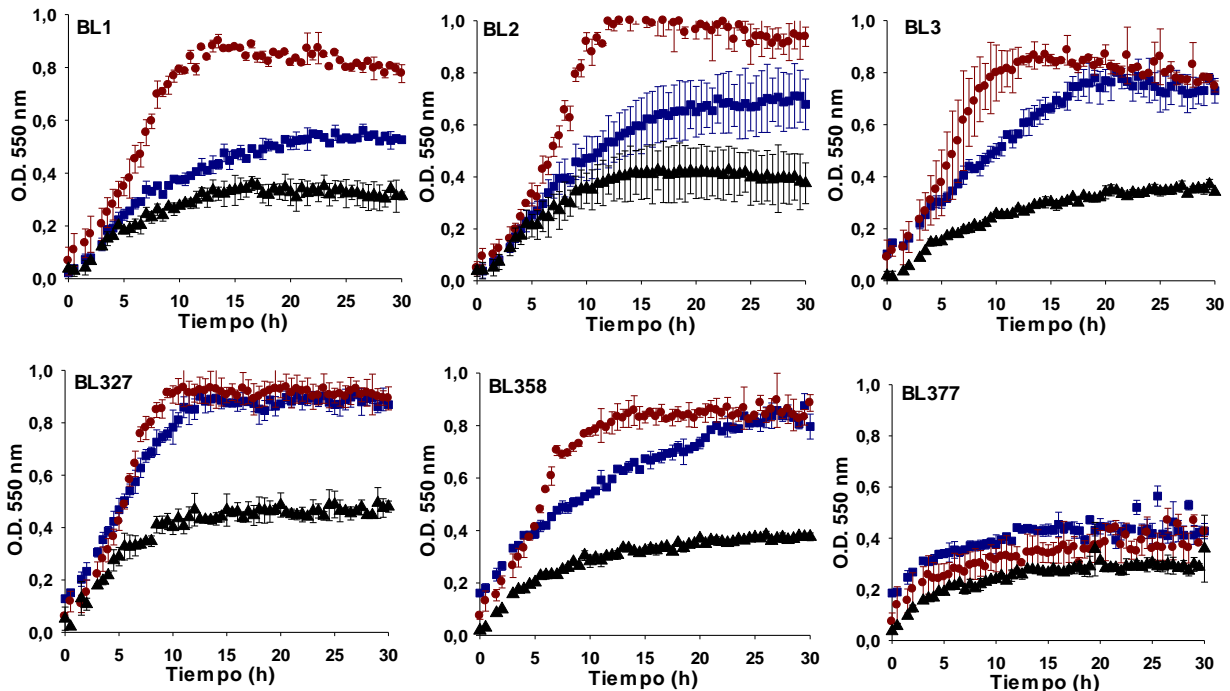


Fig. 4.4.8. Curvas de crecimiento de las cepas de *L. rhamnosus* BL1, BL2, BL3, BL327, BL358 y BL377 en medio MRS basal sin suplementar (triángulos negros), suplementado con LNB (cuadrados azules) o suplementado con GNB (círculos rojos) como única fuente de carbono. Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error.

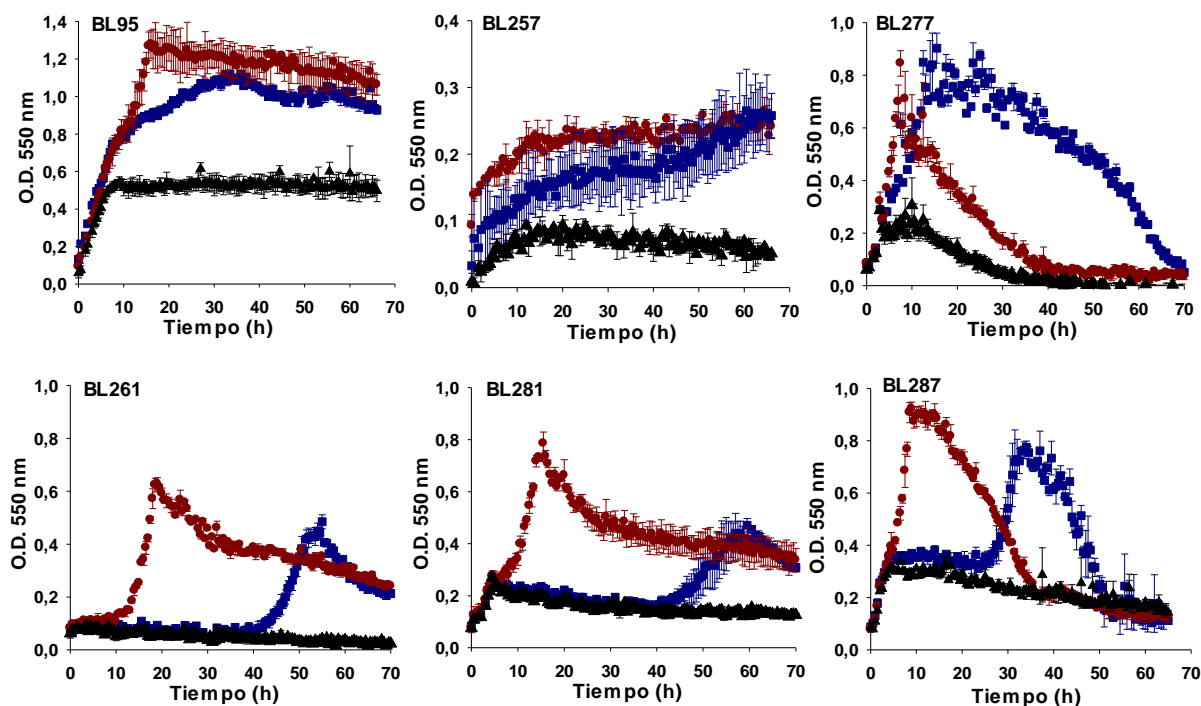


Fig. 4.4.9. Curvas de crecimiento de las cepas de *L. zeae* BL95 y BL257, *L. gasseri* BL277 y *L. johnsonii* BL261, BL281 y BL287 en medio MRS basal sin suplementar (triángulos negros), suplementado con LNB (cuadrados azules) o suplementado con GNB (círculos rojos) como única fuente de carbono. Datos representados como la media de al menos tres réplicas. Desviación estándar indicada con barras de error.

El resumen de las cepas de *Lactobacillus* ensayadas con su respectiva capacidad de metabolizar LNB y GNB se encuentra en la tabla 4.4.1.

4.4.5. Presencia de genes homólogos a *gnbG* en las cepas de *Lactobacillus*

En el primer capítulo de resultados de esta tesis se ha demostrado que la capacidad de crecer en presencia de LNB y GNB de *L. casei* BL23 depende de la actividad de la fosfo- β -galactosidasa GnbG codificada por el gen *gnbG*. Para determinar si las cepas de *Lactobacillus* que resultaron capaces de fermentar LNB y GNB en la sección anterior poseen un gen homólogo a *gnbG*, se realizó un ensayo de Southern blot (Fig. 4.4.10). Los resultados mostraron hibridación positiva en las cepas de *L. casei* (BL28, BL32, BL82, BL83, BL86, BL87, BL91 y BL93), *L. rhamnosus* (BL1, BL2, BL3, BL327 y BL358) y *L. zeae* (BL95 and BL257), todas estas cepas son capaces de crecer en LNB y GNB como fuentes de carbono, sugiriendo que en ellas

Tabla. 4.4.1. Cepas de *Lactobacillus* sin (-) y con (+) capacidad de metabolizar LNB y GNB

Especies	Cepa ^a	Colección de cultivo ^b	Metabolismo ^c
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BL1	CECT 278	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BL2	CECT 276	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BL3	CECT 275	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	BL8	CECT 748	-
<i>Lactobacillus curvatus</i>	BL14	CECT 904	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BL17	CECT 903	-
<i>Lactobacillus casei</i>	BL23	CECT 5275	+
<i>Lactobacillus casei</i>	BL28	64 H	+
<i>Lactobacillus casei</i>	BL32	CECT 4040	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	BL33	CECT 4005	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	BL35	CECT 4023	-
<i>Lactobacillus casei</i>	BL82	CECT 277	+
<i>Lactobacillus casei</i>	BL83	CECT 4043	+
<i>Lactobacillus casei</i>	BL86	CECT 4045	+
<i>Lactobacillus casei</i>	BL87	ATCC 11578	+
<i>Lactobacillus casei</i>	BL90	ATCC 334	-
<i>Lactobacillus casei</i>	BL91	CECT 4646	+
<i>Lactobacillus casei</i>	BL93	61 BG	+
<i>Lactobacillus casei</i>	BL94	ATCC 393	+
<i>Lactobacillus zeae</i>	BL95	ATCC 15820	+
<i>Lactobacillus salivarius</i>	BL158	CECT 4063	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	BL261	AD99	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	BL166	NCIMB 8826	-
<i>Lactobacillus zeae</i>	BL257	IFI-CA	+
<i>Lactobacillus gasseri</i>	BL277	ATCC33323	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BL280	CECT 4179	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	BL281	CECT 289	+
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	BL287	DSM 10533	+
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	BL288	DSM 6629	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BL327	CECT 288	+
<i>Lactobacillus taiwanensis</i>	BL340	DSM 21041	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BL358	HN001	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BL377	ATCC 53103	-

^aBL, Colección de cultivos de nuestro laboratorio.

^bCECT, Colección Española de Cultivos Tipo; ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo; DSM, Colección Alemana de Microorganismos; NCIMB, Colección Nacional de Bacterias Industriales, Alimenticias y Marinas, Reino Unido; *L. casei* 64H y 61BG son descritas en (Gasser and Mandel, 1968); *L. rhamnosus* HN001, también conocida como DR20, es descrita en (Prasad *et al.*, 1998,); *L. zeae* BL257 fue aislada de vino (Moreno-Arribas and Polo, 2008); *L. johnsonii* BL261 fue aislada de intestino de rata (Sarmiento-Rubiano *et al.*, 2007).

^c+, capaz de metabolizar LNB y GNB; -, incapaz de metabolizar LNB y GNB.

el metabolismo de estos disacáridos depende de una fosfo- β -galactosidasa homóloga a GnbG. Como era de esperar también se obtuvo señal de hibridación en la cepa *L. rhamnosus* BL377. Aunque esta cepa es incapaz de metabolizar estos disacáridos, posee, como ya se mencionó, un operón *gnb* en su genoma probablemente no funcional. *L. casei* BL94 (ATCC 393) es capaz de metabolizar LNG y GNB, sin embargo no se obtuvo señal de hibridación (Fig. 4.4.10), lo cual sugiere que esta cepa hidroliza estos disacáridos a través de una glicosidasa diferente. Este resultado concuerda con la ausencia de genes homólogos a *gnbG* en su genoma (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>). Del mismo modo, las cepas ensayadas de *L. gasseri* y *L. johnsonii* que fueron capaces de fermentar ambos disacáridos no presentaron señal de hibridación (Fig. 4.4.10).

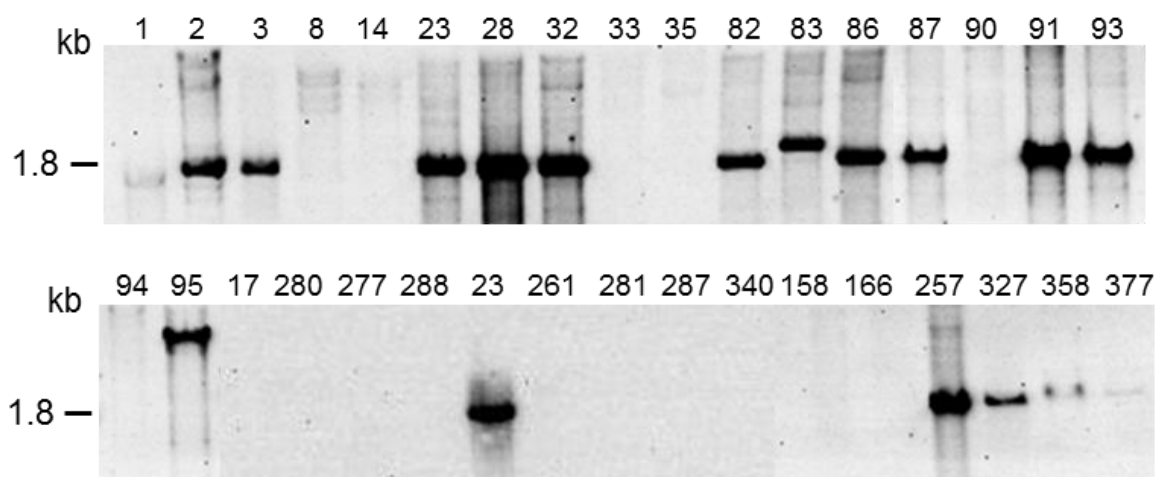


Fig. 4.4.10. Ensayo de southernblot utilizando DNA genómico de las cepas de *L. rhamnosus* (BL1, BL2, BL3, BL327, BL358 y BL377), *L. casei* (BL23, BL28, BL32, BL82, BL83, BL86, BL87, BL90, BL91, BL93 y BL94), *L. zae* (BL95 y BL257), *L. gasseri* (BL277), *L. johnsonii* (BL261, BL281 y BL287), *L. plantarum* (BL8 y BL166), *L. curvatus* (BL14), *L. acidophilus* (BL17 y BL280), *L. delbrückii* subsp. *Bulgaricus* (BL33), *L. pentosus* (BL35), *L. salivarius* (BL158), *L. intestinalis* (BL288), y *L. taiwanensis* (BL340). Los números a la izquierda indican el tamaño del fragmento de DNA (kb) de la cepa BL23

4.4.6. Análisis del potencial inmunomodulador de la LNB, GNB, fucosil- α -1,3-GlcNAc (Fuc1-3) y fucosil- α -1,6-GlcNAc (Fuc1-6)

En los últimos años se han descrito efectos inmunomoduladores para distintos OLH purificados de leche materna, tanto sialilados (Eiwegger *et al.*, 2010; Eiwegger *et al.*, 2004) como fucosilados (Atochina and Harn, 2005; Terrazas *et al.*, 2001), sin embargo ninguna información existe sobre la posible actividad inmunomoduladora de

los distintos disacáridos que forman parte de oligosacáridos más complejos. Se ha analizado el potencial inmunomodulador de la LNB y GNB sintetizadas aquí, y de los fucosil-N-acetilglucosamina disacáridos, Fuc1-3 y Fuc1-6, sintetizados previamente en nuestro laboratorio (Becerra *et al.*, 2015; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2013). Para los ensayos de análisis del potencial inmunomodulador se utilizaron dos modelos descritos en la sección de materiales y métodos, el de incubación de los disacáridos con la línea celular de epitelio intestinal HT-29 en co-cultivo con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en placas transwell, y el de incubación directa de los disacáridos con PBMC.

4.4.6.1. Modelo de co-cultivo en placas transwell

4.4.6.1.1. Ausencia de citotoxicidad de los disacáridos

Para descartar un posible efecto citotóxico de los disacáridos LNB, GNB, Fuc1-3 y Fuc1-6 sobre las células de epitelio intestinal (IEC), se realizó un ensayo de viabilidad WST-1 (Water soluble tetrazolium salts) (Fig. 4.4.11) con la concentración más alta (1mM) de los disacáridos utilizada en los estudios descritos en las siguientes secciones, y tomando como control las células sin tratar con ningún disacárido. Los resultados no mostraron ninguna diferencia significativa en la viabilidad de las células HT-29 después de 48 h de incubación entre los diferentes disacáridos y el control.

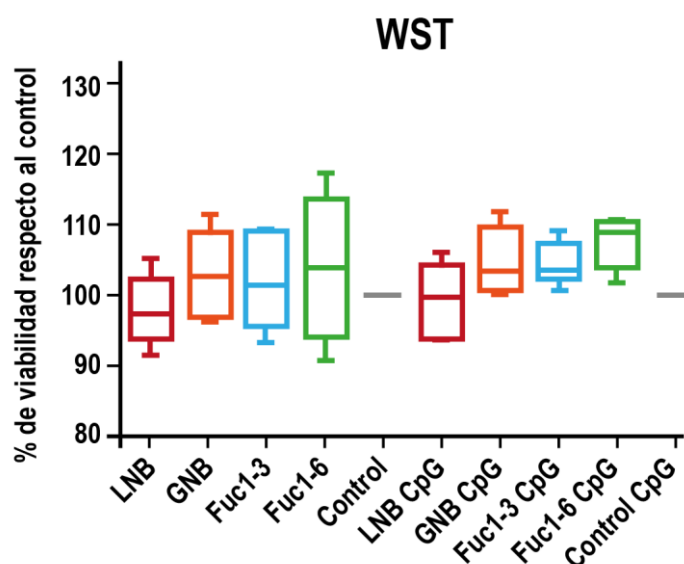


Fig. 4.4.11. Ensayo de viabilidad “Water Soluble Tetrazolium Salts” (WST-1) (n=5). 1 mM de lacto-N-biosa (LNB), galacto-N-biosa (GNB), fucosil- α -1,3-GlcNAc (Fuc1-3) o fucosil- α -1,6-GlcNAc (Fuc-1-6), en presencia y ausencia de agonistas de Toll Like Receptor 9 (oligonucleótidos de CpG).

4.4.6.1.2. Efecto sobre la población de linfocitos T reguladores (T_{reg})

Con el objeto de ensayar el potencial inmunomodulador de los disacáridos se estudió el efecto de éstos sobre la población de linfocitos T_{reg} mediante FACS (Fluorescent-activated cell sorting). Se utilizaron muestras de PBMC de 5 donantes y se ensayaron durante 24 h en co-cultivo en placas transwell con o sin disacáridos. Se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones de T_{reg} de los diferentes donantes (Fig. 4.4.12A), pero no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y los controles sin disacáridos de cada donante. El promedio de los 5 donantes puede observarse en la Fig. 4.4.12B.

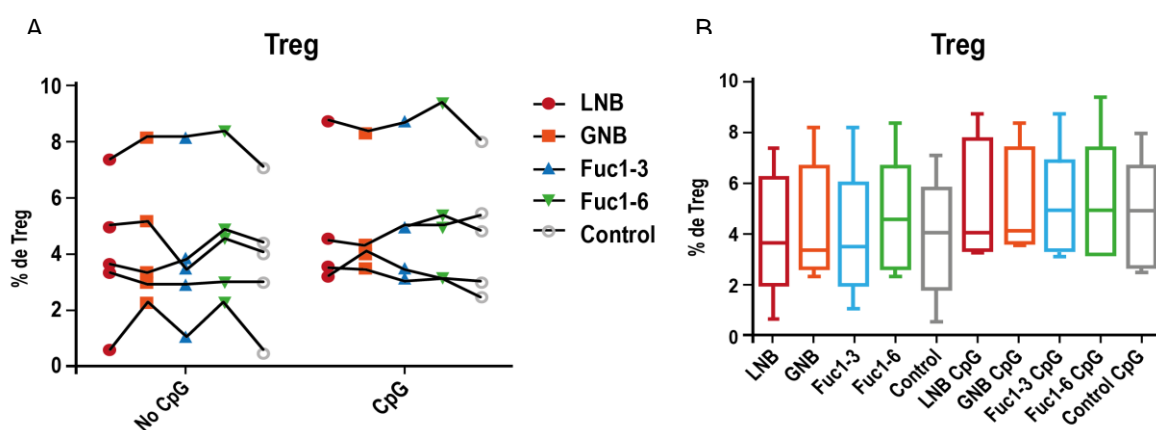


Fig. 4.4.12. Análisis mediante FACS de la población de linfocitos Treg (FoxP3+CD25+ en células CD4+) de las PBMC en co-cultivo con células HT-29 en placas transwell. A) % de linfocitos Treg de cada donante, con los diferentes tratamientos y control por separado. B) Promedio del % de los linfocitos Treg de los 5 donantes. 1 mM de lacto-N-biosa (LNB), galacto-N-biosa (GNB), fucosil- α -1,3-GlcNAc (Fuc1-3) o fucosil- α -1,6-GlcNAc (Fuc-1-6), en presencia y ausencia de agonistas de Toll Like Receptor 9 (oligonucleótidos de CpG).

4.4.6.1.3. Efecto sobre la producción de citoquinas

Se ensayó el efecto de los disacáridos sobre la producción de cuatro citoquinas por las PBMC: TNF- α , la cual se asocia con una respuesta pro-inflamatoria, IL10, la cual participa en actividades regulatorias, e INF- γ e IL13, las cuales están relacionadas

con la polarización Th1/Th2 de la respuesta inmune. En este modelo de co-cultivo, se realizaron dos tipos de tratamiento con cada disacárido, un tratamiento solo con los disacáridos y un segundo en el que se añadió CpG DNA en el compartimento apical para coestimular a las células HT-29. Al igual que en estudios anteriores (de Kivitt *et al.* 2011), la adición de CpG DNA aumentó la producción de IL10 e INF- γ mientras que disminuyó la producción de IL13. Ninguno de los disacáridos fue capaz de afectar la producción de citoquinas por parte de las PBMC al ser añadidos a las HT-29, ya sea en presencia o ausencia de CpG DNA. El análisis estadístico se realizó en base a la transformación logarítmica de los datos y los resultados no mostraron diferencias significativas en ninguna de las cuatro citoquinas (Fig. 4.4.13).

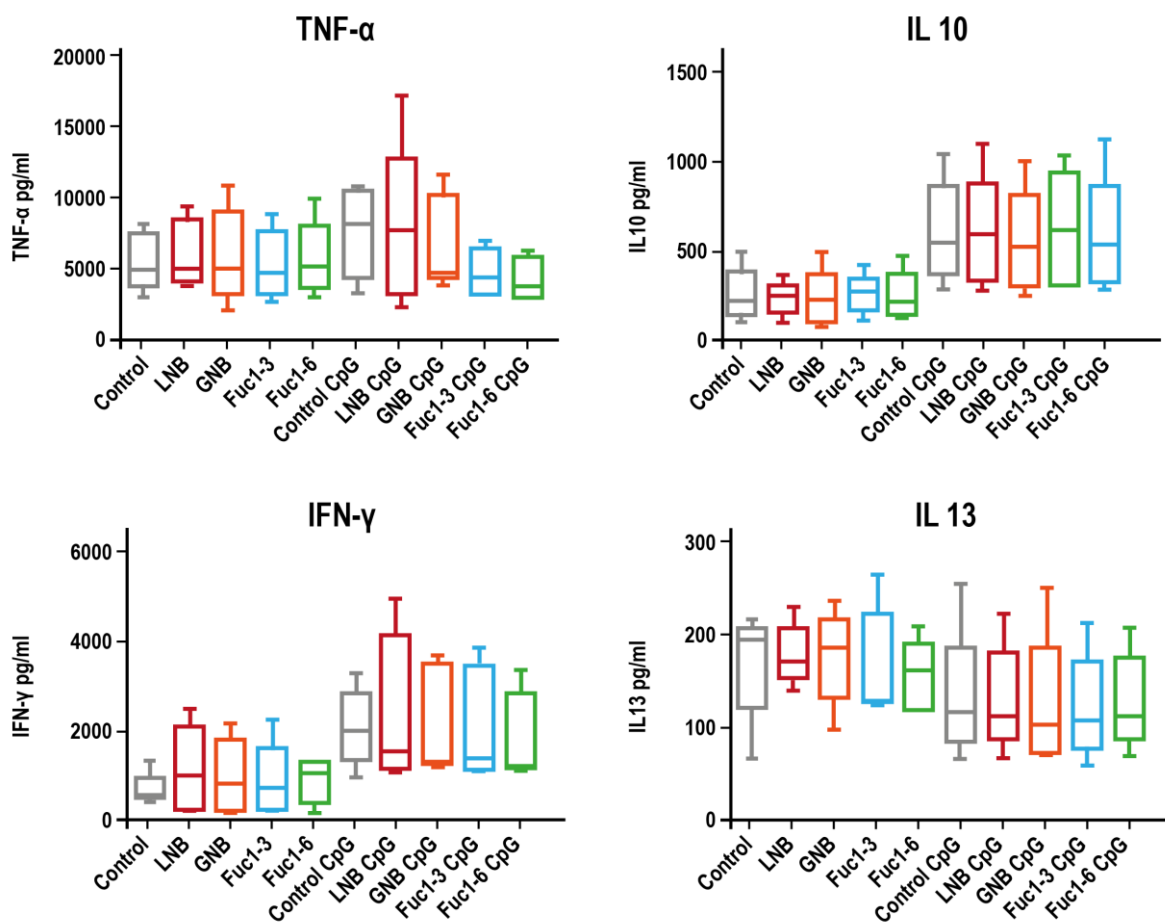


Fig. 4.4.13. Producción de citoquinas de las PBMC en co-cultivo con células HT-29 en placas transwell (n=5). 1 mM de lacto-N-biosa (LNB), galacto-N-biosa (GNB), fucosil- α -1,3-GlcNAc (Fuc1-3) o fucosil- α -1,6-GlcNAc (Fuc-1-6), en presencia y ausencia de agonistas de Toll Like Receptor 9 (oligonucleótidos de CpG).

4.4.6.2. Modelo de incubación directa

4.4.6.2.1. Efecto sobre la producción de citoquinas

Con el modelo de incubación directa de los disacáridos con las PBMC se ensayó una relación dosis respuesta con cada disacárido. No se encontraron diferencias significativas en la producción de las citoquinas TNF- α e IL10 por las PBMC en presencia de LNB, GNB, Fuc1-3 y Fuc1-6, respectivamente, a las concentraciones ensayadas (Fig. 4.4.14).

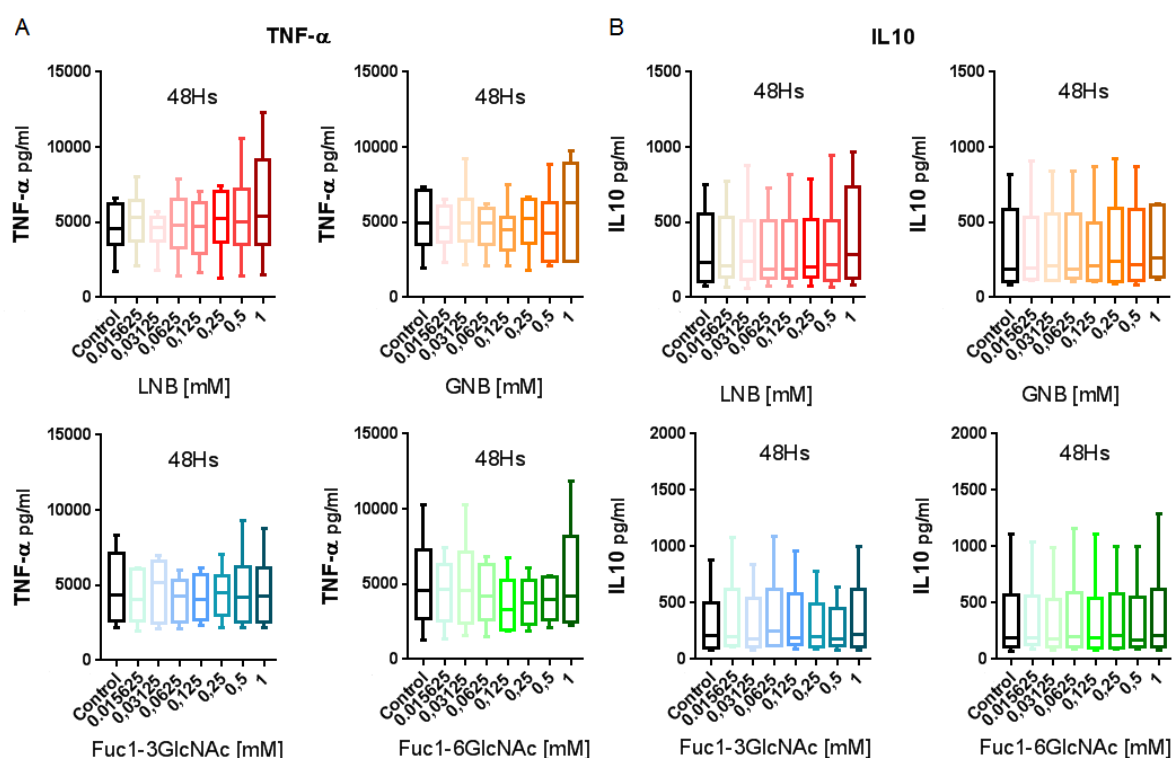


Fig. 4.4.14. Producción de las citoquinas TNF- α (A) e IL10 (B) de las PBMC en el modelo de incubación directa con los disacáridos lacto-N-biosa (LNB), galacto-N-biosa (GNB), fucosil- α -1,3-GlcNAc (Fuc1-3) o fucosil- α -1,6-GlcNAc (Fuc-1-6) (n=8).

Por el contrario, si se encontró un incremento significativo en la producción de IFN- γ , una citoquina del tipo Th1, al incubar las PBMC con cualquiera de los cuatro disacáridos utilizados. Las concentraciones a las cuales se observaron estas diferencias fueron a 1mM para Fuc1-6 y GNB, a 0,5mM para Fuc1-3, y a 0,5mM y 1mM para LNB (Fig. 4.4.15A). También se identificó una disminución significativa de la producción de

IL13, una citoquina del tipo Th2, en tres de las concentraciones ensayadas de Fuc1-6 (0,125mM, 0,5mM y 1mM) (Fig. 4.4.15B).

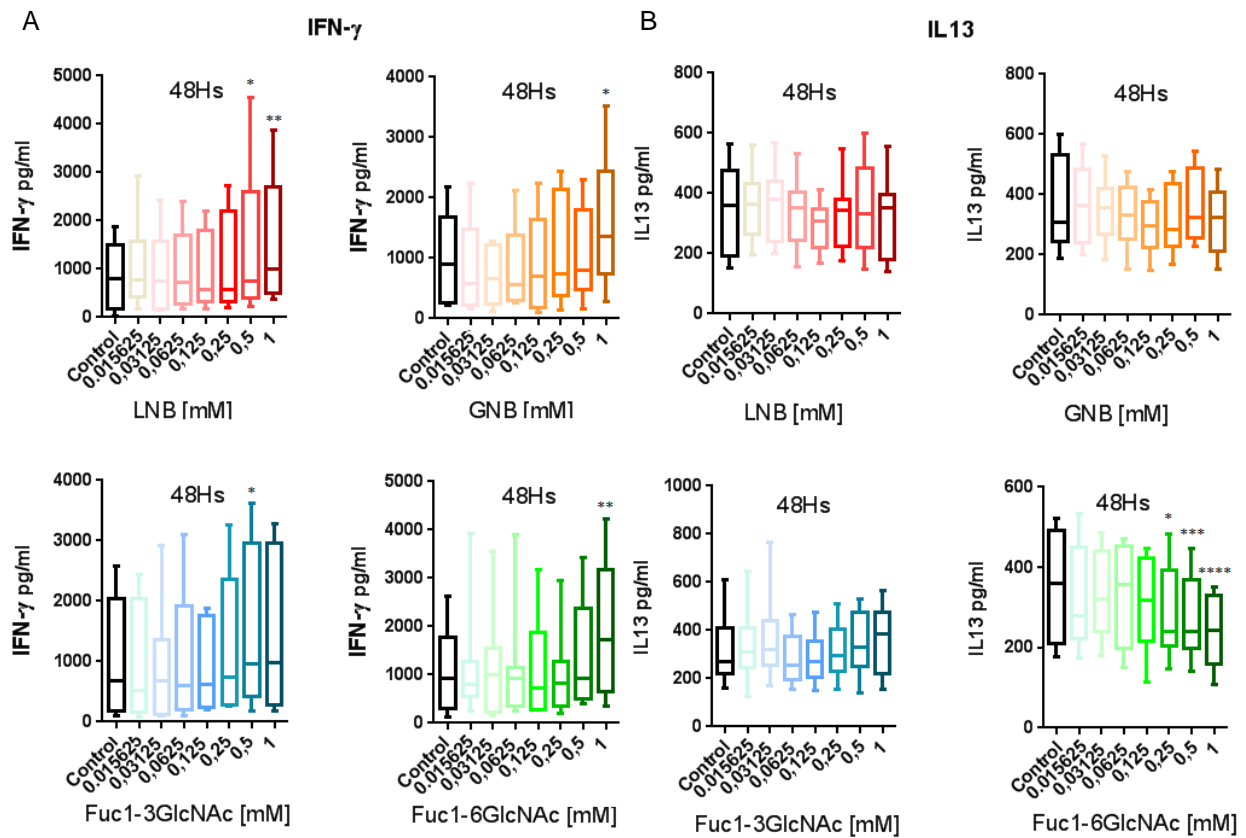


Fig. 4.4.15. Producción de las citoquinas IFN- γ (A) e IL13 (B) de las PBMC en el modelo de incubación directa con los disacáridos lacto-N-biosa (LNB), galacto-N-biosa (GNB), fucosil- α -1,3-GlcNAc (Fuc1-3) o fucosil- α -1,6-GlcNAc (Fuc-1-6) (n=8). Las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y los controles se muestran con un asterisco (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.0001$).

5. Discusión



5.1. Metabolismo de oligosacáridos presentes en la leche humana y mucosa gastrointestinal

Numerosos estudios sugieren que los oligosacáridos de leche humana (OLH) juegan un rol importante en el establecimiento y el mantenimiento de la microbiota infantil (De Leoz *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2013). Sin embargo, la información sobre la utilización de los OLH y de los glicanos asociados a mucosas humanas por parte de bacterias probióticas es escasa y prácticamente se encuentra restringida a bacterias del género *Bifidobacterium*. En este trabajo hemos demostrado que *L. casei* es capaz de metabolizar GNB, LNB, GalNAc, lacto-N-triosa y LacNAc.

GNB, LNB y GalNAc son transportados al interior celular por el mismo sistema PTS de la familia de la manosa. A pesar de que la mayoría de sistemas PTS son específicos para un carbohidrato en particular, se ha descrito previamente algunos sistemas PTS que transportan dos o más β -glucosidos estructuralmente relacionados (Deutscher *et al.*, 2006; Le Coq *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 2011). Al estudiar el metabolismo de otros glicanos asociados a mucosas en *L. casei* se demostró que el disacárido fucosil- α 1,3-GlcNAc es transportado sin fosforilar por un PTS específico, y después es hidrolizado por una enzima α -L-fucosidasa en el interior celular (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2012a). Por el contrario, diferentes evidencias apuntan a que la GNB, LNB y GalNAc son transportadas y fosforiladas por el mismo PTS^{Gnb}. Primero, se ha demostrado que la Enzima I del PTS es necesaria para el catabolismo de estos carbohidratos, y segundo, se ha comprobado que la ruta de la tagatosa-6P está implicada en el metabolismo de la galactosa liberada a partir de GNB y LNB. GNB-P y LNB-P son hidrolizados por GnbG dando lugar a Gal-6P y la correspondiente N-acetilhexosamina. Solo dos proteínas homólogas a GnbG han sido caracterizadas hasta la fecha (Hu *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2009). La secuencia de aminoácidos deducida de GnbG tiene una identidad del 60% y 59% a las enzimas BgaC de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus suis*, respectivamente. Estas proteínas están localizadas en la superficie celular y catalizan la hidrólisis de la galactosa terminal de la lacto-N-tetraosa y de cadenas de azúcares que poseen LNB (Jeong *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2014), pero no de cadenas de azúcares que tienen GNB (Hu *et al.*, 2014). Curiosamente, como *gnbG*, los genes *bgaC* de streptococci están agrupados con genes que codifican para un

hipotético sistema PTS de la familia de la manosa (Jeong *et al.*, 2009). Este hecho, junto con la ausencia de un péptido señal o un dominio de anclaje a la pared sugiere que la enzima BgaC podría tener no solo una actividad β -galactosidasa asociada a superficie, sino también una actividad fosfo- β -galactosidasa dentro de las células. Al contrario, si GnbG posee o no una actividad y localización celular similar a la de BgaC aún debe ser investigado. Sin embargo, el hecho de que GNB y LNB permanecen sin hidrolizar en los sobrenadantes de los cultivos de las cepas BL385 (*gncC*) y BL126 (*ptsI*), mutantes para el PTS^{Gnb} y el Enzima I del PTS, respectivamente, estaría en contra de que GnbG presente una actividad y localización en la superficie celular, al menos bajo las condiciones experimentales de este estudio.

La GalNAc o GlcNAc liberadas por GnbG a partir de GNB-P o LNB-P respectivamente, podrían ser fosforiladas por una N-acetilhexosamina quinasa antes de entrar en dos vías metabólicas diferentes que terminan en los mismos intermediarios glicolíticos, dihidroxiacetona-P (DHAP) y D-gliceraldehído-3P (GAP) (Fig. 4.1.4B). En *B. longum* el operon *lpn*, el cual está involucrado en el metabolismo de GNB y LNB, contiene el gen *lnpB* que codifica una quinasa responsable de fosforilar GalNAc y GlcNAc a GalNAc-1P y GlcNAc-1P, respectivamente (Nishimoto and Kitaota, 2007). De forma distinta a las especies de *Bifidobacterium*, en *L. casei* el operón *gnc* implicado en el metabolismo de esos disacáridos no contiene ninguna quinasa de azúcares. Se ha demostrado que los genes *gncF* y *nagA*, los cuales codifican para una GalNAc-6P o GlcNAc-6P deacetilasa respectivamente, están involucrados en el metabolismo de GNB y LNB respectivamente, lo cual sugiere que la GalNAc o GlcNAc liberadas después de la hidrólisis de GNB-P y LNB-P deberían fosforilarse en el carbono 6 en lugar del 1 como ocurre en bifido bacterias (Nishimoto and Kitaota, 2007). La GalNAc es un constituyente de la pared celular, de lipopolisacáridos y exopolisacáridos de bacterias (Bernatchez *et al.*, 2005; Freymond *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2011; Tallon *et al.*, 2003), y conecta cadenas de glicanos al núcleo proteico de las mucinas humanas (Jensen *et al.*, 2010). Incluso a pesar de que GalNAc es una fuente de carbono y nitrógeno disponible para las bacterias, las rutas catabólicas de este azúcar solo han sido caracterizadas en *E. coli* y *Shewanella spp.* (Brinkkotter *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2013; Leyn *et al.*, 2012; Ray and Larson, 2004). El operón *gnc* que hemos estudiado en esta tesis, codifica las enzimas de una ruta catabólica de GalNAc (con excepción de GnbG). A diferencia de *L. casei*, en *E. coli* y otras proteobacterias (Leyn *et al.*, 2012) los operones implicados en

el catabolismo de GalNAc contienen genes adicionales –que participan en el metabolismo de la Tag-6P, como la Tag-6P quinasa o la Tag-1,6P aldolasa. En *L. casei* la ruta de la Tag-6P esta codificada por otro operón en donde se encuentran los genes *lacRIABD2C*, los cuales podrían ser responsables del metabolismo de la Tag-6P producto del catabolismo de la tagatosa (Viana *et al.*, 2000), galactosa (Bettenbrock *et al.*, 1999), lactosa (Gosalbes *et al.*, 1997), y de las rutas propuestas en este trabajo para GNB, LNB y GalNAc. De hecho hemos demostrado que la cepa mutante en los genes *lacAB* (BL393) no es capaz de crecer en galactosa, y presenta un crecimiento deficiente en GNB y LNB.

Se ha determinado que el operón *gnb* en *L. casei* está regulado transcripcionalmente a través de la inducción de la GNB y la GalNAc mediada por el represor transcripcional GnbR. En *E. coli* el operón del catabolismo de la GalNAc también se encuentra regulado por un represor transcripcional, aunque en este caso pertenece a la familia de reguladores DeoR/GlpR (Ray and Larson, 2004). Normalmente las moléculas efectoras de esta familia de reguladores son intermediarios fosforilados de la ruta metabólica correspondiente (Ray and Larson, 2004; van Rooijen *et al.*, 1993). Del mismo modo, el metabolismo de la GlcNAc en *Bacillus subtilis* está regulada por un represor transcripcional de la familia GntR, que es inactivado por el catabolito intermediario glucosamina-6P (Bertram *et al.*, 2011). En el presente trabajo se demuestra que los genes del operón *gnb* de *L. casei* se encuentran inducidos por el crecimiento en GNB y en GalNAc. Por lo tanto la señal que dispara la inactivación de GnbR podría ser alguno de los derivados fosforilados del transporte y fosforilación de GNB o GalNAc mediante el PTS^{Gnb}, como la GalNAc-6P o la galactosamina-6P. La Tag-6P producto de la actividad de GnbE sobre la galactosamina-6P, o del metabolismo de la galactosa-6P, probablemente no es un efector de GnbR ya que el operón *gnb* se encuentra reprimido en presencia de galactosa. Por otra parte, tanto la LNB como la GlcNAc, cuyos metabolismo no incluye GalNAc-6P o galactosamina-6P apenas inducen el operón *gnb*, esto sugiere que GlcNAc-6P y glucosamina-6P tampoco son efectores de GnbR. De acuerdo con ésto, la utilización de la LNB fue subóptima en la cepa silvestre BL23 en comparación con la cepa mutante para *gnbR*, probablemente debido a la pobre inducción del operón. A pesar de que *L. casei* puede ser cultivada en un medio con LNB como única fuente de carbono, la presencia simultánea de GNB y LNB en un ambiente como el tracto gastrointestinal de niños alimentados con leche

materna, posiblemente potencie la eficiencia de la utilización de la LNB disponible. Recientemente se ha encontrado LNB libre en la leche humana (Balogh *et al.*, 2015), pero la mayor cantidad, al igual que la GNB, se encuentra formando parte de una gran variedad de moléculas bioactivas, como OLH, glicoesfingolípidos, glicoproteínas de la mucina y glicolípidos (Hakomori, 2008; Liu and Newburg, 2013; Moran *et al.*, 2011; Thurl *et al.*, 2010; Urashima *et al.*, 2012). Para poder ser utilizados por *L. casei*, deben ser liberados previamente de glicocomplejos mediante la acción de otras glicosidasas microbianas. Este es el caso de la endo- α -Nacetilgalactosaminidasa que es capaz de liberar GNB de los O-glicanos de mucinas, y de la lacto-N-biosidasa que libera LNB de los OLH (Ashida *et al.*, 2000; Fushinobu, 2010).

Un análisis de las secuencias de genomas disponibles de lactobacilli (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>) reveló que el operón *gnb* se encuentra presente únicamente en el grupo filogenéticamente relacionado *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus/zeae*. Más del 80% de las cepas secuenciadas de este grupo contiene el operón y la secuencia deducida de aminoácidos de los 8 genes *gnb*, muestran una homología que va desde el 86% al 100% respecto a la secuencia de *L. casei* BL23. De hecho, las especies de este grupo de *Lactobacillus* son habitantes comunes del tracto gastrointestinal de humanos y animales (Albesharat *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2007). Análisis genómicos realizados en *Lactobacillus* revelan que especies de este género han evolucionado por pérdida y ganancia de genes derivado de su nicho ecológico específico. Por lo tanto, lactobacilli de origen intestinal como *L. acidophilus*, *L. johnsonii* o *L. gasseri* portan muchos genes relacionados con supervivencia y colonización de este ambiente, incluido los responsables de la fermentación de diversos carbohidratos (Altermann *et al.*, 2005; Azcarate-Peril *et al.*, 2008; Pridmore *et al.*, 2004). Respecto al grupo *L. casei/paracasei/rhamnosus/zeae* parecen especialmente capaces de explotar oligosacáridos de mucosas, ya que ellos representan los únicos lactobacilli donde hay presentes α -L-fucosidasas (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2012a) y rutas metabólicas para la utilización de GNB, LNB y GalNAc.

La LacNAc es una de las estructuras clave presente tanto en los OLH como en los dominios glicanos de las glicoproteínas y los glicolípidos presentes en la leche y la mucosa gastrointestinal (Bode, 2012; Bridiau *et al.*, 2010; Garrido *et al.*, 2012). Además, recientemente se ha demostrado la presencia de LacNAc libre en leche

materna humana (Balogh *et al.*, 2015). Este disacárido tiene un papel fundamental en procesos de reconocimiento celular (Berg, 2007), y está involucrado en distintos tipos de enfermedades infecciosas (Bozue *et al.*, 1999), autoinmunes e inflamatorias (Cappione *et al.*, 2004; Hayer *et al.*, 2005; Rosen, 1999), y también en cáncer (Witz, 2006). Además forma parte de las cadenas de polilactosamina (Bridiau *et al.*, 2010), así como también del antígeno Lewis Y, Lewis X y Sialil Lewis X (Bay, 2006; Guillot *et al.*, 2004). A pesar de la relevancia de este disacárido, su metabolismo no ha sido caracterizado previamente en ningún microorganismo. Curiosamente, el operon *lac*, que ha sido ampliamente caracterizado en esta cepa (Gosalbes *et al.*, 2002; Gosalbes *et al.*, 1997; Gosalbes *et al.*, 1999), es también el responsable del transporte y catabolismo de la LacNAc. De igual forma que lo ocurrido con el PTS^{Gnb}, el PTS^{lac} representa un nuevo ejemplo de PTS capaz de transportar dos sustratos estructuralmente relacionados. Dada la importancia económica de la fermentación de la lactosa en la industria láctea existe un gran número de estudios enfocados a la utilización de este azúcar por las bacterias lácticas (de Vos and Vaughan, 1994). El transporte de la lactosa en especies del género *Lactobacillus* se realiza por una permeasa específica dependiente de un gradiente de protones o antiporter (Leong-Morgenthaler *et al.*, 1991) o a través del PTS (Alpert and Chassy, 1990; Chassy and Alpert, 1989; Shimizu-Kadota, 1988). Utilizando mutantes deficientes en los componentes EII^{Lac} de *L. casei* se ha demostrado aquí que la LacNAc es transportada por el PTS específico para la lactosa. El transporte de este azúcar por un PTS específico se ha descrito también para otras bacterias lácticas presentes en el tracto gastrointestinal como *L. gasseri* (Francl *et al.*, 2012), esta especie contiene dos PTS diferentes que transportan lactosa. Si estos PTS están también o no implicados en el transporte de LacNAc necesita ser todavía investigado. Un análisis de las secuencias genómicas disponibles de lactobacilli (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>) mostró que el operón *lac* aquí descrito se encuentra presente en especies del grupo *L. casei/paracasei/rhamnosus/zeae* con identidades de hasta el 100%. También se encontraron los genes correspondientes al operón *lac* con distintos porcentajes de identidad en una cepa de *L. heilongjiangensis* (74%), dos de *L. farciminis* (72%), dos de *L. gasseri* (66%), y en una de *L. johnsonii* (65%). En *L. casei* hemos determinado mediante análisis transcripcionales que el operon *lac* está inducido tanto por la lactosa como por la LacNAc y en unos niveles similares, sugiriendo una posible adaptación simultánea a ambos sustratos en el tracto gastrointestinal.

La LacNAc-P y la Lac-P, resultantes de la actividad del PTS, son hidrolizadas posteriormente en el interior celular por la fosfo- β -galactosidasa LacG dando lugar a Gal-6P y GlcNAc o glucosa, respectivamente. Hasta ahora se han caracterizado proteínas homólogas a LacG en *Streptococcus mutans* (Honeyman and Curtiss, 1993), *Staphylococcus aureus* y *Lactococcus lactis* (Witt *et al.*, 1993). En el mismo trabajo también se ha caracterizado LacG de *L. casei* 64H (Witt *et al.*, 1993). La secuencia de aminoácidos deducida de la LacG de *L. casei* BL23 tiene una identidad del 52%, 54% y 54% a las enzimas homólogas de *S. mutans*, *S. aureus* y *L. lactis*, respectivamente. El estudio de estas enzimas se ha centrado en el metabolismo de la lactosa y su actividad no ha sido ensayada con la LacNAc, pero al igual que ocurre con el enzima caracterizado en este capítulo, ninguna de estas tres enzimas homólogas fue capaz de utilizar un sustrato no fosforilado (Witt *et al.*, 1993), lo cual sugiere que el grupo fosfato es esencial para interactuar con el sitio activo. Por el contrario, en *Bifidobacterium bifidum* si se han caracterizado enzimas capaces de hidrolizar LacNAc en ensayos *in vitro*. Así, de la cepa *B. bifidum* NCIMB41171 se han aislado cuatro enzimas β -galactosidasas BbgI a BbgIV con capacidad hidrolizar la LacNAc con diferentes eficiencias (Goulas *et al.*, 2009). En la cepa de *B. bifidum* JCM1254 se caracterizó la ruta metabólica de la lacto-N-neotetraosa (LNnT), un tetrasacárido presente en la leche humana formado por LacNAc y lactosa (Miwa *et al.*, 2010). La LNnT se hidrolizada secuencialmente por la acción de dos exoglicosidasas extracelulares ancladas a la pared celular, una β -galactosidasa (BbgIII) y una β -N-acetilglucosaminidasa (BbhI). BbgIII hidroliza la LNnT a galactosa y lacto-N-triosa y esta última es hidrolizada por BbhI a GlcNAc y lactosa. BbgIII hidroliza también *in vitro* LacNAc y lactosa, presentando una afinidad más alta por la primera, con lo que podría tener un papel en el metabolismo de este disacárido en el tracto gastrointestinal. A diferencia de LacG que pertenece a la familia GH1 de las glicosil hidrolasas, las glicosidasas de *Bifidobacterium* pertenecen a las familias GH2 y GH42. BbgIII es la que posee mayor porcentaje de homología con LacG, un 31% de identidad y 78% de homología. Otra diferencia con LacG es que BbgIII tiene un tamaño cuatro veces mayor y es una enzima extracelular (Goulas *et al.*, 2009).

La lacto-N-triosa forma parte de la estructura de ambos tipos de OLH, los de clase 1 y clase 2, y también se encuentra en las glicoproteínas de la leche humana y de la mucosa gastrointestinal. A pesar de ser una estructura abundante en los

oligosacáridos, el metabolismo de este trisacárido en la microbiota asociada al tracto gastrointestinal tampoco ha sido investigado. De hecho, solo se ha descrito la utilización de lacto-N-triosa a partir del catabolismo de lacto-N-neotetraosa en *B. bifidum* como se ha descrito en el párrafo anterior (Miwa *et al.*, 2010). En este trabajo hemos demostrado la capacidad de *L. casei* BL23 de crecer utilizando lacto-N-triosa, sin embargo, no es capaz de fermentar lacto-N-neotetraosa (Fig. 4.2.3A), sugiriendo que esta cepa carece de una actividad β -galactosidasa capaz de hidrolizar el tetrasacárido en galactosa y lacto-N-triosa, al menos bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo. Por otra parte, hemos demostrado la incapacidad de la cepa BL380 (*bnaG*) de metabolizar este trisacárido, demostrando así que la N-acetilglucosaminidasa BnaG está implicada en su metabolismo. Además esa cepa mutante carece completamente de actividad N-acetilglucosaminidasa tanto en los sobrenadantes de cultivo como en ensayos de células enteras, sugiriendo que una fracción de BnaG se encuentra anclada a la pared celular de *L. casei*, mientras que otra es liberada al medio. Por lo tanto, BnaG hidrolizaría la lacto-N-triosa fuera de las células dando como producto GlcNAc y lactosa. La GlcNAc sería transportada dentro de la célula por algún sistema PTS aún no descrito, y/o por alguna permeasa independiente de sistemas PTS (Viana *et al.*, 2000). La lactosa sería transportada al interior celular por el PTS^{Lac} como lactosa-6P, y este azúcar fosforilado sería degradado por la fosfo- β -galactosidasa LacG a galactosa-6P y glucosa (Gosalbes *et al.*, 1997) (Fig. 4.2.1B).

Todas las glicosidasas caracterizadas hasta el momento en *L. casei*, incluyendo las fosfo- β -galactosidasas GnbG y LacG descritas en los capítulos 4.1 y 4.3 de esta tesis, y las α -L-fucosidasas AlfA, AlfB, y AlfC (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2011) caracterizadas previamente en nuestro laboratorio, son enzimas intracelulares. En el caso de BnaG, que es una enzima secretada y anclada a la pared celular, además de participar en la asimilación de azúcares libres específicos, podría también modificar N-acetilhexosaminil-glicanos asociados a proteínas y lípidos presentes en la superficie del epitelio gastrointestinal. En este sentido, hemos demostrado que BnaG es una enzima exoglicosidasa con especificidad por N-acetilhexosaminil- β 1,3-azúcares, y que libera *in vitro* GlcNAc a partir del disacárido 3'-N-acetilglucosaminil-manosa, el cual forma parte de glicoproteínas (Garrido *et al.*, 2012). Igualmente, BnaG también es capaz de liberar GalNAc a partir de 3'-N-acetilgalactosaminil-galactosa, el cual forma parte de la globotetraosa, este glicano está presente en glicoesfingolípidos humanos en superficies

celulares (Schnaar *et al.*, 2009). Los oligosacáridos que forman parte de estos lípidos han sido descritos recientemente como sustrato de lacto-N-biosidasas aisladas de *Bifidobacterium longum* subesp. *longum*, las cuales a diferencia de BnaG, son endoglicosidasas y liberan GNB (Gotoh *et al.*, 2015). La presencia de estas glicosidasas ancladas a la pared podría otorgarles una ventaja competitiva a las bifidobacterias y lactobacilos beneficiosos del intestino, al permitirles liberar y consumir azúcares ligados a complejos. Además, estas enzimas podrían también modular la actividad de receptores patógeno-hospedador o glicoproteínas del hospedador, mediante la modificación de las estructuras de los glicanos presentes en la superficie celular (Garrido *et al.*, 2012; Kobata, 2013).

Un análisis de las secuencias genómicas disponibles de lactobacilli (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>) demostró que el gen *bnag* no se encuentra presente en la especie de *L. rhamnosus*, que es una especie como ya se ha mencionado que pertenece al mismo grupo filogenético que *L. casei*. Sin embargo, la cepa *L. rhamnosus* HN001 fue capaz de utilizar lacto-N-triosa como fuente de carbono (Fig. 4.2.3B), sugiriendo que además de BnaG, las especies de lactobacilli tienen otras enzimas involucradas en el catabolismo de este trisacárido. Estos resultados están de acuerdo con estudios recientes que han demostrado que *L. rhamnosus* HN001 utiliza la lactosa y la GlcNAc como fuentes de carbono, mientras que *L. rhamnosus* GG es incapaz de utilizar lactosa (Ceapa *et al.*, 2015). Además, la cepa HN001 puede metabolizar una amplia variedad de carbohidratos que concuerda con su gran diversidad de genes involucrados en el transporte y utilización de azúcares (Ceapa *et al.*, 2015). Se desconoce todavía si *L. rhamnosus* HN001 es capaz de metabolizar lacto-N-triosa mediante glicosidasas extracelulares o ancladas a superficie, o si posee algún sistema de transporte capaz de internalizar este trisacárido, para después ser degradado intracelularmente.

L. casei BL23 puede crecer utilizando 3'-N-acetilglucosaminil-manosa como fuente de carbono, y a pesar de que este disacárido es sustrato en reacciones *in vitro* con la enzima BnaG purificada, su metabolismo en *L. casei* es independiente de esta enzima. La cepa BL126 mutante en la enzima I, componente general de los sistemas PTS (Viana *et al.*, 2000) no es capaz de fermentar este disacárido (Fig. 4.2.3D), permaneciendo así en el medio de cultivo. Estos resultados sugieren que la 3'-N-acetilglucosaminil-manosa

es transportada y fosforilada por un PTS, y podría ser hidrolizada dentro de la célula por alguna fosfo- β -glicosidasa aún desconocida (Fig. 4.2.1B). Los PTS caracterizados hasta el momento fosforilan los disacáridos transportados en el extremo no reductor (Senba *et al.*, 2000); por lo tanto, los productos generados después de la hidrólisis intracelular serían GlcNAc-P y manosa. Hemos demostrado que la manosa-6P isomerasa ManA está involucrada en el metabolismo de la 3'-N-acetilglucosaminil-manosa, esto sugiere que la manosa resultante de la hidrólisis del disacárido es fosforilada por una quinasa de manosa en la posición del carbono 6. La manosa-6P sería a continuación convertida en el intermediario de la glucólisis fructosa-6P por ManA (Fig. 4.2.1B). Utilizando la secuencia deducida de aminoácidos de ManA, realizamos una búsqueda con el programa BLAST contra el genoma de *L. casei* BL23 (Maze *et al.*, 2010), en donde hemos encontrado otra manosa-6P isomerasa (LCABL_06290). Esta isomerasa posee un 47% de homología (30% de identidad) con la ManA caracterizada en este capítulo. La presencia de esta segunda hipotética manosa-6P isomerasa podría explicar porque la cepa mutante BL381 (*manA*) alcanza una densidad óptica final similar a la cepa parental BL23 al crecerlas en 3'-N-acetilglucosaminil-manosa, a pesar de tener un crecimiento más lento. Por lo tanto, el catabolismo de la manosa liberada durante el metabolismo de la 3'-N-acetilglucosaminil-manosa en la cepa mutante BL381 podría depender de la capacidad de esta manosa-6P isomerasa adicional de utilizar la manosa-6P generada.

La especie de *L. casei* está asociada a la microbiota del tracto gastrointestinal en adultos y niños, es considerada beneficiosa para el hospedador y algunas cepas son comercializadas como probióticos (Albesharat *et al.*, 2011; Dietrich *et al.*, 2014; Douillard *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 2007; Turrone *et al.*, 2014). La capacidad de esta especie para colonizar y establecerse en el intestino, y de interactuar con el hospedador depende de sus capacidades metabólicas. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral representan la primera caracterización de los genes y rutas catabólicas para la utilización de LNB, GNB, LacNAc, GalNAc y lacto-N-triosa en Firmicutes, y en el caso de la LacNAc en bacterias. La versatilidad en la función de los genes del operón *gnb* y del operón *lac* probablemente representa la adaptación de estas bacterias a un medio ambiente particular como lo es el tracto gastrointestinal. Además, se ha evidenciado por primera vez el rol fisiológico de una β -N-acetilglucosaminidasa en lactobacilli. La localización extracelular de la β -N-Acetilglucosaminidasa estudiada aquí, y su actividad sobre glicanos asociados a mucosa humana o leche materna,

probablemente constituyan otra estrategia molecular de estas bacterias para sobrevivir en el intestino. Por otra parte, GnbG, LacG y BnaG fueron purificadas y caracterizadas bioquímicamente, con lo cual podrían ser herramientas útiles para el estudio de la función de las cadenas de azúcares presentes en glicoconjugados, así como también para la síntesis de oligosacáridos.

5.2. Producción de LNB y GNB, y evaluación de su potencial prebiótico e inmunomodulador

Estudios previos en donde se ha demostrado el efecto bifidogénico de LNB y GNB (Kiyohara *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2010), plantean la posibilidad de utilizar estos compuestos como ingredientes alimentarios, especialmente en leches de fórmula por su potencial efecto prebiótico. Para hacer esto posible es necesario diseñar procesos capaces de producir estos compuestos en grandes cantidades, esto permitiría en primer lugar profundizar en la investigación de sus propiedades y posteriormente comercializarlos. En este trabajo se ha descrito la síntesis de esos disacáridos mediante la transgalactosidación catalizada por la fosfo- β -galactosidasa GnbG, obteniendo un rendimiento aproximado del 70%. La eficiencia de esta reacción es especialmente alta si la comparamos con la eficiencia de otras glicosidasas, con las cuales se han obtenido rendimientos de entre el 20 y el 40% (Schmaltz *et al.*, 2011; Trincone, 2015). De hecho, LNB y GNB han sido previamente sintetizadas en reacciones de transglicosidación con la β -galactosidasa BgaC de *Bacillus circulans*, pero con rendimientos bajos (12.2 y 10.1% para LNB y GNB, respectivamente) (Fujimoto *et al.*, 1998). A pesar de que ambas enzimas, GnbG y BgaC pertenecen a la familia 35 de glicosil hidrolasas, solo presentan una identidad del 41% en su secuencia, lo cual podría explicar la gran diferencia en los rendimientos obtenidos por ambas enzimas. La LNB también ha sido sintetizada por transglicosidación con una galactosidasa aislada del patógeno de plantas *Xanthomonas manihotis* (Vetere *et al.*, 2000). Con esta enzima se obtuvo un rendimiento máximo de 55% después de 20 h de reacción. La reacción catalizada por GnbG posee la tasa más alta de transglicosidación para la síntesis de LNB y GNB descrita hasta la fecha. Ambos disacáridos también han sido sintetizados con un rendimiento alto mediante reacciones multi-enzimáticas de cuatro (sacarosa fosforilasa, lactoN-biosa fosforilasa, UDP-hexosa 1-P y UDP-glucosa 4-epimerasa) (Nishimoto and Kitaoka, 2007, 2009) o dos enzimas (galactosa-1P quinasa y lactoN-biosa fosforilasa)

(Yu *et al.*, 2010). Sin embargo, estas estrategias multi-enzimáticas requieren un control muy exhaustivo de las reacciones enzimáticas, y además utilizan sustratos caros como UDP-glucosa y ATP en el primer y segundo caso, respectivamente. Por lo tanto, la utilización de la enzima GnbG silvestre o una variante obtenida por mutagénesis dirigida y con características cinéticas que favorecen la estabilidad de los productos generados en las reacciones de transglicosidación, representa una estrategia alternativa, fácil y barata para la síntesis con alto rendimiento de LNB y GNB.

A diferencia del género *Bifidobacterium*, para el cual se ha descrito la utilización de LNB y GNB (Nishimoto and Kitaoka, 2007; Satoh *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2010), en el género *Lactobacillus* no se ha estudiado previamente el metabolismo de estos disacáridos. En esta tesis hemos demostrado que casi todas las cepas ensayadas de *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. zaeae*, *L. gasseri* y *L. johnsonii* se pueden cultivar en presencia de LNB y GNB, respectivamente. Estos resultados coinciden con el hecho de que en más del 80% de los genomas disponibles del grupo *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus*, se encuentran los genes del operón *gnb* responsables del transporte y catabolismo de estos azúcares. Del mismo modo, una de las cepas ensayadas de *L. zaeae* (BL95), especie filogenéticamente cercana al grupo *L. casei/paracasei/rhamnosus* (Vasquez *et al.*, 2005) y con el genoma disponible (número de acceso al GenBank BACQ00000000), contiene un operón *gnb* completo, que codifica para proteínas cuyas secuencias deducidas de aminoácidos poseen una identidad entre el 86 y 93% respecto de los productos de los genes del operón *gnb* de *L. casei* BL23. Los patrones de crecimiento en presencia de LNB o GNB, el análisis de los genomas disponibles y los resultados obtenidos en los experimentos de hibridación con el gen *gnbG* demuestran que la fermentación de LNB y GNB es una característica que se encuentra ampliamente distribuida en *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus/zaeae*. Este es un grupo de especies vinculados al hábitat gastrointestinal en donde se han caracterizado también los genes para la utilización de otros oligosacáridos importantes de la mucosa y la leche humana (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2012a), lo que hace presuponer un papel importante al metabolismo de estos sustratos para el desarrollo de estas bacterias en este nicho en particular.

Por otra parte, las cepas ensayadas de *L. gasseri* y *L. johnsonii*, dos especies filogenéticamente cercanas entre ellas (Zhang *et al.*, 2011), y ambas capaces de

metabolizar LNB y GNB, presentaron patrones de crecimiento similares, mostrando un fenotipo autolítico. Esta lisis celular podría deberse a la inducción de los profagos que han sido caracterizados previamente en los genomas de *L. gasseri* (Baugher *et al.*, 2014; Ismail *et al.*, 2009) y *L. johnsonii* (Denou *et al.*, 2008; Ventura *et al.*, 2003). Como ocurre en la mayoría de las cepas de *Lactobacillus* probadas, las cepas de *L. johnsonii* crecen mejor en GNB que en LNB. En este último disacárido las células comienzan a crecer exponencialmente solo después de 20 (cepa BL287) o 40 h (cepas BL261 y BL281), lo cual sugiere una inducción débil de los genes por LNB o la existencia de diferentes rutas metabólicas para LNB y GNB. Una búsqueda en los genomas de *L. gasseri* BL277 (ATCC 33323) (Azcarate-Peril *et al.*, 2008) y *L. johnsonii* BL287 (DSM 10533) (Sun *et al.*, 2015), mediante la herramienta BLAST utilizando la secuencia aminoacídica de la fosfo- β -galactosidasa GnbG de *L. casei* BL23, no encontró ninguna proteína con homología relevante, sugiriendo la ausencia de una enzima homóloga a GnbG en esas cepas. Esto también coincide con la ausencia de señal de hibridación en el ensayo de Southernblot, así que la hidrólisis de ambos disacáridos dependerá de otras glicosidasas. De hecho, el genoma de *L. gasseri* BL277 codifica para 20 glicosidasas putativas (Azcarate-Peril *et al.*, 2008), incluyendo varias fosfo- β -glicosidasas (Honda *et al.*, 2012; Nagaoka *et al.*, 2008). Del mismo modo, el genoma de *L. johnsonii* BL287 codifica para más de 20 hipotéticas glicosidasas. Sin embargo, la especificidad de todas estas enzimas es desconocida.

El potencial prebiótico de la LNB y GNB, demostrado anteriormente para el género *Bifidobacterium* y el demostrado en esta tesis para el género *Lactobacillus*, apoya la función atribuida a los oligosacáridos de la leche humana para estimular el crecimiento selectivo de una microbiota gastrointestinal beneficiosa en los niños alimentados con leche humana.

Otro de los efectos bioactivos que se les atribuye a los oligosacáridos es la capacidad de modular directamente la respuesta inmune (Osanya *et al.*, 2011; Pirapatdit *et al.*, 2008; Sonoyama *et al.*, 2005), así se han descrito efectos inmunomoduladores para OLH sialilados (Bode *et al.*, 2004a; Bode *et al.*, 2004b; Eiwegger *et al.*, 2010; Eiwegger *et al.*, 2004) y fucosilados (Atochina and Harn, 2005; Terrazas *et al.*, 2001). En esta tesis hemos analizado el potencial inmunomodulador de la LNB y GNB sintetizados durante el desarrollo de la misma, y de los fucosiloligosacáridos (Fuc1-3 y

Fuc1-6) sintetizados en trabajos previos de nuestro laboratorio (Becerra *et al.*, 2015; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2013). Se han utilizado modelos *in vitro* de incubación directa con PBMC y de co-cultivo de IEC con PBMC. Se ha evaluado la citotoxicidad de los cuatro disacáridos y su efecto modulador sobre la población de linfocitos T_{reg} y sobre la producción de citoquinas. Es de destacar, por un lado, la ausencia de efectos citotóxicos de los cuatro disacáridos sobre las IEC, siendo ésta una condición imprescindible para que un compuesto sea apto para consumo humano. Por otro lado, los resultados del efecto de los disacáridos sobre la producción de citoquinas por las PBMC demostraron que los cuatro oligosacáridos son capaces de incrementar significativamente la producción de IFN- γ y el Fuc1-6GlcNAc además, es capaz de disminuir significativamente la producción de IL13.

El mecanismo por el cual los oligosacáridos afectan a la producción de citoquinas por los linfocitos se desconoce. Se ha sugerido que los OLH podrían interferir con la unión específica de las lectinas a sus receptores glicanos (Bode, 2012). Así, las galectinas, que son lectinas con afinidad por los β -galactosidos, son secretadas por distintos tipos celulares para regular la homeostasis de células del sistema inmune y la inflamación (Cerliani *et al.*, 2011; Rabinovich *et al.*, 2002; Zhuo and Bellis, 2011). La galectina 3 está asociada a un rol proinflamatorio en enfermedades caracterizadas por la fibrosis (Henderson *et al.*, 2006; Nishi *et al.*, 2007), y a la promoción de la activación de macrófagos (MacKinnon *et al.*, 2008; Sano *et al.*, 2000). Algunos estudios indican que la ausencia de galectina 3 promueve el desarrollo de respuestas Th1 más fuertes, con disminución en la producción de IL4 y aumentos de la producción de INF- γ (Saegusa *et al.*, 2009; Zuberi *et al.*, 2004). La exposición a lactosa, la cual se une a galectina 3, es capaz de interrumpir la interacción entre la galectina 3 y su receptor en los linfocitos T, eliminando los efectos de la misma (Demetriou *et al.*, 2001). Curiosamente, se ha descrito que la LNB tiene una afinidad a galectina 3 similar a la que tiene la lactosa (Fort *et al.*, 2006), pero si en el aumento en la producción de INF- γ por las PBMC que se ha observado aquí en presencia de LNB está o no implicada la galectina 3 tiene todavía que ser investigado.

Los resultados obtenidos en esta Tesis acerca del potencial inmunomodulador de la LNB, GNB, Fuc1-3 y Fuc1-6 sugieren una estimulación de la respuesta inmune como consecuencia de la interacción directa entre las PBMC y esos disacáridos. Además, el

efecto inmunomodulador demostrado para el disacárido Fuc1-6GlcNAc sobre la producción de IFN- γ e IL13, sugiere un aumento en la polarización de la respuesta inmune Th1 sobre la Th2, lo cual podría ser beneficioso en relación a la prevención de enfermedades asociadas a fuertes respuestas Th2 como son las enfermedades alérgicas (Zhu *et al.*, 2007) y asma (Kitagaki *et al.*, 2002). Para demostrar esta hipótesis se requieren nuevas investigaciones que permitan determinar el mecanismo de acción que subyace al efecto del disacárido Fuc1-6 sobre la producción de citoquinas, así como ampliar el estudio a otras citoquinas y proteínas importantes que intervienen en la respuesta inmune, como podrían ser las galectinas y/o quimioquinas entre otras.

6. Conclusiones



6.1. Conclusiones

1. *Lactobacillus casei* BL23 es capaz de metabolizar oligosacáridos presentes en la leche humana y mucosa gastrointestinal, como son la lacto-N-biosa, galacto-N-biosa, N-acetilgalactosamina, lacto-N-triosa y 3'-N-acetilglucosaminil-manosa.
2. El metabolismo de la lacto-N-biosa, galacto-N-biosa y también de la N-acetilgalactosamina en *Lactobacillus casei* BL23 depende de la expresión del operon *gnbREFGBCDA*. Los tres carbohidratos son transportados por el mismo sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS^{Gnb}) codificado por los genes *gnbBCDA*. El gen *gnbG* codifica para una fosfo-β-galactosidasa implicada en la hidrólisis de ambos disacáridos, sin embargo, la N-acetilgalactosamina-6P deacetilasa, codificada por *gnbF*, y la galactosamina-6P isomerasa/deaminasa, codificada por *gnbE*, están implicadas en la fermentación de la galacto-N-biosa, pero no de la lacto-N-biosa. La utilización de ésta depende del gen *nagA*, que codifica para una N-acetilglucosamina-6P deacetilasa.
3. El operon *gnb* de *Lactobacillus casei* BL23 está regulado por inducción debida a la galacto-N-biosa y N-acetilgalactosamina mediada por el represor transcripcional GnbR, el cual se une a una región promotora de DNA de 26 pares de bases que contiene secuencias invertidas repetidas exhibiendo un núcleo conservado 2T/2A.
4. En el metabolismo de la lacto-N-triosa en *Lactobacillus casei* BL23 está implicada la enzima β-N-acetilglucosaminidasa BnaG codificada por el gen *bnag*. Esta enzima es una exoglicosidasa extracelular anclada a la pared celular e hidroliza la lacto-N-triosa en N-acetilglucosamina y lactosa. Por debajo del gen *bnag* se encuentra el gen *manA*, que codifica para una manosa-6P isomerasa, implicada en el metabolismo de la manosa presente en el disacárido 3'-N-acetilglucosaminil-manosa, el cual es transportado por el PTS.

5. La N-acetilactosamina en *Lactobacillus casei* BL23 es transportada y fosforilada por el PTS de la lactosa, e hidrolizada intracelularmente por la fosfo- β -galactosidasa LacG en galactosa-6P y GlcNAc. El operon *lac*, además de por la lactosa, está también inducido por la N-acetilactosamina a través del antiterminador transcripcional LacT.
6. En *Lactobacillus casei* BL23 la ruta de la tagatosa-6P está codificada por los genes *lacRIABD2C* y está implicada en el metabolismo de la galactosa-6P resultante del metabolismo de la lacto-N-biosa, galacto-N-biosa, N-acetilactosamina y lactosa.
7. Se han sintetizado y purificado a escala semi-preparativa los disacáridos lacto-N-biosa y galacto-N-biosa utilizando la actividad de transgalactosidación de la fosfo- β -galactosidasa GnbG aislada de *Lactobacillus casei* BL23. Se obtuvo un rendimiento de 10.7 ± 0.2 g/l de lacto-N-biosa y 10.8 ± 0.3 g/l de galacto-N-biosa.
8. Los disacáridos lacto-N-biosa y galacto-N-biosa son fermentados *in vitro* por especies del género *Lactobacillus*, sugiriendo un potencial prebiótico para ambos disacáridos. La capacidad de utilización de ambos disacáridos por las cepas del grupo filogenético *L. casei/paracasei/rhamnosus/zeae* se correlaciona con la presencia de genes homólogos al gen *gnbG* de *Lactobacillus casei* BL23.
9. La lacto-N-biosa, galacto-N-biosa, fucosil- α -1,3-N-acetilglucosamina y fucosil- α -1,6-N-acetilglucosamina tienen un efecto inmunomodulador. Los cuatro disacáridos son capaces de incrementar significativamente la producción de IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica. El fucosil- α -1,6-N-acetilglucosamina además reduce significativamente la producción de IL13.

7. Bibliografía



7.1. Bibliografía

- Abrahams, S.W., and Labbok, M.H. (2011). Breastfeeding and otitis media: a review of recent evidence. *Curr Allergy Asthma Rep* 11, 508-512.
- Acedo-Felix, E., and Perez-Martinez, G. (2003). Significant differences between *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393T and a commonly used plasmid-cured derivative revealed by a polyphasic study. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 67-75.
- Ahrne, S., Lonnermark, E., Wold, A.E., Aberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I.L., Molin, G., and Adlerberth, I. (2005). Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 7, 1256-1262.
- Albesharat, R., Ehrmann, M.A., Korakli, M., Yazaji, S., and Vogel, R.F. (2011). Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and applied microbiology* 34, 148-155.
- Albrecht, S., Schols, H.A., van den Heuvel, E.G., Voragen, A.G., and Gruppen, H. (2010). CE-LIF-MS n profiling of oligosaccharides in human milk and feces of breast-fed babies. *Electrophoresis* 31, 1264-1273.
- Albrecht, S., Schols, H.A., van den Heuvel, E.G., Voragen, A.G., and Gruppen, H. (2011a). Occurrence of oligosaccharides in feces of breast-fed babies in their first six months of life and the corresponding breast milk. *Carbohydrate research* 346, 2540-2550.
- Albrecht, S., Schols, H.A., van Zoeren, D., van Lingen, R.A., Groot Jebbink, L.J., van den Heuvel, E.G., Voragen, A.G., and Gruppen, H. (2011b). Oligosaccharides in feces of breast- and formula-fed babies. *Carbohydrate research* 346, 2173-2181.
- Alcantara, C., and Zuniga, M. (2012). Proteomic and transcriptomic analysis of the response to bile stress of *Lactobacillus casei* BL23. *Microbiology* 158, 1206-1218.
- Alpert, C.A., and Chassy, B.M. (1990). Molecular cloning and DNA sequence of lacE, the gene encoding the lactose-specific enzyme II of the phosphotransferase system of *Lactobacillus casei*. Evidence that a cysteine residue is essential for sugar phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 265, 22561-22568.
- Alpert, C.A., and Siebers, U. (1997). The lac operon of *Lactobacillus casei* contains lacT, a gene coding for a protein of the Bg1G family of transcriptional antiterminators. *Journal of bacteriology* 179, 1555-1562.
- Altermann, E., Russell, W.M., Azcarate-Peril, M.A., Barrangou, R., Buck, B.L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Duong, T., Callanan, M., *et al.* (2005). Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3906-3912.
- Aly, M.R., Ibrahim el, S.I., Ashry el, S.H., and Schmidt, R.R. (1999). Synthesis of lacto-N-neotetraose and lacto-N-tetraose using the dimethylmaleoyl group as amino protective group. *Carbohydrate research* 316, 121-132.
- Aly, M.R.E.E.I., S. I.; El Ashry, E. S. H.; Schmidt, R. R. (2000). Synthesis of Lacto-N-neohexaose and Lacto-N-neooctaose Using the Dimethylmaleoyl Moiety as an Amino Protective Group. *Eur. J. Org. Chem.* 2000, 319-323 .
- Amrein, K.E., Takacs, B., Stieger, M., Molnos, J., Flint, N.A., and Burn, P. (1995). Purification and characterization of recombinant human p50csk protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial

- chaperones GroES and GroEL. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 1048-1052.
- Anderson, D.C., and Springer, T.A. (1987). Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. Annual review of medicine 38, 175-194.
- Andersson, B., Porras, O., Hanson, L.A., Lagergard, T., and Svanborg-Eden, C. (1986). Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. J Infect Dis 153, 232-237.
- Angeloni, S., Ridet, J.L., Kusy, N., Gao, H., Crevoisier, F., Guinchard, S., Kochhar, S., Sigrist, H., and Sprenger, N. (2005). Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. Glycobiology 15, 31-41.
- Anthony, B.F., Eisenstadt, R., Carter, J., Kim, K.S., and Hobel, C.J. (1981). Genital and intestinal carriage of group B streptococci during pregnancy. J Infect Dis 143, 761-766.
- Aragon, F., Carino, S., Perdigon, G., and de Moreno de LeBlanc, A. (2014). The administration of milk fermented by the probiotic *Lactobacillus casei* CRL 431 exerts an immunomodulatory effect against a breast tumour in a mouse model. Immunobiology 219, 457-464.
- Aragon, F., Carino, S., Perdigon, G., and de Moreno de LeBlanc, A. (2015). Inhibition of Growth and Metastasis of Breast Cancer in Mice by Milk Fermented With *Lactobacillus casei* CRL 431. Journal of immunotherapy 38, 185-196.
- Arraj, J.A., and Marinus, M.G. (1983). Phenotypic reversal in dam mutants of *Escherichia coli* K-12 by a recombinant plasmid containing the dam+ gene. Journal of bacteriology 153, 562-565.
- Arslanoglu, S., Moro, G.E., Schmitt, J., Tandoi, L., Rizzardi, S., and Boehm, G. (2008). Early dietary intervention with a mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of allergic manifestations and infections during the first two years of life. The Journal of nutrition 138, 1091-1095.
- Asakuma, S., Hatakeyama, E., Urashima, T., Yoshida, E., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai, H., Ashida, H., Hirose, J., and Kitaoka, M. (2011). Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. The Journal of biological chemistry 286, 34583-34592.
- Ashida, H., Yamamoto, K., Murata, T., Usui, T., and Kumagai, H. (2000). Characterization of endo-alpha-N-acetylgalactosaminidase from *Bacillus* sp. and syntheses of neo-oligosaccharides using its transglycosylation activity. Archives of biochemistry and biophysics 373, 394-400.
- Astronomo, R.D., and Burton, D.R. (2010). Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations? Nature reviews. Drug discovery 9, 308-324.
- Atochina, O., and Harn, D. (2005). LNFPIII/LeX-stimulated macrophages activate natural killer cells via CD40-CD40L interaction. Clinical and diagnostic laboratory immunology 12, 1041-1049.
- Auguste, P., Fallavollita, L., Wang, N., Burnier, J., Bikfalvi, A., and Brodt, P. (2007). The host inflammatory response promotes liver metastasis by increasing tumor cell arrest and extravasation. The American journal of pathology 170, 1781-1792.
- Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E., Goh, Y.J., Tallon, R., Sanozky-Dawes, R.B., Pfeiler, E.A., O'Flaherty, S., Buck, B.L., Dobson, A., Duong, T., et al. (2008). Analysis of the genome sequence of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 reveals the molecular basis of an autochthonous intestinal organism. Applied and environmental microbiology 74, 4610-4625.

- Aznar, and Zuñiga. (2011). ¿Qué son las bacterias lácticas? from http://redbal.iata.csic.es/sabias_que.php.
- Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915-1920.
- Balogh, R., Jankovics, P., and Beni, S. (2015). Qualitative and quantitative analysis of N-acetylglucosamine and lacto-N-biose, the two major building blocks of human milk oligosaccharides in human milk samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a porous graphitic carbon column. *J Chromatogr A* 1422, 140-146.
- Bao, Y., Zhu, L., and Newburg, D.S. (2007). Simultaneous quantification of sialyloligosaccharides from human milk by capillary electrophoresis. *Analytical biochemistry* 370, 206-214.
- Barbosa-Cesnik, C., Schwartz, K., and Foxman, B. (2003). Lactation mastitis. *Jama* 289, 1609-1612.
- Barboza, M., Pinzon, J., Wickramasinghe, S., Froehlich, J.W., Moeller, I., Smilowitz, J.T., Ruhaak, L.R., Huang, J., Lonnerdal, B., German, J.B., *et al.* (2012). Glycosylation of human milk lactoferrin exhibits dynamic changes during early lactation enhancing its role in pathogenic bacteria-host interactions. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 11, M111 015248.
- Bartlett, J.G. (2008). Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46 Suppl 1, S4-11.
- Bauerl, C., Llopis, M., Antolin, M., Monedero, V., Mata, M., Zuniga, M., Guarner, F., and Perez Martinez, G. (2013). *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus plantarum* strains downregulate proinflammatory genes in an ex vivo system of cultured human colonic mucosa. *Genes & nutrition* 8, 165-180.
- Baughner, J.L., Durmaz, E., and Klaenhammer, T.R. (2014). Spontaneously induced prophages in *Lactobacillus gasseri* contribute to horizontal gene transfer. *Applied and environmental microbiology* 80, 3508-3517.
- Baumgartner, F., Seitz, L., Sprenger, G.A., and Albermann, C. (2013). Construction of *Escherichia coli* strains with chromosomally integrated expression cassettes for the synthesis of 2'-fucosyllactose. *Microbial cell factories* 12, 40.
- Baumgartner, F., Sprenger, G.A., and Albermann, C. (2015). Galactose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* for the production of lacto-N-tetraose. *Enzyme Microb Technol* 75-76, 37-43.
- Bay, F.T. (2006). Carbohydrate antigens as targets for antitumor immunotherapy. *Rev Francoph Lab.* , 381:339–346.
- Becerra, J.E., Coll-Marques, J.M., Rodriguez-Diaz, J., Monedero, V., and Yebra, M.J. (2015). Preparative scale purification of fucosyl-N-acetylglucosamine disaccharides and their evaluation as potential prebiotics and antiadhesins. *Applied microbiology and biotechnology* 99, 7165-7176.
- Berg, T.J., Stryer L. (2007). Carbohydrates. *Biochemistry*, 6th ed. New York: WH Freeman and Company.
- Bernatchez, S., Szymanski, C.M., Ishiyama, N., Li, J., Jarrell, H.C., Lau, P.C., Berghuis, A.M., Young, N.M., and Wakarchuk, W.W. (2005). A single bifunctional UDP-GlcNAc/Glc 4-epimerase supports the synthesis of three cell surface glycoconjugates in *Campylobacter jejuni*. *The Journal of biological chemistry* 280, 4792-4802.

- Bertram, R., Rigali, S., Wood, N., Lulko, A.T., Kuipers, O.P., and Titgemeyer, F. (2011). Regulon of the N-acetylglucosamine utilization regulator NagR in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 193, 3525-3536.
- Bettenbrock, K., Siebers, U., Ehrenreich, P., and Alpert, C.A. (1999). *Lactobacillus casei* 64H contains a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system for uptake of galactose, as confirmed by analysis of *ptsH* and different *gal* mutants. *Journal of bacteriology* 181, 225-230.
- Biavati, B., and Mattarelli, P. (2006). The Family Bifidobacteriaceae. The Prokaryotes. Springer New York.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-1523.
- Bode, L. (2012). Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 22, 1147-1162.
- Bode, L. (2015). The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early human development* 91, 619-622.
- Bode, L., Kunz, C., Muhly-Reinholz, M., Mayer, K., Seeger, W., and Rudloff, S. (2004a). Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides. *Thromb Haemost* 92, 1402-1410.
- Bode, L., Rudloff, S., Kunz, C., Strobel, S., and Klein, N. (2004b). Human milk oligosaccharides reduce platelet-neutrophil complex formation leading to a decrease in neutrophil beta 2 integrin expression. *J Leukoc Biol* 76, 820-826.
- Boehm, G., and Moro, G. (2008). Structural and functional aspects of prebiotics used in infant nutrition. *The Journal of nutrition* 138, 1818S-1828S.
- Bouhours, J.F., and Bouhours, D. (1979). Galactosylceramide is the major cerebroside of human milk fat globule membrane. *Biochemical and biophysical research communications* 88, 1217-1222.
- Bourand, A., Yebra, M.J., Boel, G., Maze, A., and Deutscher, J. (2013). Utilization of D-ribitol by *Lactobacillus casei* BL23 requires a mannose-type phosphotransferase system and three catabolic enzymes. *Journal of bacteriology* 195, 2652-2661.
- Bozue, J.A., Tullius, M.V., Wang, J., Gibson, B.W., and Munson, R.S., Jr. (1999). *Haemophilus ducreyi* produces a novel sialyltransferase. Identification of the sialyltransferase gene and construction of mutants deficient in the production of the sialic acid-containing glycoform of the lipooligosaccharide. *The Journal of biological chemistry* 274, 4106-4114.
- Bridiau, N., Issaoui, N., and Maugard, T. (2010). The effects of organic solvents on the efficiency and regioselectivity of N-acetyl-lactosamine synthesis, using the beta-galactosidase from *Bacillus circulans* in hydro-organic media. *Biotechnology progress* 26, 1278-1289.
- Bridiau, N., and Maugard, T. (2011). A comparative study of the regioselectivity of the beta-galactosidases from *Kluyveromyces lactis* and *Bacillus circulans* in the enzymatic synthesis of N-Acetyl-lactosamine in aqueous media. *Biotechnology progress* 27, 386-394.
- Brinkkotter, A., Kloss, H., Alpert, C., and Lengeler, J.W. (2000). Pathways for the utilization of N-acetyl-galactosamine and galactosamine in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 37, 125-135.
- Brockhausen, I. (1999). Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 1473, 67-95.
- Brockhausen, I., Schachter, H., and Stanley, P. (2009). O-GalNAc Glycans. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P.

- Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY)).
- Cai, H., Thompson, R., Budinich, M.F., Broadbent, J.R., and Steele, J.L. (2009). Genome sequence and comparative genome analysis of *Lactobacillus casei*: insights into their niche-associated evolution. *Genome biology and evolution* 1, 239-257.
- Campbell, B.J., Finnie, I.A., Hounsell, E.F., and Rhodes, J.M. (1995). Direct demonstration of increased expression of Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in colonic adenocarcinoma and ulcerative colitis mucin and its concealment in normal mucin. *The Journal of clinical investigation* 95, 571-576.
- Campbell, J.R., Hillier, S.L., Krohn, M.A., Ferrieri, P., Zaleznik, D.F., and Baker, C.J. (2000). Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. *Obstet Gynecol* 96, 498-503.
- Cano-Mancera, R., and Lopez-Revilla, R. (1987). Inhibition of the adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes by carbohydrates. *Parasitol Res* 74, 18-22.
- Cappione, A.J., Pugh-Bernard, A.E., Anolik, J.H., and Sanz, I. (2004). Lupus IgG VH4.34 antibodies bind to a 220-kDa glycoform of CD45/B220 on the surface of human B lymphocytes. *Journal of immunology* 172, 4298-4307.
- Carlson, S.E., and House, S.G. (1986). Oral and intraperitoneal administration of N-acetylneuraminic acid: effect on rat cerebral and cerebellar N-acetylneuraminic acid. *The Journal of nutrition* 116, 881-886.
- Ceapa, C., Lambert, J., van Limpt, K., Wels, M., Smokvina, T., Knol, J., and Kleerebezem, M. (2015). Correlation of *Lactobacillus rhamnosus* Genotypes and Carbohydrate Utilization Signatures Determined by Phenotype Profiling. *Applied and environmental microbiology* 81, 5458-5470.
- Cerliani, J.P., Stowell, S.R., Mascanfroni, I.D., Arthur, C.M., Cummings, R.D., and Rabinovich, G.A. (2011). Expanding the universe of cytokines and pattern recognition receptors: galectins and glycans in innate immunity. *Journal of clinical immunology* 31, 10-21.
- Clarke, G., Cryan, J.F., Dinan, T.G., and Quigley, E.M. (2012). Review article: probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome--focus on lactic acid bacteria. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 35, 403-413.
- Coates, E.W., Karlowicz, M.G., Croitoru, D.P., and Buescher, E.S. (2005). Distinctive distribution of pathogens associated with peritonitis in neonates with focal intestinal perforation compared with necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 116, e241-246.
- Comstock, S.S., Wang, M., Hester, S.N., Li, M., and Donovan, S.M. (2014). Select human milk oligosaccharides directly modulate peripheral blood mononuclear cells isolated from 10-d-old pigs. *The British journal of nutrition* 111, 819-828.
- Coppa, G.V., Pierani, P., Zampini, L., Bruni, S., Carloni, I., and Gabrielli, O. (2001). Characterization of oligosaccharides in milk and feces of breast-fed infants by high-performance anion-exchange chromatography. *Advances in experimental medicine and biology* 501, 307-314.
- Coppa, G.V., Pierani, P., Zampini, L., Carloni, I., Carlucci, A., and Gabrielli, O. (1999). Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatr Suppl* 88, 89-94.
- Corfield, A.P., Wagner, S.A., Clamp, J.R., Kriaris, M.S., and Hoskins, L.C. (1992). Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyltransferase, N-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infection and immunity* 60, 3971-3978.

- Coulier, L., Timmermans, J., Bas, R., Van Den Dool, R., Haaksman, I., Klarenbeek, B., Slaghek, T., and Van Dongen, W. (2009). In-depth characterization of prebiotic galacto-oligosaccharides by a combination of analytical techniques. *Journal of agricultural and food chemistry* 57, 8488-8495.
- Coutsoudis, A., Dabis, F., Fawzi, W., Gaillard, P., Haverkamp, G., Harris, D.R., Jackson, J.B., Leroy, V., Meda, N., Msellati, P., *et al.* (2004). Late postnatal transmission of HIV-1 in breast-fed children: an individual patient data meta-analysis. *J Infect Dis* 189, 2154-2166.
- Crociani, F., Alessandrini, A., Mucci, M.M., and Biavati, B. (1994). Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *International journal of food microbiology* 24, 199-210.
- Crocker, P.R., Paulson, J.C., and Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nature reviews. Immunology* 7, 255-266.
- Chassy, B.M., and Alpert, C.A. (1989). Molecular characterization of the plasmid-encoded lactose-PTS of *Lactobacillus casei*. *FEMS microbiology reviews* 5, 157-165.
- Chaturvedi, P., Warren, C.D., Altaye, M., Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G., Pickering, L.K., and Newburg, D.S. (2001a). Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology* 11, 365-372.
- Chaturvedi, P., Warren, C.D., Buescher, C.R., Pickering, L.K., and Newburg, D.S. (2001b). Survival of human milk oligosaccharides in the intestine of infants. *Advances in experimental medicine and biology* 501, 315-323.
- Chen, X., Kowal, P., and Wang, P.G. (2000). Large-scale enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Curr Opin Drug Discov Devel* 3, 756-763.
- Chen, X., and Varki, A. (2010). Advances in the biology and chemistry of sialic acids. *ACS Chem Biol* 5, 163-176.
- Chessa, D., Winter, M.G., Jakomin, M., and Baumler, A.J. (2009). Salmonella enterica serotype Typhimurium Std fimbriae bind terminal alpha(1,2)fucose residues in the cecal mucosa. *Molecular microbiology* 71, 864-875.
- Chin, Y.W., Kim, J.Y., Lee, W.H., and Seo, J.H. (2015). Enhanced production of 2'-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* BL21star(DE3) by modulation of lactose metabolism and fucosyltransferase. *Journal of biotechnology* 210, 107-115.
- Cho, Y.J., Sinha, J., Park, J.P., and Yun, J.W. (2001). Production of inulooligosaccharides from chicory extract by endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5. *Enzyme Microb Technol* 28, 439-445.
- Dale, G.E., Schonfeld, H.J., Langen, H., and Stieger, M. (1994). Increased solubility of trimethoprim-resistant type S1 DHFR from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli* cells overproducing the chaperonins GroEL and GroES. *Protein engineering* 7, 925-931.
- Dallas, D.C., Martin, W.F., Strum, J.S., Zivkovic, A.M., Smilowitz, J.T., Underwood, M.A., Affolter, M., Lebrilla, C.B., and German, J.B. (2011). N-linked glycan profiling of mature human milk by high-performance microfluidic chip liquid chromatography time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 59, 4255-4263.
- Darzi, J., Frost, G.S., and Robertson, M.D. (2011). Do SCFA have a role in appetite regulation? *The Proceedings of the Nutrition Society* 70, 119-128.
- Davidson, B., Meinzen-Derr, J.K., Wagner, C.L., Newburg, D.S., and Morrow, A.L. (2004). Fucosylated oligosaccharides in human milk in relation to gestational age and stage of lactation. *Advances in experimental medicine and biology* 554, 427-430.

- Davidson, L.A., and Lonnerdal, B. (1987). Persistence of human milk proteins in the breast-fed infant. *Acta paediatrica Scandinavica* 76, 733-740.
- de Kivit, S., Saeland, E., Kraneveld, A.D., van de Kant, H.J., Schouten, B., van Esch, B.C., Knol, J., Sprikkelman, A.B., van der Aa, L.B., Knippels, L.M., *et al.* (2012). Galectin-9 induced by dietary synbiotics is involved in suppression of allergic symptoms in mice and humans. *Allergy* 67, 343-352.
- De Leoz, M.L., Kalanetra, K.M., Bokulich, N.A., Strum, J.S., Underwood, M.A., German, J.B., Mills, D.A., and Lebrilla, C.B. (2015). Human milk glycomics and gut microbial genomics in infant feces show a correlation between human milk oligosaccharides and gut microbiota: a proof-of-concept study. *Journal of proteome research* 14, 491-502.
- de Vos, W.M., and Vaughan, E.E. (1994). Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews* 15, 217-237.
- de Vrese, M., and Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 111, 1-66.
- Delgado, S., Arroyo, R., Jimenez, E., Marin, M.L., del Campo, R., Fernandez, L., and Rodriguez, J.M. (2009). Staphylococcus epidermidis strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC microbiology* 9, 82.
- Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S., and Dennis, J.W. (2001). Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 409, 733-739.
- Denou, E., Pridmore, R.D., Ventura, M., Pittet, A.C., Zwahlen, M.C., Berger, B., Barretto, C., Panoff, J.M., and Brussow, H. (2008). The role of prophage for genome diversification within a clonal lineage of *Lactobacillus johnsonii*: characterization of the defective prophage LJ771. *Journal of bacteriology* 190, 5806-5813.
- Derrien, M., van Passel, M.W., van de Bovenkamp, J.H., Schipper, R.G., de Vos, W.M., and Dekker, J. (2010). Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut microbes* 1, 254-268.
- Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P.W. (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 70, 939-1031.
- Devaraj, N., Sheykhazari, M., Warren, W.S., and Bhavanandan, V.P. (1994). Differential binding of *Pseudomonas aeruginosa* to normal and cystic fibrosis tracheobronchial mucins. *Glycobiology* 4, 307-316.
- Dietrich, C.G., Kottmann, T., and Alavi, M. (2014). Commercially available probiotic drinks containing *Lactobacillus casei* DN-114001 reduce antibiotic-associated diarrhea. *World journal of gastroenterology* 20, 15837-15844.
- Dimitroff, C.J., Descheny, L., Trujillo, N., Kim, R., Nguyen, V., Huang, W., Pienta, K.J., Kutok, J.L., and Rubin, M.A. (2005). Identification of leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells. *Cancer research* 65, 5750-5760.
- Doores, K.J., Bonomelli, C., Harvey, D.J., Vasiljevic, S., Dwek, R.A., Burton, D.R., Crispin, M., and Scanlan, C.N. (2010). Envelope glycans of immunodeficiency virions are almost entirely oligomannose antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 13800-13805.
- Douillard, F.P., Ribbera, A., Kant, R., Pietila, T.E., Jarvinen, H.M., Messing, M., Randazzo, C.L., Paulin, L., Laine, P., Ritari, J., *et al.* (2013). Comparative genomic

- and functional analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* strains and their comparison with strain GG. PLoS genetics 9, e1003683.
- Downham, M.A., Scott, R., Sims, D.G., Webb, J.K., and Gardner, P.S. (1976). Breast-feeding protects against respiratory syncytial virus infections. Br Med J 2, 274-276.
- Drouillard, S., Mine, T., Kajiwara, H., Yamamoto, T., and Samain, E. (2010). Efficient synthesis of 6'-sialyllactose, 6,6'-disialyllactose, and 6'-KDO-lactose by metabolically engineered E. coli expressing a multifunctional sialyltransferase from the Photobacterium sp. JT-ISH-224. Carbohydrate research 345, 1394-1399.
- Eiwegger, T., Stahl, B., Haidl, P., Schmitt, J., Boehm, G., Dehlink, E., Urbanek, R., and Szepefalusi, Z. (2010). Prebiotic oligosaccharides: *in vitro* evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. Pediatr Allergy Immunol 21, 1179-1188.
- Eiwegger, T., Stahl, B., Schmitt, J., Boehm, G., Gerstmayr, M., Pichler, J., Dehlink, E., Loibichler, C., Urbanek, R., and Szepefalusi, Z. (2004). Human milk--derived oligosaccharides and plant-derived oligosaccharides stimulate cytokine production of cord blood T-cells *in vitro*. Pediatr Res 56, 536-540.
- El-Hawiet, A., Kitova, E.N., Kitov, P.I., Eugenio, L., Ng, K.K., Mulvey, G.L., Dingle, T.C., Szpacenko, A., Armstrong, G.D., and Klassen, J.S. (2011). Binding of Clostridium difficile toxins to human milk oligosaccharides. Glycobiology 21, 1217-1227.
- Endo, T., Koizumi, S., Tabata, K., and Ozaki, A. (2000). Large-scale production of CMP-NeuAc and sialylated oligosaccharides through bacterial coupling. Applied microbiology and biotechnology 53, 257-261.
- Engfer, M.B., Stahl, B., Finke, B., Sawatzki, G., and Daniel, H. (2000). Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. The American journal of clinical nutrition 71, 1589-1596.
- Falk, P., Hoskins, L.C., and Larson, G. (1990). Bacteria of the human intestinal microbiota produce glycosidases specific for lacto-series glycosphingolipids. Journal of biochemistry 108, 466-474.
- Fernandes, C.F., and Chandan, R.C. (1992). Fermented Dairy Products and Health The Lactic Acid Bacteria Volume 1. Springer US:.
- Fernandez-Mayoralas, A.M.-L., M (1986). Synthesis of 3- and 2'Fucosyl-lactose and 3,2'-Difucosyl-lactose from Partially Benzylated Lactose Derivatives. Carbohydr. Res 154, 93-101
- Fierfort, N., and Samain, E. (2008). Genetic engineering of *Escherichia coli* for the economical production of sialylated oligosaccharides. Journal of biotechnology 134, 261-265.
- Finne, J., Breimer, M.E., Hansson, G.C., Karlsson, K.A., Leffler, H., Vliegenthart, J.F., and van Halbeek, H. (1989). Novel polyfucosylated N-linked glycopeptides with blood group A, H, X, and Y determinants from human small intestinal epithelial cells. The Journal of biological chemistry 264, 5720-5735.
- Firon, N., Ofek, I., and Sharon, N. (1983). Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. Carbohydrate research 120, 235-249.
- Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A., and Pot, B. (2007). Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. World journal of gastroenterology 13, 236-243.

- Fort, S., Kim, H.S., and Hindsgaul, O. (2006). Screening for galectin-3 inhibitors from synthetic lacto-N-biose libraries using microscale affinity chromatography coupled to mass spectrometry. *The Journal of organic chemistry* 71, 7146-7154.
- Francl, A.L., Hoeflinger, J.L., and Miller, M.J. (2012). Identification of lactose phosphotransferase systems in *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 required for lactose utilization. *Microbiology* 158, 944-952.
- Fransen, C.T., Van Laere, K.M., van Wijk, A.A., Brull, L.P., Dignum, M., Thomas-Oates, J.E., Haverkamp, J., Schols, H.A., Voragen, A.G., Kamerling, J.P., *et al.* (1998). α -D-Glcp-(1 \leftrightarrow 1)-beta-D-Galp-containing oligosaccharides, novel products from lactose by the action of beta-galactosidase. *Carbohydrate research* 314, 101-114.
- Frey, P.A. (1996). The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J* 10, 461-470.
- Freymond, P.P., Lazarevic, V., Soldo, B., and Karamata, D. (2006). Poly(glucosyl-N-acetylgalactosamine 1-phosphate), a wall teichoic acid of *Bacillus subtilis* 168: its biosynthetic pathway and mode of attachment to peptidoglycan. *Microbiology* 152, 1709-1718.
- Froehlich, J.W., Dodds, E.D., Barboza, M., McJimpsey, E.L., Seipert, R.R., Francis, J., An, H.J., Freeman, S., German, J.B., and Lebrilla, C.B. (2010). Glycoprotein expression in human milk during lactation. *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 6440-6448.
- Fuhrer, A., Sprenger, N., Kurakevich, E., Borsig, L., Chassard, C., and Hennet, T. (2010). Milk sialyllactose influences colitis in mice through selective intestinal bacterial colonization. *The Journal of experimental medicine* 207, 2843-2854.
- Fujimoto, H., Miyasato, M., Ito, Y., Sasaki, T., and Ajisaka, K. (1998). Purification and properties of recombinant beta-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Glycoconjugate journal* 15, 155-160.
- Fujita, K., Oura, F., Nagamine, N., Katayama, T., Hiratake, J., Sakata, K., Kumagai, H., and Yamamoto, K. (2005). Identification and molecular cloning of a novel glycoside hydrolase family of core 1 type O-glycan-specific endo-alpha-N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. *The Journal of biological chemistry* 280, 37415-37422.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Suzuki, T., *et al.* (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469, 543-547.
- Fushinobu, S. (2010). Unique sugar metabolic pathways of bifidobacteria. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74, 2374-2384.
- Gabrielli, O., Zampini, L., Galeazzi, T., Padella, L., Santoro, L., Peila, C., Giuliani, F., Bertino, E., Fabris, C., and Coppa, G.V. (2011). Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics* 128, e1520-1531.
- Garrido, D., Ruiz-Moyano, S., Jimenez-Espinoza, R., Eom, H.J., Block, D.E., and Mills, D.A. (2013). Utilization of galactooligosaccharides by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* isolates. *Food microbiology* 33, 262-270.
- Garrido, D., Ruiz-Moyano, S., and Mills, D.A. (2012). Release and utilization of N-acetyl-D-glucosamine from human milk oligosaccharides by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. *Anaerobe* 18, 430-435.
- Gasser, F., and Mandel, M. (1968). Deoxyribonucleic acid base composition of the genus *Lactobacillus*. *Journal of bacteriology* 96, 580-588.

- Giavazzi, R., Foppolo, M., Dossi, R., and Remuzzi, A. (1993). Rolling and adhesion of human tumor cells on vascular endothelium under physiological flow conditions. *The Journal of clinical investigation* 92, 3038-3044.
- Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J.V., Rastall, R.A., and Roberfroid, M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 17, 259-275.
- Gibson, G.R., and Wang, X. (1994). Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol* 77, 412-420.
- Gilewski, T.A., Ragupathi, G., Dickler, M., Powell, S., Bhuta, S., Panageas, K., Koganty, R.R., Chin-Eng, J., Hudis, C., Norton, L., *et al.* (2007). Immunization of high-risk breast cancer patients with clustered sTn-KLH conjugate plus the immunologic adjuvant QS-21. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 2977-2985.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzocchi, G., Poggioli, G., Miglioli, M., and Campieri, M. (2000). Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 119, 305-309.
- Gleeson, M., Bishop, N.C., Oliveira, M., and Tauler, P. (2011). Daily probiotic's (*Lactobacillus casei* Shirota) reduction of infection incidence in athletes. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism* 21, 55-64.
- Gnoth, M.J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E., and Rudloff, S. (2000). Human milk oligosaccharides are minimally digested *in vitro*. *The Journal of nutrition* 130, 3014-3020.
- Gnoth, M.J., Rudloff, S., Kunz, C., and Kinne, R.K. (2001). Investigations of the *in vitro* transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *The Journal of biological chemistry* 276, 34363-34370.
- Gonia, S., Tuepker, M., Heisel, T., Autran, C., Bode, L., and Gale, C.A. (2015). Human Milk Oligosaccharides Inhibit *Candida albicans* Invasion of Human Premature Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of nutrition* 145, 1992-1998.
- Gopal, P.K., and Gill, H.S. (2000). Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *The British journal of nutrition* 84 Suppl 1, S69-74.
- Gordon, S. (2008). Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *European journal of immunology* 38, 3257-3264.
- Gosalbes, M.J., Esteban, C.D., Galan, J.L., and Perez-Martinez, G. (2000). Integrative food-grade expression system based on the lactose regulon of *Lactobacillus casei*. *Applied and environmental microbiology* 66, 4822-4828.
- Gosalbes, M.J., Esteban, C.D., and Perez-Martinez, G. (2002). *In vivo* effect of mutations in the antiterminator LacT in *Lactobacillus casei*. *Microbiology* 148, 695-702.
- Gosalbes, M.J., Monedero, V., Alpert, C.A., and Perez-Martinez, G. (1997). Establishing a model to study the regulation of the lactose operon in *Lactobacillus casei*. *FEMS microbiology letters* 148, 83-89.
- Gosalbes, M.J., Monedero, V., and Perez-Martinez, G. (1999). Elements involved in catabolite repression and substrate induction of the lactose operon in *Lactobacillus casei*. *Journal of bacteriology* 181, 3928-3934.
- Gotoh, A., Katoh, T., Sugiyama, Y., Kurihara, S., Honda, Y., Sakurama, H., Kambe, T., Ashida, H., Kitaoka, M., Yamamoto, K., *et al.* (2015). Novel substrate specificities of two lacto-N-biosidases towards beta-linked galacto-N-biose-containing oligosaccharides of globo H, Gb5, and GA1. *Carbohydrate research* 408, 18-24.

- Goulas, T., Goulas, A., Tzortzis, G., and Gibson, G.R. (2009). Expression of four beta-galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB41171 and their contribution on the hydrolysis and synthesis of galactooligosaccharides. *Applied microbiology and biotechnology* 84, 899-907.
- Guillot, J., Guerry, M., Kanska, G., Caldefie-Chezet, F., De Latour, M., and Penault-Llorca, F. (2004). Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas. *Bulletin du cancer* 91, 141-158.
- Gustafsson, A., Hultberg, A., Sjostrom, R., Kacs Kovics, I., Breimer, M.E., Boren, T., Hammarstrom, L., and Holgersson, J. (2006). Carbohydrate-dependent inhibition of *Helicobacter pylori* colonization using porcine milk. *Glycobiology* 16, 1-10.
- Gustafsson, B.E., Karlsson, K.A., Larson, G., Midtvedt, T., Stromberg, N., Teneberg, S., and Thurin, J. (1986). Glycosphingolipid patterns of the gastrointestinal tract and feces of germ-free and conventional rats. *The Journal of biological chemistry* 261, 15294-15300.
- Hakomori, S.I. (2008). Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. *Biochimica et biophysica acta* 1780, 325-346.
- Haller, D., Bode, C., Hammes, W.P., Pfeifer, A.M., Schiffrin, E.J., and Blum, S. (2000). Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 47, 79-87.
- Hammes, W.P., and Hertel, C. (2006). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *The Prokaryotes*. . Springer US. Vol. 4.
- Han, N.S., Kim, T.J., Park, Y.C., Kim, J., and Seo, J.H. (2012). Biotechnological production of human milk oligosaccharides. *Biotechnology advances* 30, 1268-1278.
- Hanisch, F.G. (2001). O-glycosylation of the mucin type. *Biological chemistry* 382, 143-149.
- Hayer, S., Steiner, G., Gortz, B., Reiter, E., Tohidast-Akrad, M., Amling, M., Hoffmann, O., Redlich, K., Zwerina, J., Skriner, K., *et al.* (2005). CD44 is a determinant of inflammatory bone loss. *The Journal of experimental medicine* 201, 903-914.
- He, F., Morita, H., Ouwehand, A.C., Hosoda, M., Hiramatsu, M., Kurisaki, J., Isolauri, E., Benno, Y., and Salminen, S. (2002). Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by *Bifidobacterium* strains. *Microbiology and immunology* 46, 781-785.
- He, F., Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Hashimoto, H., Benno, Y., and Salminen, S. (2001). Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS immunology and medical microbiology* 30, 43-47.
- Hedbys, L., Johansson, E., Mosbach, K., and Larsson, P.O. (1989). Synthesis of 2-acetamido-2-deoxy-3-O-beta-D-galactopyranosyl-D-galactose by the sequential use of beta-D-galactosidases from bovine testes and *Escherichia coli*. *Carbohydrate research* 186, 217-223.
- Henderson, N.C., Mackinnon, A.C., Farnworth, S.L., Poirier, F., Russo, F.P., Iredale, J.P., Haslett, C., Simpson, K.J., and Sethi, T. (2006). Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 5060-5065.
- Hirayama, K., and Rafter, J. (1999). The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention: mechanistic considerations. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 391-394.

- Holman, R.C., Stoll, B.J., Clarke, M.J., and Glass, R.I. (1997). The epidemiology of necrotizing enterocolitis infant mortality in the United States. *Am J Public Health* 87, 2026-2031.
- Holman, R.C., Stoll, B.J., Curns, A.T., Yorita, K.L., Steiner, C.A., and Schonberger, L.B. (2006). Necrotising enterocolitis hospitalisations among neonates in the United States. *Paediatr Perinat Epidemiol* 20, 498-506.
- Honda, H., Nagaoka, S., Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J., Yamazaki, Y., Tateno, Y., Kitazawa, H., and Saito, T. (2012). Purification and characterization of two phospho-beta-galactosidases, LacG1 and LacG2, from *Lactobacillus gasseri* ATCC33323(T). *The Journal of general and applied microbiology* 58, 11-17.
- Honeyman, A.L., and Curtiss, R., 3rd (1993). Isolation, characterization and nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans* lactose-specific enzyme II (*lacE*) gene of the PTS and the phospho-beta-galactosidase (*lacG*) gene. *Journal of general microbiology* 139, 2685-2694.
- Hong, P., Ninonuevo, M.R., Lee, B., Lebrilla, C., and Bode, L. (2009). Human milk oligosaccharides reduce HIV-1-gp120 binding to dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN). *The British journal of nutrition* 101, 482-486.
- Hoskins, L.C., Agustines, M., McKee, W.B., Boulding, E.T., Kriaris, M., and Niedermeyer, G. (1985). Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. *The Journal of clinical investigation* 75, 944-953.
- Hsu, Y., Lu, X.A., Zulueta, M.M., Tsai, C.M., Lin, K.I., Hung, S.C., and Wong, C.H. (2012). Acyl and silyl group effects in reactivity-based one-pot glycosylation: synthesis of embryonic stem cell surface carbohydrates Lc4 and IV(2)Fuc-Lc4. *Journal of the American Chemical Society* 134, 4549-4552.
- Hu, D., Zhang, F., Zhang, H., Hao, L., Gong, X., Geng, M., Cao, M., Zheng, F., Zhu, J., Pan, X., *et al.* (2014). The beta-galactosidase (BgaC) of the zoonotic pathogen *Streptococcus suis* is a surface protein without the involvement of bacterial virulence. *Scientific reports* 4, 4140.
- Hu, L., Allison, S.L., and Phillips, A.T. (1989). Identification of multiple repressor recognition sites in the hut system of *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology* 171, 4189-4195.
- Hu, L., Crawford, S.E., Czako, R., Cortes-Penfield, N.W., Smith, D.F., Le Pendu, J., Estes, M.K., and Prasad, B.V. (2012). Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* 485, 256-259.
- Hu, Z., Patel, I.R., and Mukherjee, A. (2013). Genetic analysis of the roles of *agaA*, *agaI*, and *agaS* genes in the N-acetyl-D-galactosamine and D-galactosamine catabolic pathways in *Escherichia coli* strains O157:H7 and C. *BMC microbiology* 13, 94.
- Hunt, K.M., Foster, J.A., Forney, L.J., Schutte, U.M., Beck, D.L., Abdo, Z., Fox, L.K., Williams, J.E., McGuire, M.K., and McGuire, M.A. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PloS one* 6, e21313.
- Hyeon, J.E., Kang, D.H., Kim, Y.I., You, S.K., and Han, S.O. (2012). GntR-type transcriptional regulator PckR negatively regulates the expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of bacteriology* 194, 2181-2188.

- Hyland, R.M., Griener, T.P., Mulvey, G.L., Kitov, P.I., Srivastava, O.P., Marcato, P., and Armstrong, G.D. (2006). Basis for N-acetyllactosamine-mediated inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* localized adherence. *Journal of medical microbiology* 55, 669-675.
- Ichikawa, Y., Look, G.C., and Wong, C.H. (1992). Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis. *Analytical biochemistry* 202, 215-238.
- Islam, A., Stoll, B.J., Ljungstrom, I., Biswas, J., Nazrul, H., and Huldt, G. (1988). The prevalence of *Entamoeba histolytica* in lactating women and in their infants in Bangladesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82, 99-103.
- Ismail, E.A., Neve, H., Geis, A., and Heller, K.J. (2009). Characterization of temperate *Lactobacillus gasseri* phage LgaI and its impact as prophage on autolysis of its lysogenic host strains. *Current microbiology* 58, 648-653.
- Ito, S.N., S. Shibayama, T. Ogawa (1992). *J. Org. Chem.*, 57
- Itzkowitz, S.H., Yuan, M., Montgomery, C.K., Kjeldsen, T., Takahashi, H.K., Bigbee, W.L., and Kim, Y.S. (1989). Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer research* 49, 197-204.
- Jantscher-Krenn, E., Lauwaet, T., Bliss, L.A., Reed, S.L., Gillin, F.D., and Bode, L. (2012a). Human milk oligosaccharides reduce *Entamoeba histolytica* attachment and cytotoxicity *in vitro*. *The British journal of nutrition* 108, 1839-1846.
- Jantscher-Krenn, E., Zherebtsov, M., Nissan, C., Goth, K., Guner, Y.S., Naidu, N., Choudhury, B., Grishin, A.V., Ford, H.R., and Bode, L. (2012b). The human milk oligosaccharide disialyllacto-N-tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats. *Gut* 61, 1417-1425.
- Jensen, P.H., Kolarich, D., and Packer, N.H. (2010). Mucin-type O-glycosylation--putting the pieces together. *The FEBS journal* 277, 81-94.
- Jensen, R.G. (1999). Lipids in human milk. *Lipids* 34, 1243-1271.
- Jeong, J.K., Kwon, O., Lee, Y.M., Oh, D.B., Lee, J.M., Kim, S., Kim, E.H., Le, T.N., Rhee, D.K., and Kang, H.A. (2009). Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* BgaC protein as a novel surface beta-galactosidase with specific hydrolysis activity for the Galbeta1-3GlcNAc moiety of oligosaccharides. *Journal of bacteriology* 191, 3011-3023.
- Johnson, P.H., and Watkins, W.M. (1992). Purification of the Lewis blood-group gene associated alpha-3/4-fucosyltransferase from human milk: an enzyme transferring fucose primarily to type 1 and lactose-based oligosaccharide chains. *Glycoconjugate journal* 9, 241-249.
- Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., and Arul, V. (2013). Probiotics and its functionally valuable products-a review. *Critical reviews in food science and nutrition* 53, 641-658.
- Karimi, G., Sabran, M.R., Jamaluddin, R., Parvaneh, K., Mohtarrudin, N., Ahmad, Z., Khazaai, H., and Khodavandi, A. (2015). The anti-obesity effects of *Lactobacillus casei* strain Shirota versus Orlistat on high fat diet-induced obese rats. *Food & nutrition research* 59, 29273.
- Kasche, V. (1986). Mechanism and yields in enzyme catalysed equilibrium and kinetically controlled synthesis of β -lactam antibiotics, peptides and other condensation products. *Enzyme Microb. Technol.*
- Kato, I., Endo, K., and Yokokura, T. (1994). Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. *International journal of immunopharmacology* 16, 29-36.

- Kelly, C.P., and LaMont, J.T. (1998). Clostridium difficile infection. Annual review of medicine 49, 375-390.
- Khailova, L., Mount Patrick, S.K., Arganbright, K.M., Halpern, M.D., Kinouchi, T., and Dvorak, B. (2010). *Bifidobacterium bifidum* reduces apoptosis in the intestinal epithelium in necrotizing enterocolitis. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 299, G1118-1127.
- Kim, H.M., Kim, I.J., and Danishefsky, S.J. (2001). Total syntheses of tumor-related antigens N3: probing the feasibility limits of the glycal assembly method. Journal of the American Chemical Society 123, 35-48.
- Kimura, Y., Sakamura, S., Ushijima, T., Hama, Y., Kajiura, H., Fujiyama, K., Okihara, K., Hashimoto, K., Sugimoto, H., and Yamada, H. (2007). Evidence for new beta1-3 galactosyltransferase activity involved in biosynthesis of unusual N-glycan harboring T-antigen in *Apis mellifera*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 71, 1111-1114.
- Kitagaki, K., Jain, V.V., Businga, T.R., Hussain, I., and Kline, J.N. (2002). Immunomodulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides on established th2 responses. Clinical and diagnostic laboratory immunology 9, 1260-1269.
- Kitaoka, M., Tian, J., and Nishimoto, M. (2005). Novel putative galactose operon involving lacto-N-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. Applied and environmental microbiology 71, 3158-3162.
- Kiyohara, M., Tachizawa, A., Nishimoto, M., Kitaoka, M., Ashida, H., and Yamamoto, K. (2009). Prebiotic effect of lacto-N-biose I on bifidobacterial growth. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 73, 1175-1179.
- Klaffl, S., Brocker, M., Kalinowski, J., Eikmanns, B.J., and Bott, M. (2013). Complex regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene *pck* and characterization of its GntR-type regulator *IolR* as a repressor of myo-inositol utilization genes in *Corynebacterium glutamicum*. Journal of bacteriology 195, 4283-4296.
- Kligler, B., and Cohrssen, A. (2008). Probiotics. American family physician 78, 1073-1078.
- Kobata, A. (2003). Possible application of milk oligosaccharides for drug development. Chang Gung medical journal 26, 621-636.
- Kobata, A. (2010). Structures and application of oligosaccharides in human milk. Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences 86, 731-747.
- Kobata, A. (2013). Exo- and endoglycosidases revisited. Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences 89, 97-117.
- Koshland, D. (1953). Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. . Biol. Rev. .
- Kudo, T., Iwai, T., Kubota, T., Iwasaki, H., Takayama, Y., Hiruma, T., Inaba, N., Zhang, Y., Gotoh, M., Togayachi, A., et al. (2002). Molecular cloning and characterization of a novel UDP-Gal:GalNAc(alpha) peptide beta 1,3-galactosyltransferase (C1Gal-T2), an enzyme synthesizing a core 1 structure of O-glycan. The Journal of biological chemistry 277, 47724-47731.
- Kumazaki, T., and Yoshida, A. (1984). Biochemical evidence that secretor gene, *Se*, is a structural gene encoding a specific fucosyltransferase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81, 4193-4197.
- Kuntz, S., Kunz, C., and Rudloff, S. (2009). Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth-related cell cycle genes in intestinal epithelial cells. The British journal of nutrition 101, 1306-1315.

- Kuntz, S., Rudloff, S., and Kunz, C. (2008). Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed intestinal cells. *The British journal of nutrition* 99, 462-471.
- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N., and Strobel, S. (2000). Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annual review of nutrition* 20, 699-722.
- Kunz, C., Rudloff, S., Schad, W., and Braun, D. (1999). Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. *The British journal of nutrition* 82, 391-399.
- Laegreid, A., Kolsto Otnaess, A.B., and Bryn, K. (1986). Purification of human milk gangliosides by silica gel chromatography and analysis of trifluoroacetate derivatives by gas chromatography. *Journal of chromatography* 377, 59-67.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lafraya, A., Sanz-Aparicio, J., Polaina, J., and Marin-Navarro, J. (2011). Fructo-oligosaccharide synthesis by mutant versions of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. *Applied and environmental microbiology* 77, 6148-6157.
- Landete, J.M., Garcia-Haro, L., Blasco, A., Manzanares, P., Berbegal, C., Monedero, V., and Zuniga, M. (2010). Requirement of the *Lactobacillus casei* MaeKR two-component system for L-malic acid utilization via a malic enzyme pathway. *Applied and environmental microbiology* 76, 84-95.
- Lane, J.A., Mehra, R.K., Carrington, S.D., and Hickey, R.M. (2011). Development of biosensor-based assays to identify anti-infective oligosaccharides. *Analytical biochemistry* 410, 200-205.
- Larson, G., Falk, P., and Hoskins, L.C. (1988). Degradation of human intestinal glycosphingolipids by extracellular glycosidases from mucin-degrading bacteria of the human fecal flora. *The Journal of biological chemistry* 263, 10790-10798.
- Lasky, L.A. (1992). Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258, 964-969.
- Lay, L.M., L.; Schmidt, R. R. (1998). Synthesis of N-Acetylglucosamine Containing Lewis X and Lewis X Building Blocks Based on N-Tetrachlorophthaloyl Protection—Synthesis of Lewis X Pentasaccharide. *Carbohydr. Res.* 310, 157-171.
- Le Coq, D., Lindner, C., Kruger, S., Steinmetz, M., and Stulke, J. (1995). New beta-glucoside (bgl) genes in *Bacillus subtilis*: the bglP gene product has both transport and regulatory functions similar to those of BglF, its *Escherichia coli* homolog. *Journal of bacteriology* 177, 1527-1535.
- Lee, H., An, H.J., Lerno, L.A., Jr., German, J.B., and Lebrilla, C.B. (2011). Rapid Profiling of Bovine and Human Milk Gangliosides by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *International journal of mass spectrometry* 305, 138-150.
- Lee, J.C., Wu, C.Y., Apon, J.V., Siuzdak, G., and Wong, C.H. (2006). Reactivity-based one-pot synthesis of the tumor-associated antigen N3 minor octasaccharide for the development of a photocleavable DIOS-MS sugar array. *Angewandte Chemie* 45, 2753-2757.
- Lee, W.H., Pathanibul, P., Quarterman, J., Jo, J.H., Han, N.S., Miller, M.J., Jin, Y.S., and Seo, J.H. (2012). Whole cell biosynthesis of a functional oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, using engineered *Escherichia coli*. *Microbial cell factories* 11, 48.
- Leloir, L.F. (1951). The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. *Archives of biochemistry and biophysics* 33, 186-190.

- Leloup, L., Ehrlich, S.D., Zagorec, M., and Morel-Deville, F. (1997). Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the ptsI and lacL genes. *Applied and environmental microbiology* 63, 2117-2123.
- Lenoir, M., Del Carmen, S., Cortes-Perez, N.G., Lozano-Ojalvo, D., Munoz-Provencio, D., Chain, F., Langella, P., de Moreno de LeBlanc, A., LeBlanc, J.G., and Bermudez-Humaran, L.G. (2016). *Lactobacillus casei* BL23 regulates T and Th17 T-cell populations and reduces DMH-associated colorectal cancer. *Journal of gastroenterology*. DOI 10.1007/s00535-015-1158-9
- Leong-Morgenthaler, P., Zwahlen, M.C., and Hottinger, H. (1991). Lactose metabolism in *Lactobacillus bulgaricus*: analysis of the primary structure and expression of the genes involved. *Journal of bacteriology* 173, 1951-1957.
- Lesman-Movshovich, E., Lerrer, B., and Gilboa-Garber, N. (2003). Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* lectins by human milk glycans. *Can J Microbiol* 49, 230-235.
- Leyn, S.A., Gao, F., Yang, C., and Rodionov, D.A. (2012). N-acetylgalactosamine utilization pathway and regulon in proteobacteria: genomic reconstruction and experimental characterization in *Shewanella*. *The Journal of biological chemistry* 287, 28047-28056.
- Li, M., Monaco, M.H., Wang, M., Comstock, S.S., Kuhlenschmidt, T.B., Fahey, G.C., Jr., Miller, M.J., Kuhlenschmidt, M.S., and Donovan, S.M. (2014). Human milk oligosaccharides shorten rotavirus-induced diarrhea and modulate piglet mucosal immunity and colonic microbiota. *The ISME journal* 8, 1609-1620.
- Lin, M.H., Yang, Y.L., Chen, Y.P., Hua, K.F., Lu, C.P., Sheu, F., Lin, G.H., Tsay, S.S., Liang, S.M., and Wu, S.H. (2011). A novel exopolysaccharide from the biofilm of *Thermus aquaticus* YT-1 induces the immune response through Toll-like receptor 2. *The Journal of biological chemistry* 286, 17736-17745.
- Lindberg, A.A., Brown, J.E., Stromberg, N., Westling-Ryd, M., Schultz, J.E., and Karlsson, K.A. (1987). Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1. *The Journal of biological chemistry* 262, 1779-1785.
- Link, A.J., Phillips, D., and Church, G.M. (1997). Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *Journal of bacteriology* 179, 6228-6237.
- Liu, B., and Newburg, D.S. (2013). Human milk glycoproteins protect infants against human pathogens. *Breastfeeding medicine : the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine* 8, 354-362.
- LoCascio, R.G., Ninonuevo, M.R., Freeman, S.L., Sela, D.A., Grimm, R., Lebrilla, C.B., Mills, D.A., and German, J.B. (2007). Glycoprofiling of bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides demonstrates strain specific, preferential consumption of small chain glycans secreted in early human lactation. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 8914-8919.
- Love, K.R., and Seeberger, P.H. (2005). Solution syntheses of protected type II Lewis blood group oligosaccharides: study for automated synthesis. *The Journal of organic chemistry* 70, 3168-3177.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193, 265-275.
- Lu, L.X., S.; Jin, L.; Zhang, D.; Li, Y.; Xiao, M. (2012). Synthesis of galactosyl sucralose by β -galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus* L3. *Food Chem.* 134, 269-275.

- Lucas, A., and Cole, T.J. (1990). Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet* 336, 1519-1523.
- Lucas, A., Morley, R., Cole, T.J., Gore, S.M., Lucas, P.J., Crowle, P., Pearce, R., Boon, A.J., and Powell, R. (1990). Early diet in preterm babies and developmental status at 18 months. *Lancet* 335, 1477-1481.
- Lloyd, K.O., Burchell, J., Kudryashov, V., Yin, B.W., and Taylor-Papadimitriou, J. (1996). Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells. *The Journal of biological chemistry* 271, 33325-33334.
- Macfarlane, G.T., Steed, H., and Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of applied microbiology* 104, 305-344.
- MacKinnon, A.C., Farnworth, S.L., Hodgkinson, P.S., Henderson, N.C., Atkinson, K.M., Leffler, H., Nilsson, U.J., Haslett, C., Forbes, S.J., and Sethi, T. (2008). Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *Journal of immunology* 180, 2650-2658.
- Madsen, K.L., Doyle, J.S., Jewell, L.D., Tavernini, M.M., and Fedorak, R.N. (1999). *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 116, 1107-1114.
- Makinen, K., Berger, B., Bel-Rhliid, R., and Ananta, E. (2012). Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *Journal of biotechnology* 162, 356-365.
- Malhotra, R., Ward, M., Bright, H., Priest, R., Foster, M.R., Hurle, M., Blair, E., and Bird, M. (2003). Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5, 123-133.
- Manuel, S.G., Rangunath, C., Sait, H.B., Izano, E.A., Kaplan, J.B., and Ramasubbu, N. (2007). Role of active-site residues of dispersin B, a biofilm-releasing beta-hexosaminidase from a periodontal pathogen, in substrate hydrolysis. *The FEBS journal* 274, 5987-5999.
- Manzoni, L.L., L.; Schmidt, R. R. (1998). Synthesis of Lewisia and LewisX Pentasaccharides Based on N-Trichloroethoxycarbonyl Protection. *J. Carbohydr. Chem.* 310,157-71.
- Marcobal, A., Barboza, M., Froehlich, J.W., Block, D.E., German, J.B., Lebrilla, C.B., and Mills, D.A. (2010). Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 5334-5340.
- Marcobal, A., Barboza, M., Sonnenburg, E.D., Pudlo, N., Martens, E.C., Desai, P., Lebrilla, C.B., Weimer, B.C., Mills, D.A., German, J.B., *et al.* (2011). Bacteroides in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. *Cell host & microbe* 10, 507-514.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., *et al.* (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic acids research* 43, D222-226.
- Martens, E.C., Roth, R., Heuser, J.E., and Gordon, J.I. (2009). Coordinate regulation of glycan degradation and polysaccharide capsule biosynthesis by a prominent human gut symbiont. *The Journal of biological chemistry* 284, 18445-18457.
- Martin-Sosa, S., Martin, M.J., and Hueso, P. (2002). The sialylated fraction of milk oligosaccharides is partially responsible for binding to enterotoxigenic and

- uropathogenic *Escherichia coli* human strains. *The Journal of nutrition* 132, 3067-3072.
- Martin, R., Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Jimenez, E., Fernandez, L., Smidt, H., and Rodriguez, J.M. (2007). Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Research in microbiology* 158, 31-37.
- Martin, R., Miquel, S., Ulmer, J., Kechaou, N., Langella, P., and Bermudez-Humaran, L.G. (2013). Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease. *Microbial cell factories* 12, 71.
- Matsumoto, K., Takada, T., Shimizu, K., Moriyama, K., Kawakami, K., Hirano, K., Kajimoto, O., and Nomoto, K. (2010). Effects of a probiotic fermented milk beverage containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on defecation frequency, intestinal microbiota, and the intestinal environment of healthy individuals with soft stools. *Journal of bioscience and bioengineering* 110, 547-552.
- Maze, A., Boel, G., Zuniga, M., Bourand, A., Loux, V., Yebra, M.J., Monedero, V., Correia, K., Jacques, N., Beauflis, S., *et al.* (2010). Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *Journal of bacteriology* 192, 2647-2648.
- Michalak, M.L., D. M.; Jers, C.; Almeida, J. R. M.; Willer, M.; Li, H.; Kirpekar, F.; Kjærulff, L.; Gotfredsen, C. H.; Nordvang, R. T.; Meyer, A. S.; Mikkelsen, J. D. (2014). Biocatalytic production of 3'-sialyllactose by use of a modified sialidase with superior trans-sialidase activity. *Process Biochem.* 49, 265-270.
- Midtvedt, A.C., Carlstedt-Duke, B., Norin, K.E., Saxerholt, H., and Midtvedt, T. (1988). Development of five metabolic activities associated with the intestinal microflora of healthy infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 7, 559-567.
- Midtvedt, T., Carlstedt-Duke, B., Hoverstad, T., Midtvedt, A.C., Norin, K.E., and Saxerholt, H. (1987). Establishment of a biochemically active intestinal ecosystem in ex-germfree rats. *Applied and environmental microbiology* 53, 2866-2871.
- Miles, F.L., Pruitt, F.L., van Golen, K.L., and Cooper, C.R. (2008). Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clinical & experimental metastasis* 25, 305-324.
- Miller-Podraza, H., Lanne, B., Angstrom, J., Teneberg, S., Milh, M.A., Jovall, P.A., Karlsson, H., and Karlsson, K.A. (2005). Novel binding epitope for *Helicobacter pylori* found in neolacto carbohydrate chains: structure and cross-binding properties. *The Journal of biological chemistry* 280, 19695-19703.
- Miwa, M., Horimoto, T., Kiyohara, M., Katayama, T., Kitaoka, M., Ashida, H., and Yamamoto, K. (2010). Cooperation of beta-galactosidase and beta-N-acetylhexosaminidase from bifidobacteria in assimilation of human milk oligosaccharides with type 2 structure. *Glycobiology* 20, 1402-1409.
- Miyauchi, S., Hirasawa, A., Ichimura, A., Hara, T., and Tsujimoto, G. (2010). New frontiers in gut nutrient sensor research: free fatty acid sensing in the gastrointestinal tract. *Journal of pharmacological sciences* 112, 19-24.
- Monedero, V., Gosalbes, M.J., and Perez-Martinez, G. (1997). Catabolite repression in *Lactobacillus casei* ATCC 393 is mediated by CcpA. *Journal of bacteriology* 179, 6657-6664.
- Monteiro, M.A., Chan, K.H., Rasko, D.A., Taylor, D.E., Zheng, P.Y., Appelmelk, B.J., Wirth, H.P., Yang, M., Blaser, M.J., Hynes, S.O., *et al.* (1998). Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. Molecular mimicry between h. pylori lipopolysaccharides and

- human gastric epithelial cell surface glycoforms. *The Journal of biological chemistry* 273, 11533-11543.
- Moran, A.P., Gupta, A., and Joshi, L. (2011). Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut* 60, 1412-1425.
- Moreno-Arribas, M.V., and Polo, M.C. (2008). Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. *Food microbiology* 25, 875-881.
- Moro, G., Arslanoglu, S., Stahl, B., Jelinek, J., Wahn, U., and Boehm, G. (2006). A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. *Archives of disease in childhood* 91, 814-819.
- Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G.M., Altaye, M., Jiang, X., Guerrero, M.L., Meinzen-Derr, J.K., Farkas, T., Chaturvedi, P., Pickering, L.K., and Newburg, D.S. (2004). Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr* 145, 297-303.
- Mukai, T., Kaneko, S., Matsumoto, M., and Ohori, H. (2004). Binding of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. *International journal of food microbiology* 90, 357-362.
- Muller, R., Hulsmeier, A.J., Altmann, F., Ten Hagen, K., Tiemeyer, M., and Hennet, T. (2005). Characterization of mucin-type core-1 beta1-3 galactosyltransferase homologous enzymes in *Drosophila melanogaster*. *The FEBS journal* 272, 4295-4305.
- Munoz-Provencio, D., Perez-Martinez, G., and Monedero, V. (2010). Characterization of a fibronectin-binding protein from *Lactobacillus casei* BL23. *Journal of applied microbiology* 108, 1050-1059.
- Munoz-Provencio, D., Rodriguez-Diaz, J., Collado, M.C., Langella, P., Bermudez-Humaran, L.G., and Monedero, V. (2012). Functional analysis of the *Lactobacillus casei* BL23 sortases. *Applied and environmental microbiology* 78, 8684-8693.
- Mysore, J.V., Wigginton, T., Simon, P.M., Zopf, D., Heman-Ackah, L.M., and Dubois, A. (1999). Treatment of *Helicobacter pylori* infection in rhesus monkeys using a novel antiadhesion compound. *Gastroenterology* 117, 1316-1325.
- Naarding, M.A., Ludwig, I.S., Groot, F., Berkhout, B., Geijtenbeek, T.B., Pollakis, G., and Paxton, W.A. (2005). Lewis X component in human milk binds DC-SIGN and inhibits HIV-1 transfer to CD4+ T lymphocytes. *The Journal of clinical investigation* 115, 3256-3264.
- Nagaoka, S., Honda, H., Ohshima, S., Kawai, Y., Kitazawa, H., Tateno, Y., Yamazaki, Y., and Saito, T. (2008). Identification of five phospho-beta-glycosidases from *Lactobacillus gasserii* ATCC33323T cultured in lactose medium. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 72, 1954-1957.
- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P.V., Jain, S., and Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS microbiology letters* 334, 1-15.
- Nakajima, K., Kinoshita, M., Matsushita, N., Urashima, T., Suzuki, M., Suzuki, A., and Kakehi, K. (2006). Capillary affinity electrophoresis using lectins for the analysis of milk oligosaccharide structure and its application to bovine colostrum oligosaccharides. *Analytical biochemistry* 348, 105-114.
- Nanno, M., Kato, I., Kobayashi, T., and Shida, K. (2011). Biological effects of probiotics: what impact does *Lactobacillus casei* shirota have on us? *International journal of immunopathology and pharmacology* 24, 45S-50S.

- Neeser, J.R., Granato, D., Rouvet, M., Servin, A., Teneberg, S., and Karlsson, K.A. (2000). *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology* 10, 1193-1199.
- Neu, J., and Walker, W.A. (2011). Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med* 364, 255-264.
- Newburg, D.S. (2009). Neonatal protection by an innate immune system of human milk consisting of oligosaccharides and glycans. *Journal of animal science* 87, 26-34.
- Newburg, D.S., and Chaturvedi, P. (1992). Neutral glycolipids of human and bovine milk. *Lipids* 27, 923-927.
- Newburg, D.S., Ruiz-Palacios, G.M., and Morrow, A.L. (2005). Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annual review of nutrition* 25, 37-58.
- Newburg, D.S., Shen, Z., and Warren, C.D. (2000). Quantitative analysis of human milk oligosaccharides by capillary electrophoresis. *Advances in experimental medicine and biology* 478, 381-382.
- Nishi, Y., Sano, H., Kawashima, T., Okada, T., Kuroda, T., Kikkawa, K., Kawashima, S., Tanabe, M., Goto, T., Matsuzawa, Y., *et al.* (2007). Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 56, 57-65.
- Nishimoto, M., and Kitaoka, M. (2007). Identification of N-acetylhexosamine 1-kinase in the complete lacto-N-biose I/galacto-N-biose metabolic pathway in *Bifidobacterium longum*. *Applied and environmental microbiology* 73, 6444-6449.
- Nishimoto, M., and Kitaoka, M. (2009). One-pot enzymatic production of beta-D-galactopyranosyl-(1->3)-2-acetamido-2-deoxy-D-galactose (galacto-N-biose) from sucrose and 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose (N-acetylgalactosamine). *Carbohydrate research* 344, 2573-2576.
- Nwosu, C.C., Aldredge, D.L., Lee, H., Lerno, L.A., Zivkovic, A.M., German, J.B., and Lebrilla, C.B. (2012). Comparison of the human and bovine milk N-glycome via high-performance microfluidic chip liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of proteome research* 11, 2912-2924.
- Ohata, A., Usami, M., and Miyoshi, M. (2005). Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxygenase activation. *Nutrition* 21, 838-847.
- Olaya Galan, N.N., Ulloa Rubiano, J.C., Velez Reyes, F.A., Fernandez Duarte, K.P., Salas Cardenas, S.P., and Gutierrez Fernandez, M.F. (2016). *In vitro* antiviral activity of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium adolescentis* against rotavirus infection monitored by NSP4 protein production. *Journal of applied microbiology* 120, 1041-1051.
- Osanya, A., Song, E.H., Metz, K., Shimak, R.M., Boggiatto, P.M., Huffman, E., Johnson, C., Hostetter, J.M., Pohl, N.L., and Petersen, C.A. (2011). Pathogen-derived oligosaccharides improve innate immune response to intracellular parasite infection. *The American journal of pathology* 179, 1329-1337.
- Otnaess, A.B., Laegreid, A., and Ertresvag, K. (1983). Inhibition of enterotoxin from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* by gangliosides from human milk. *Infection and immunity* 40, 563-569.
- Palomino, M.M., Allievi, M.C., Grundling, A., Sanchez-Rivas, C., and Ruzal, S.M. (2013). Osmotic stress adaptation in *Lactobacillus casei* BL23 leads to structural changes in the cell wall polymer lipoteichoic acid. *Microbiology* 159, 2416-2426.
- Park, J.P., and Yun, J.W. (2001). Utilization of chicory roots for microbial endoinulinase production. *Letters in applied microbiology* 33, 183-187.

- Parkkinen, J., Finne, J., Achtman, M., Vaisanen, V., and Korhonen, T.K. (1983). *Escherichia coli* strains binding neuraminyl alpha 2-3 galactosides. Biochemical and biophysical research communications *111*, 456-461.
- Pérez-Martínez G., Monedero.V.y.Yebra. M. (2008). Sugar catabolism and lactic acid production. Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications. Research Signpost, Kerala, India.
- Peterson, J.A., Patton, S., and Hamosh, M. (1998). Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breast-fed infant against infections. Biology of the neonate *74*, 143-162.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic acids research *30*, e36.
- Phares, C.R., Lynfield, R., Farley, M.M., Mohle-Boetani, J., Harrison, L.H., Petit, S., Craig, A.S., Schaffner, W., Zansky, S.M., Gershman, K., *et al.* (2008). Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *Jama* *299*, 2056-2065.
- Phong, W.Y., Lin, W., Rao, S.P., Dick, T., Alonso, S., and Pethe, K. (2013). Characterization of phosphofructokinase activity in *Mycobacterium tuberculosis* reveals that a functional glycolytic carbon flow is necessary to limit the accumulation of toxic metabolic intermediates under hypoxia. *PloS one* *8*, e56037.
- Pirapatdit, S., Kishino, E., Fujita, K., Hashimoto, H., Mori, S., Saito, S., Sato, T., Watanabe, J., and Sonoyama, K. (2008). Dietary alpha-linked galactooligosaccharide suppresses ovalbumin-induced allergic peritonitis in BALB/c mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* *72*, 1901-1907.
- Plaga, Stiimpfel, and Fiedler (1989). Determination of carbohydrates in fermentation processes by high-performance liquid chromatography *Appt Microbiol Biotechnol.*
- Plante, O.J., Palmacci, E.R., and Seeberger, P.H. (2001). Automated solid-phase synthesis of oligosaccharides. *Science* *291*, 1523-1527.
- Posno, M., Leer, R.J., van Luijk, N., van Giezen, M.J., Heuvelmans, P.T., Lokman, B.C., and Pouwels, P.H. (1991). Incompatibility of *Lactobacillus* Vectors with Replicons Derived from Small Cryptic *Lactobacillus* Plasmids and Segregational Instability of the Introduced Vectors. *Applied and environmental microbiology* *57*, 1822-1828.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., and Gopal, P.K. (1998.). Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int Dairy J.* *6*,325-336
- Prentice, A., MacCarthy, A., Stirling, D.M., Vasquez-Velasquez, L., and Ceesay, S.M. (1989). Breast-milk IgA and lactoferrin survival in the gastrointestinal tract--a study in rural Gambian children. *Acta paediatrica Scandinavica* *78*, 505-512.
- Pridmore, R.D., Berger, B., Desiere, F., Vilanova, D., Barretto, C., Pittet, A.C., Zwahlen, M.C., Rouvet, M., Altermann, E., Barrangou, R., *et al.* (2004). The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 2512-2517.
- Priem, B., Gilbert, M., Wakarchuk, W.W., Heyraud, A., and Samain, E. (2002). A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria. *Glycobiology* *12*, 235-240.
- Pritt, B.S., and Clark, C.G. (2008). Amebiasis. *Mayo Clinic proceedings* *83*, 1154-1159; quiz 1159-1160.

- Quail, M.A., Dempsey, C.E., and Guest, J.R. (1994). Identification of a fatty acyl responsive regulator (FarR) in *Escherichia coli*. *FEBS letters* 356, 183-187.
- Rabinovich, G.A., Rubinstein, N., and Toscano, M.A. (2002). Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochimica et biophysica acta* 1572, 274-284.
- Ragouilliaux, C.J., Keeney, S.E., Hawkins, H.K., and Rowen, J.L. (2007). Maternal factors in extremely low birth weight infants who develop spontaneous intestinal perforation. *Pediatrics* 120, e1458-1464.
- Ragupathi, G., Koide, F., Livingston, P.O., Cho, Y.S., Endo, A., Wan, Q., Spassova, M.K., Keding, S.J., Allen, J., Ouerfelli, O., *et al.* (2006). Preparation and evaluation of unimolecular pentavalent and hexavalent antigenic constructs targeting prostate and breast cancer: a synthetic route to anticancer vaccine candidates. *Journal of the American Chemical Society* 128, 2715-2725.
- Ramakrishnan, B., Boeggeman, E., and Qasba, P.K. (2002). Beta-1,4-galactosyltransferase and lactose synthase: molecular mechanical devices. *Biochemical and biophysical research communications* 291, 1113-1118.
- Ravdin, J.I., and Guerrant, R.L. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *The Journal of clinical investigation* 68, 1305-1313.
- Ray, W.K., and Larson, T.J. (2004). Application of AgaR repressor and dominant repressor variants for verification of a gene cluster involved in N-acetylgalactosamine metabolism in *Escherichia coli* K-12. *Molecular microbiology* 51, 813-826.
- Rigali, S., Derouaux, A., Giannotta, F., and Dusart, J. (2002). Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *The Journal of biological chemistry* 277, 12507-12515.
- Rijnierse, A., Jeurink, P.V., van Esch, B.C., Garssen, J., and Knippels, L.M. (2011). Food-derived oligosaccharides exhibit pharmaceutical properties. *European journal of pharmacology* 668 Suppl 1, S117-123.
- Rinne, M.M., Gueimonde, M., Kalliomaki, M., Hoppu, U., Salminen, S.J., and Isolauri, E. (2005). Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS immunology and medical microbiology* 43, 59-65.
- Roberfroid, M. (2007a). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of nutrition* 137, 830S-837S.
- Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., *et al.* (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *The British journal of nutrition* 104 Suppl 2, S1-63.
- Roberfroid, M.B. (2005). Introducing inulin-type fructans. *The British journal of nutrition* 93 Suppl 1, S13-25.
- Roberfroid, M.B. (2007b). Inulin-type fructans: functional food ingredients. *The Journal of nutrition* 137, 2493S-2502S.
- Robles Alonso, V., and Guarner, F. (2013). Linking the gut microbiota to human health. *The British journal of nutrition* 109 Suppl 2, S21-26.
- Rochat, T., Bermudez-Humaran, L., Gratadoux, J.J., Fourage, C., Hoebler, C., Corthier, G., and Langella, P. (2007). Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microbial cell factories* 6, 22.
- Rodriguez-Diaz, J., Carbajo, R.J., Pineda-Lucena, A., Monedero, V., and Yebra, M.J. (2013). Synthesis of fucosyl-N-acetylglucosamine disaccharides by

- transfucosylation using alpha-L-fucosidases from *Lactobacillus casei*. Applied and environmental microbiology 79, 3847-3850.
- Rodriguez-Diaz, J., Monedero, V., and Yebra, M.J. (2011). Utilization of natural fucosylated oligosaccharides by three novel alpha-L-fucosidases from a probiotic *Lactobacillus casei* strain. Applied and environmental microbiology 77, 703-705.
- Rodriguez-Diaz, J., Rubio-del-Campo, A., and Yebra, M.J. (2012a). *Lactobacillus casei* ferments the N-Acetylglucosamine moiety of fucosyl-alpha-1,3-N-acetylglucosamine and excretes L-fucose. Applied and environmental microbiology 78, 4613-4619.
- Rodriguez-Diaz, J., Rubio-Del-Campo, A., and Yebra, M.J. (2012b). Regulatory insights into the production of UDP-N-acetylglucosamine by *Lactobacillus casei*. Bioengineered 3, 339-342.
- Rosen, S.D. (1999). Endothelial ligands for L-selectin: from lymphocyte recirculation to allograft rejection. The American journal of pathology 155, 1013-1020.
- Routenberg Love, K., and Seeberger, P.H. (2004). Automated solid-phase synthesis of protected tumor-associated antigen and blood group determinant oligosaccharides. Angewandte Chemie 43, 602-605.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Fernandez-Garcia, M., de los Reyes-Gavilan, C.G., and Margolles, A. (2008). Mucin degradation by *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. Applied and environmental microbiology 74, 1936-1940.
- Rudd, P.M., Joao, H.C., Coghill, E., Fiten, P., Saunders, M.R., Opdenakker, G., and Dwek, R.A. (1994). Glycoforms modify the dynamic stability and functional activity of an enzyme. Biochemistry 33, 17-22.
- Rudloff, S., Obermeier, S., Borsch, C., Pohlentz, G., Hartmann, R., Brosicke, H., Lentze, M.J., and Kunz, C. (2006). Incorporation of orally applied (13)C-galactose into milk lactose and oligosaccharides. Glycobiology 16, 477-487.
- Rudloff, S., Pohlentz, G., Borsch, C., Lentze, M.J., and Kunz, C. (2012). Urinary excretion of *in vivo* (1)(3)C-labelled milk oligosaccharides in breastfed infants. The British journal of nutrition 107, 957-963.
- Rudloff, S., Pohlentz, G., Diekmann, L., Egge, H., and Kunz, C. (1996). Urinary excretion of lactose and oligosaccharides in preterm infants fed human milk or infant formula. Acta paediatrica 85, 598-603.
- Ruiz-Palacios, G.M., Cervantes, L.E., Ramos, P., Chavez-Munguia, B., and Newburg, D.S. (2003). *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. The Journal of biological chemistry 278, 14112-14120.
- Rye, C.S.W., S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. Curr. Opin.. Chem. Biol. 4,573-580. .
- Saavedra, J.M. (2001). Clinical applications of probiotic agents. The American journal of clinical nutrition 73, 1147S-1151S.
- Sabharwal, H., Nilsson, B., Chester, M.A., Lindh, F., Gronberg, G., Sjoblad, S., and Lundblad, A. (1988a). Oligosaccharides from faeces of a blood-group B, breast-fed infant. Carbohydrate research 178, 145-154.
- Sabharwal, H., Nilsson, B., Chester, M.A., Sjoblad, S., and Lundblad, A. (1984). Blood group specific oligosaccharides from faeces of a blood group A breast-fed infant. Molecular immunology 21, 1105-1112.
- Sabharwal, H., Nilsson, B., Gronberg, G., Chester, M.A., Dakour, J., Sjoblad, S., and Lundblad, A. (1988b). Oligosaccharides from feces of preterm infants fed on breast milk. Archives of biochemistry and biophysics 265, 390-406.

- Sabharwal, H., Sjoblad, S., and Lundblad, A. (1991). Sialylated oligosaccharides in human milk and feces of preterm, full-term, and weaning infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* *12*, 480-484.
- Saegusa, J., Hsu, D.K., Chen, H.Y., Yu, L., Fermin, A., Fung, M.A., and Liu, F.T. (2009). Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis. *The American journal of pathology* *174*, 922-931.
- Saffer, L.D., and Petri, W.A., Jr. (1991a). *Entamoeba histolytica*: recognition of alpha- and beta-galactose by the 260-kDa adherence lectin. *Experimental parasitology* *72*, 106-108.
- Saffer, L.D., and Petri, W.A., Jr. (1991b). Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. *Infection and immunity* *59*, 4681-4683.
- Saito, T., Itoh, T., and Adachi, S. (1984). Presence of two neutral disaccharides containing N-acetylhexosamine in bovine colostrum as free forms. *Biochimica et biophysica acta* *801*, 147-150.
- Saito, T., Itoh, T., Adachi, S., Suzuki, T., and Usui, T. (1981). The chemical structure of neutral and acidic sugar chains obtained from bovine colostrum kappa-casein. *Biochimica et biophysica acta* *678*, 257-267.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and ., T.M. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sambrook, J., and Russell., D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. . Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.
- Sanders, M.E., Guarner, F., Guerrant, R., Holt, P.R., Quigley, E.M., Sartor, R.B., Sherman, P.M., and Mayer, E.A. (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut* *62*, 787-796.
- Sandoval, M.C.s., A.; Civera, C.; Treviño, J.; Ferreras, E.; and Vaultier, M.B., J.; Lozano, P.; Hernáiz, M. J. (2012). Efficient and selective enzymatic synthesis of N-acetyl-lactosamine in ionic liquid: a rational explanation. *RSC Adv.* *2*, 6306-6314.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *74*, 5463-5467.
- Sano, H., Hsu, D.K., Yu, L., Apgar, J.R., Kuwabara, I., Yamanaka, T., Hirashima, M., and Liu, F.T. (2000). Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *Journal of immunology* *165*, 2156-2164.
- Sarmiento-Rubiano, L.A., Zuniga, M., Perez-Martinez, G., and Yebra, M.J. (2007). Dietary supplementation with sorbitol results in selective enrichment of lactobacilli in rat intestine. *Research in microbiology* *158*, 694-701.
- Sato, Y., Yamamoto, Y., Kizaki, H., and Kuramitsu, H.K. (1993). Isolation and sequence analysis of the pmi gene encoding phosphomannose isomerase of *Streptococcus mutans*. *FEMS microbiology letters* *114*, 61-66.
- Satoh, T., Odamaki, T., Namura, M., Shimizu, T., Iwatsuki, K., Nishimoto, M., Kitaoka, M., and Xiao, J.Z. (2013). *In vitro* comparative evaluation of the impact of lacto-N-biose I, a major building block of human milk oligosaccharides, on the fecal microbiota of infants. *Anaerobe* *19*, 50-57.
- Schanler, R.J., Lau, C., Hurst, N.M., and Smith, E.O. (2005). Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants. *Pediatrics* *116*, 400-406.

- Schiffrin, E.J., Rochat, F., Link-Amster, H., Aeschlimann, J.M., and Donnet-Hughes, A. (1995). Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *Journal of dairy science* 78, 491-497.
- Schmaltz, R.M., Hanson, S.R., and Wong, C.H. (2011). Enzymes in the synthesis of glycoconjugates. *Chemical reviews* 111, 4259-4307.
- Schnaar, R.L., Suzuki, A., and Stanley, P. (2009). Glycosphingolipids. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY)).
- Schock, F., and Dahl, M.K. (1996). Expression of the *tre* operon of *Bacillus subtilis* 168 is regulated by the repressor TreR. *Journal of bacteriology* 178, 4576-4581.
- Schramm, M., Klybas, V., and Racker, E. (1958). Phosphorolytic cleavage of fructose-6-phosphate by fructose-6-phosphate phosphoketolase from *Acetobacter xylinum*. *The Journal of biological chemistry* 233, 1283-1288.
- Schultz, M., Veltkamp, C., Dieleman, L.A., Grenther, W.B., Wyrick, P.B., Tonkonogy, S.L., and Sartor, R.B. (2002). *Lactobacillus plantarum* 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflammatory bowel diseases* 8, 71-80.
- Seeberger, P.H., and Werz, D.B. (2005). Automated synthesis of oligosaccharides as a basis for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* 4, 751-763.
- Seifert, S., and Watzl, B. (2007). Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation. *The Journal of nutrition* 137, 2563S-2567S.
- Sela, D.A. (2011). Bifidobacterial utilization of human milk oligosaccharides. *International journal of food microbiology* 149, 58-64.
- Sela, D.A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J.H., Chen, F., Whitehead, T.R., Lapidus, A., Rokhsar, D.S., Lebrilla, C.B., German, J.B., *et al.* (2008). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 18964-18969.
- Sela, D.A., Garrido, D., Lerno, L., Wu, S., Tan, K., Eom, H.J., Joachimiak, A., Lebrilla, C.B., and Mills, D.A. (2012). *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 alpha-fucosidases are active on fucosylated human milk oligosaccharides. *Applied and environmental microbiology* 78, 795-803.
- Senba, M., Kashige, N., Nakashima, Y., Miake, F., and Watanabe, K. (2000). Cloning of the gene of beta-N-acetylglucosaminidase from *Lactobacillus casei* ATCC 27092 and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Biological & pharmaceutical bulletin* 23, 527-531.
- Sezonov, G., Possoz, C., Friedmann, A., Pernodet, J.L., and Guerineau, M. (2000). KorSA from the *Streptomyces* integrative element pSAM2 is a central transcriptional repressor: target genes and binding sites. *Journal of bacteriology* 182, 1243-1250.
- Shida, K., Sato, T., Iizuka, R., Hoshi, R., Watanabe, O., Igarashi, T., Miyazaki, K., Nanno, M., and Ishikawa, F. (2015). Daily intake of fermented milk with *Lactobacillus casei* strain Shirota reduces the incidence and duration of upper respiratory tract infections in healthy middle-aged office workers. *European journal of nutrition*. DOI 10.1007/s00394-015-1056-1
- Shimizu-Kadota, M. (1988). Cloning and expression of the phospho-beta-galactosidase genes on the lactose plasmid and the chromosome of *Lactobacillus casei* C257 in *Escherichia coli*. *Biochimie* 70, 523-529.

- Simanek, E.E., McGarvey, G.J., Jablonowski, J.A., and Wong, C.H. (1998). Selectinminus signCarbohydrate Interactions: From Natural Ligands to Designed Mimics. *Chemical reviews* 98, 833-862.
- Simon, P.M., Goode, P.L., Mobasser, A., and Zopf, D. (1997). Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infection and immunity* 65, 750-757.
- Sisk, P.M., Lovelady, C.A., Dillard, R.G., Gruber, K.J., and O'Shea, T.M. (2007). Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Perinatol* 27, 428-433.
- Slovin, S.F., Ragupathi, G., Fernandez, C., Diani, M., Jefferson, M.P., Wilton, A., Kelly, W.K., Morris, M., Solit, D., Clausen, H., *et al.* (2007). A polyvalent vaccine for high-risk prostate patients: "are more antigens better?". *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 56, 1921-1930.
- Slovin, S.F., Ragupathi, G., Musselli, C., Fernandez, C., Diani, M., Verbel, D., Danishefsky, S., Livingston, P., and Scher, H.I. (2005). Thomsen-Friedenreich (TF) antigen as a target for prostate cancer vaccine: clinical trial results with TF cluster (c)-KLH plus QS21 conjugate vaccine in patients with biochemically relapsed prostate cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 54, 694-702.
- Slovin, S.F., Ragupathi, G., Musselli, C., Olkiewicz, K., Verbel, D., Kuduk, S.D., Schwarz, J.B., Sames, D., Danishefsky, S., Livingston, P.O., *et al.* (2003). Fully synthetic carbohydrate-based vaccines in biochemically relapsed prostate cancer: clinical trial results with alpha-N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine conjugate vaccine. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21, 4292-4298.
- Smith, H., Parsons, N.J., and Cole, J.A. (1995). Sialylation of neisserial lipopolysaccharide: a major influence on pathogenicity. *Microbial pathogenesis* 19, 365-377.
- Sonoyama, K., Watanabe, H., Watanabe, J., Yamaguchi, N., Yamashita, A., Hashimoto, H., Kishino, E., Fujita, K., Okada, M., Mori, S., *et al.* (2005). Allergic airway eosinophilia is suppressed in ovalbumin-sensitized Brown Norway rats fed raffinose and alpha-linked galactooligosaccharide. *The Journal of nutrition* 135, 538-543.
- Stahl, B., Thurl, S., Henker, J., Siegel, M., Finke, B., and Sawatzki, G. (2001). Detection of four human milk groups with respect to Lewis-blood-group-dependent oligosaccharides by serologic and chromatographic analysis. *Advances in experimental medicine and biology* 501, 299-306.
- Stanley, P., Schachter, H., and Taniguchi, N. (2009). N-Glycans. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY)).
- Stromberg, N., Ryd, M., Lindberg, A.A., and Karlsson, K.A. (1988). Studies on the binding of bacteria to glycolipids. Two species of *Propionibacterium* apparently recognize separate epitopes on lactose of lactosylceramide. *FEBS letters* 232, 193-198.
- Su, S.V., Gurney, K.B., and Lee, B. (2003). Sugar and spice: viral envelope-DC-SIGN interactions in HIV pathogenesis. *Current HIV research* 1, 87-99.
- Sun, Z., Harris, H.M., McCann, A., Guo, C., Argimon, S., Zhang, W., Yang, X., Jeffery, I.B., Cooney, J.C., Kagawa, T.F., *et al.* (2015). Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nature communications* 6, 8322.

- Svennerholm, L., Bostrom, K., Fredman, P., Mansson, J.E., Rosengren, B., and Rynmark, B.M. (1989). Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age. *Biochimica et biophysica acta* 1005, 109-117.
- Swiatek, M.A., Urem, M., Tenconi, E., Rigali, S., and van Wezel, G.P. (2012). Engineering of N-acetylglucosamine metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and an unsuspected role of NagA in glucosamine metabolism. *Bioengineered* 3, 280-285.
- Takada, A., Ohmori, K., Yoneda, T., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A., Kiso, M., and Kannagi, R. (1993). Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer research* 53, 354-361.
- Takada, M., Nishida, K., Kataoka-Kato, A., Gondo, Y., Ishikawa, H., Suda, K., Kawai, M., Hoshi, R., Watanabe, O., Igarashi, T., *et al.* (2016). Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota relieves stress-associated symptoms by modulating the gut-brain interaction in human and animal models. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. DOI 10.1111/nmo.12804
- Takamura, T.C., T.; Ishihara, H.; Tejima, S (1980). Chemical Modification of Lactose. XIII. Synthesis of Lacto-N-tetraose. . *Chem. Pharm. Bull.* 28, 1804-1809.
- Tallon, R., Bressollier, P., and Urdaci, M.C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in microbiology* 154, 705-712.
- Tanaka, Y., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. (2011). Translation efficiency of antiterminator proteins is a determinant for the difference in glucose repression of two beta-glucoside phosphotransferase system gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* R. *Journal of bacteriology* 193, 349-357.
- Tao, N., Ochonicky, K.L., German, J.B., Donovan, S.M., and Lebrilla, C.B. (2010). Structural determination and daily variations of porcine milk oligosaccharides. *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 4653-4659.
- Tate, J.E., Burton, A.H., Boschi-Pinto, C., Steele, A.D., Duque, J., Parashar, U.D., and Network, W.H.-c.G.R.S. (2012). 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases* 12, 136-141.
- Terrazas, L.I., Walsh, K.L., Piskorska, D., McGuire, E., and Harn, D.A., Jr. (2001). The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *Journal of immunology* 167, 5294-5303.
- Thijssen, A.Y., Clemens, C.H., Vankerckhoven, V., Goossens, H., Jonkers, D.M., and Masclee, A.A. (2016). Efficacy of *Lactobacillus casei* Shirota for patients with irritable bowel syndrome. *European journal of gastroenterology & hepatology* 28, 8-14.
- Thomas, R., and Brooks, T. (2004a). Common oligosaccharide moieties inhibit the adherence of typical and atypical respiratory pathogens. *Journal of medical microbiology* 53, 833-840.
- Thomas, R., and Brooks, T. (2006). Attachment of *Yersinia pestis* to human respiratory cell lines is inhibited by certain oligosaccharides. *Journal of medical microbiology* 55, 309-315.

- Thomas, R.J., and Brooks, T.J. (2004b). Oligosaccharide receptor mimics inhibit *Legionella pneumophila* attachment to human respiratory epithelial cells. *Microbial pathogenesis* 36, 83-92.
- Thurl, S., Munzert, M., Henker, J., Boehm, G., Muller-Werner, B., Jelinek, J., and Stahl, B. (2010). Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *The British journal of nutrition* 104, 1261-1271.
- Tian, F., Inthanavong, L., and Karboune, S. (2011). Purification and characterization of levansucrases from *Bacillus amyloliquefaciens* in intra- and extracellular forms useful for the synthesis of levan and fructooligosaccharides. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 75, 1929-1938.
- Tissier, H. (1907). Traitement des infections intestinales par la méthode de transformation de la flore bactérienne de l'intestin. *Comptes rendus de la société de Biologie* 1906 ; 60 : 359-61.
- Trincone, A. (2015). Uncommon Glycosidases for the Enzymatic Preparation of Glycosides. *Biomolecules* 5, 2160-2183.
- Tsai, T.I., Lee, H.Y., Chang, S.H., Wang, C.H., Tu, Y.C., Lin, Y.C., Hwang, D.R., Wu, C.Y., and Wong, C.H. (2013). Effective sugar nucleotide regeneration for the large-scale enzymatic synthesis of Globo H and SSEA4. *Journal of the American Chemical Society* 135, 14831-14839.
- Tsuchida, A., Okajima, T., Furukawa, K., Ando, T., Ishida, H., Yoshida, A., Nakamura, Y., Kannagi, R., Kiso, M., and Furukawa, K. (2003). Synthesis of disialyl Lewis x (Le^x) structure in colon cancer cell lines by a sialyltransferase, ST6GalNAc VI, responsible for the synthesis of alpha-series gangliosides. *The Journal of biological chemistry* 278, 22787-22794.
- Turrone, F., Ventura, M., Butto, L.F., Duranti, S., O'Toole, P.W., Motherway, M.O., and van Sinderen, D. (2014). Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71, 183-203.
- Tursi, A., Brandimarte, G., Papa, A., Giglio, A., Elisei, W., Giorgetti, G.M., Forti, G., Morini, S., Hassan, C., Pistoia, M.A., *et al.* (2010). Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *The American journal of gastroenterology* 105, 2218-2227.
- Uauy, R.D., Fanaroff, A.A., Korones, S.B., Phillips, E.A., Phillips, J.B., and Wright, L.L. (1991). Necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants: biodemographic and clinical correlates. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr* 119, 630-638.
- Uehara, T., and Park, J.T. (2004). The N-acetyl-D-glucosamine kinase of *Escherichia coli* and its role in murein recycling. *Journal of bacteriology* 186, 7273-7279.
- Urashima, T., Asakuma, S., Leo, F., Fukuda, K., Messer, M., and Oftedal, O.T. (2012). The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk. *Advances in nutrition* 3, 473S-482S.
- Urashima, T., Saito, T., Ohmisya, K., and Shimazaki, K. (1991). Structural determination of three neutral oligosaccharides in bovine (Holstein-Friesian) colostrum, including the novel trisaccharide; GalNAc alpha 1-3Gal beta 1-4Glc. *Biochimica et biophysica acta* 1073, 225-229.
- Urashima, T., Taufik, E., Fukuda, K., and Asakuma, S. (2013). Recent advances in studies on milk oligosaccharides of cows and other domestic farm animals. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77, 455-466.

- van Berkel, P.H., Geerts, M.E., van Veen, H.A., Kooiman, P.M., Pieper, F.R., de Boer, H.A., and Nuijens, J.H. (1995). Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins both bind iron and show identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibilities towards tryptic proteolysis. *The Biochemical journal* 312 (Pt 1), 107-114.
- van Hoffen, E., Korthagen, N.M., de Kivit, S., Schouten, B., Bardoel, B., Duivelshof, A., Knol, J., Garssen, J., and Willemsen, L.E. (2010). Exposure of intestinal epithelial cells to UV-killed *Lactobacillus* GG but not *Bifidobacterium* breve enhances the effector immune response *in vitro*. *International archives of allergy and immunology* 152, 159-168.
- van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nature reviews. Immunology* 3, 697-709.
- van Liempt, E., Bank, C.M., Mehta, P., Garcia-Vallejo, J.J., Kwar, Z.S., Geyer, R., Alvarez, R.A., Cummings, R.D., Kooyk, Y., and van Die, I. (2006). Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. *FEBS letters* 580, 6123-6131.
- van Rantwijk, F.W.-v.O., M.; Sheldon, R. A. (1999). Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* .
- van Rooijen, R.J., Dechering, K.J., Niek, C., Wilmink, J., and de Vos, W.M. (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. *Protein engineering* 6, 201-206.
- Variyam, E.P., and Hoskins, L.C. (1981). Mucin degradation in human colon ecosystems. Degradation of hog gastric mucin by fecal extracts and fecal cultures. *Gastroenterology* 81, 751-758.
- Vasquez, A., Molin, G., Pettersson, B., Antonsson, M., and Ahrne, S. (2005). DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. *Systematic and applied microbiology* 28, 430-441.
- Ventura, M., Canchaya, C., Pridmore, D., Berger, B., and Brussow, H. (2003). Integration and distribution of *Lactobacillus johnsonii* prophages. *Journal of bacteriology* 185, 4603-4608.
- Vetere, A., Miletich, M., Bosco, M., and Paoletti, S. (2000). Regiospecific glycosidase-assisted synthesis of lacto-N-biose I (Galbeta1-3GlcNAc) and 3'-sialyl-lacto-N-biose I (NeuAalpha2-3Galbeta1-3GlcNAc). *European journal of biochemistry / FEBS* 267, 942-949.
- Veyrat, A., Monedero, V., and Perez-Martinez, G. (1994). Glucose transport by the phosphoenolpyruvate:mannose phosphotransferase system in *Lactobacillus casei* ATCC 393 and its role in carbon catabolite repression. *Microbiology* 140 (Pt 5), 1141-1149.
- Viana, R., Monedero, V., Dossonnet, V., Vadeboncoeur, C., Perez-Martinez, G., and Deutscher, J. (2000). Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Molecular microbiology* 36, 570-584.
- von Schillde, M.A., Hormannsperger, G., Weiher, M., Alpert, C.A., Hahne, H., Bauerl, C., van Huynegem, K., Steidler, L., Hrcir, T., Perez-Martinez, G., *et al.* (2012). Lactocepin secreted by *Lactobacillus* exerts anti-inflammatory effects by selectively degrading proinflammatory chemokines. *Cell host & microbe* 11, 387-396.

- Wada, J., Ando, T., Kiyohara, M., Ashida, H., Kitaoka, M., Yamaguchi, M., Kumagai, H., Katayama, T., and Yamamoto, K. (2008). *Bifidobacterium bifidum* lacto-N-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Applied and environmental microbiology* 74, 3996-4004.
- Wang, B. (2009). Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annual review of nutrition* 29, 177-222.
- Wang, B., Brand-Miller, J., McVeagh, P., and Petocz, P. (2001). Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *The American journal of clinical nutrition* 74, 510-515.
- Wang, B., Yu, B., Karim, M., Hu, H., Sun, Y., McGreevy, P., Petocz, P., Held, S., and Brand-Miller, J. (2007a). Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets. *The American journal of clinical nutrition* 85, 561-569.
- Wang, M., Li, M., Wu, S., Lebrilla, C.B., Chapkin, R.S., Ivanov, I., and Donovan, S.M. (2015). Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 60, 825-833.
- Wang, Q., Zhang, J., and Guo, Z. (2007b). Efficient glycoengineering of GM3 on melanoma cell and monoclonal antibody-mediated selective killing of the glycoengineered cancer cell. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 7561-7567.
- Watterlot, L., Rochat, T., Sokol, H., Cherbuy, C., Bouloufa, I., Lefevre, F., Gratadoux, J.J., Honvo-Hueto, E., Chilmonczyk, S., Blugeon, S., *et al.* (2010). Intra-gastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice. *International journal of food microbiology* 144, 35-41.
- Wilstermann, M., and Magnusson, G. (1995). Synthesis of disaccharide glycosyl donors suitable for introduction of the beta-D-Gal p-(1-->3)-alpha-and-beta-D-Gal pNac groups. *Carbohydrate research* 272, 1-7.
- Witt, E., Frank, R., and Hengstenberg, W. (1993). 6-Phospho-beta-galactosidases of gram-positive and 6-phospho-beta-glucosidase B of gram-negative bacteria: comparison of structure and function by kinetic and immunological methods and mutagenesis of the lacG gene of *Staphylococcus aureus*. *Protein engineering* 6, 913-920.
- Witz, I.P. (2006). The involvement of selectins and their ligands in tumor-progression. *Immunology letters* 104, 89-93.
- Wright, D.P., Rosendale, D.I., and Robertson, A.M. (2000). Prevotella enzymes involved in mucin oligosaccharide degradation and evidence for a small operon of genes expressed during growth on mucin. *FEMS microbiology letters* 190, 73-79.
- Wu, B.B., Yang, Y., Xu, X., and Wang, W.P. (2016). Effects of *Bifidobacterium* supplementation on intestinal microbiota composition and the immune response in healthy infants. *World journal of pediatrics : WJP* 12, 177-182.
- Wu, L., and KewalRamani, V.N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature reviews. Immunology* 6, 859-868.
- Xiao, J.Z., Takahashi, S., Nishimoto, M., Odamaki, T., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., and Kitaoka, M. (2010). Distribution of *in vitro* fermentation ability of lacto-N-biose I, a major building block of human milk oligosaccharides, in bifidobacterial strains. *Applied and environmental microbiology* 76, 54-59.
- Yamamoto, K., Miwa, T., Taniguchi, H., Nagano, T., Shimamura, K., Tanaka, T., and Kumagai, H. (1996). Binding specificity of *Lactobacillus* to glycolipids. *Biochemical and biophysical research communications* 228, 148-152.

- Yang, J.M., Byrd, J.C., Siddiki, B.B., Chung, Y.S., Okuno, M., Sowa, M., Kim, Y.S., Matta, K.L., and Brockhausen, I. (1994). Alterations of O-glycan biosynthesis in human colon cancer tissues. *Glycobiology* 4, 873-884.
- Yeom, S.J., Ji, J.H., Kim, N.H., Park, C.S., and Oh, D.K. (2009). Substrate specificity of a mannose-6-phosphate isomerase from *Bacillus subtilis* and its application in the production of L-ribose. *Applied and environmental microbiology* 75, 4705-4710.
- Yi, W., Perali, R.S., Eguchi, H., Motari, E., Woodward, R., and Wang, P.G. (2008). Characterization of a bacterial beta-1,3-galactosyltransferase with application in the synthesis of tumor-associated T-antigen mimics. *Biochemistry* 47, 1241-1248.
- Yoon, J.H.R., J. S. (2000). The efficient enzymatic synthesis of N-acetyllactosamine in an organic co-solvent. *Carbohydr. Res.* 327, 377-383.
- Yoshida, E., Sakurama, H., Kiyohara, M., Nakajima, M., Kitaoka, M., Ashida, H., Hirose, J., Katayama, T., Yamamoto, K., and Kumagai, H. (2012). *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* uses two different beta-galactosidases for selectively degrading type-1 and type-2 human milk oligosaccharides. *Glycobiology* 22, 361-368.
- Yoshida, H., Fuwa, T.J., Arima, M., Hamamoto, H., Sasaki, N., Ichimiya, T., Osawa, K., Ueda, R., and Nishihara, S. (2008). Identification of the *Drosophila* core 1 beta1,3-galactosyltransferase gene that synthesizes T antigen in the embryonic central nervous system and hemocytes. *Glycobiology* 18, 1094-1104.
- Yu (2007). The oncofetal Thomsen–Friedenreich carbohydrate antigen in cancer progression. *Glycoconjugate journal*, 411-420.
- Yu, H., Lau, K., Li, Y., Sugiarto, G., and Chen, X. (2012). One-pot multienzyme synthesis of Lewis x and sialyl Lewis x antigens. *Current protocols in chemical biology* 4, 233-247.
- Yu, H., Lau, K., Thon, V., Autran, C.A., Jantscher-Krenn, E., Xue, M., Li, Y., Sugiarto, G., Qu, J., Mu, S., *et al.* (2014). Synthetic disialyl hexasaccharides protect neonatal rats from necrotizing enterocolitis. *Angewandte Chemie* 53, 6687-6691.
- Yu, H., Thon, V., Lau, K., Cai, L., Chen, Y., Mu, S., Li, Y., Wang, P.G., and Chen, X. (2010). Highly efficient chemoenzymatic synthesis of beta1-3-linked galactosides. *Chemical communications* 46, 7507-7509.
- Yu, Z.T., Chen, C., Kling, D.E., Liu, B., McCoy, J.M., Merighi, M., Heidtman, M., and Newburg, D.S. (2013). The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology* 23, 169-177.
- Zeuner, B., Jers, C., Mikkelsen, J.D., and Meyer, A.S. (2014). Methods for improving enzymatic trans-glycosylation for synthesis of human milk oligosaccharide biomimetics. *Journal of agricultural and food chemistry* 62, 9615-9631.
- Zhang, Y.-M.E., J.; Mallet, J.-M.; Sinaÿ, P. (1999). Synthesis of the β -Methyl Glycoside of Lacto-N-fucopentaose III. *J. Carbohydr. Chem.* 18, 419-427.
- Zhang, Z.G., Ye, Z.Q., Yu, L., and Shi, P. (2011). Phylogenomic reconstruction of lactic acid bacteria: an update. *BMC evolutionary biology* 11, 1.
- Zhu, F.G., Kandimalla, E.R., Yu, D., and Agrawal, S. (2007). Oral administration of a synthetic agonist of Toll-like receptor 9 potently modulates peanut-induced allergy in mice. *The Journal of allergy and clinical immunology* 120, 631-637.
- Zhu, X., Borchers, C., Bienstock, R.J., and Tomer, K.B. (2000). Mass spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells. *Biochemistry* 39, 11194-11204.

- Zhuo, Y., and Bellis, S.L. (2011). Emerging role of alpha2,6-sialic acid as a negative regulator of galectin binding and function. *The Journal of biological chemistry* 286, 5935-5941.
- Zivkovic, A.M., German, J.B., Lebrilla, C.B., and Mills, D.A. (2011). Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 *Suppl 1*, 4653-4658.
- Zuberi, R.I., Hsu, D.K., Kalayci, O., Chen, H.Y., Sheldon, H.K., Yu, L., Apgar, J.R., Kawakami, T., Lilly, C.M., and Liu, F.T. (2004). Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *The American journal of pathology* 165, 2045-2053.

Anexo 1



8.1. Cristalización de la fosfo- β -galactosidasa GnbG y determinación de la estructura tridimensional por difracción de rayos X.

El análisis de la estructura tridimensional de la GnbG silvestre mostró que los monómeros (Fig. 8.1) de la enzima se organizaban en tetrámeros (Fig. 8.2). Estos tetrámeros se originan por la interacción débil de dos dímeros, formándose de este modo un dímero de dímeros. En la formación de los dímeros de dímeros juega un papel relevante la proyección de los tres residuos carboxi terminales de ácido glutámico de cada monómero, que se insertan en el centro catalítico de un monómero del segundo dímero.

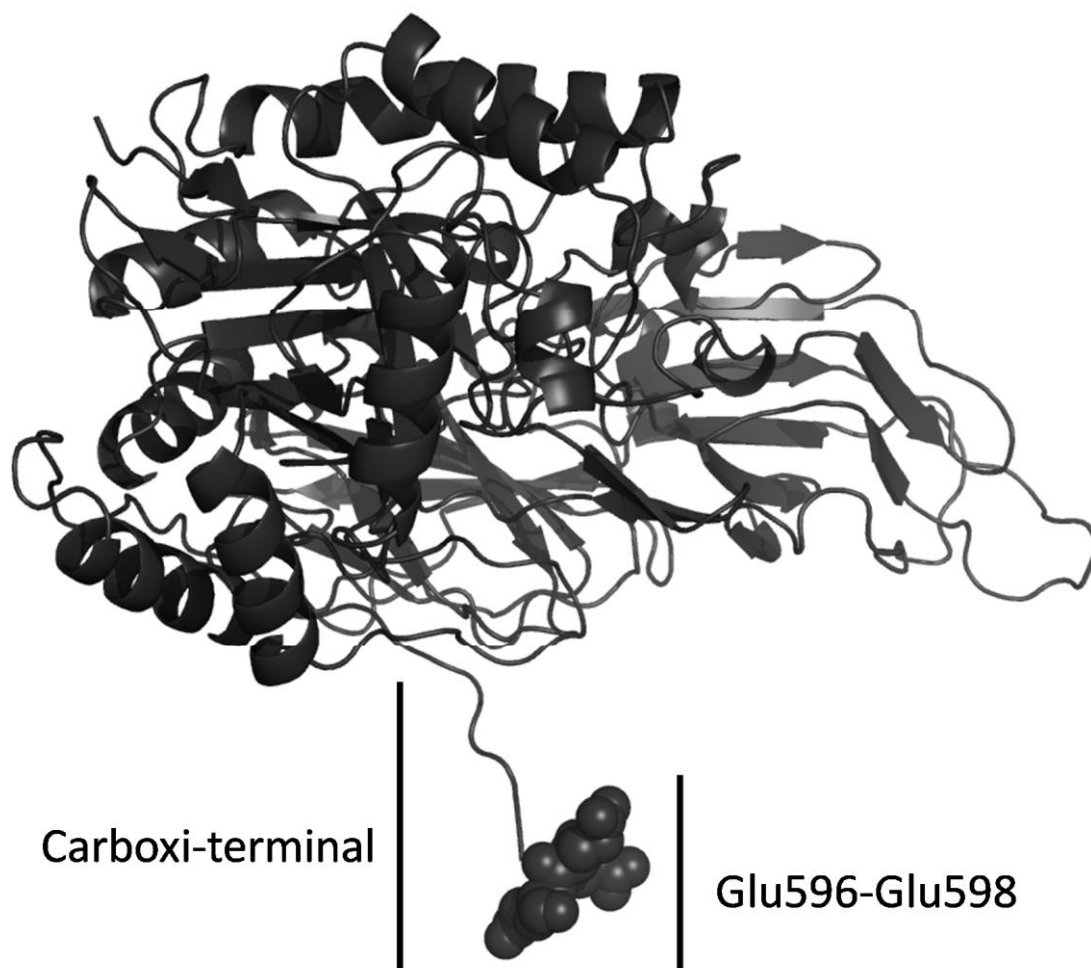


Fig. 8.1. Estructura tridimensional de la enzima fosfo- β -galactosidasa silvestre (GnbG) determinada por difracción de rayos X. En la figura se muestra un monómero de la enzima representado de forma esquemática con los tres residuos de glutámico del extremo en representación de esferas de Van der Waals. La extensión carboxi-terminal y los tres aminoácidos terminales se indican en la figura.

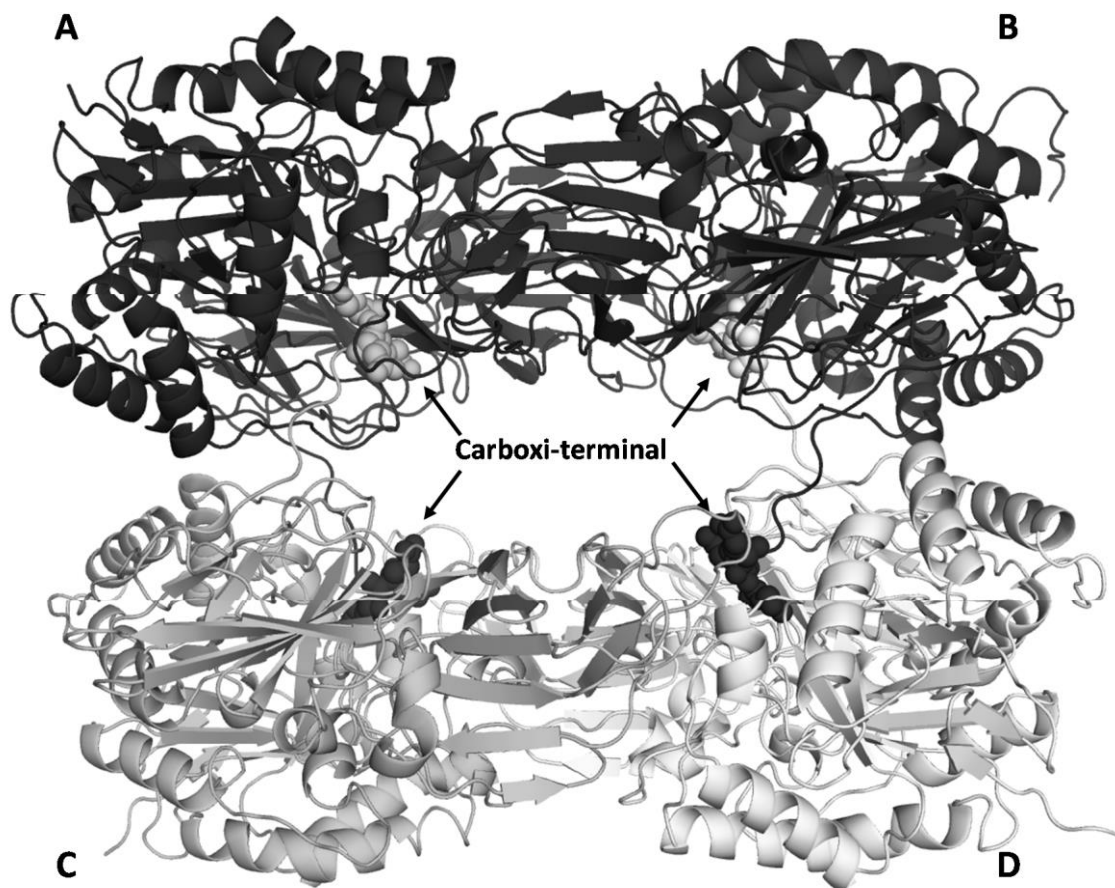


Fig. 8.2. Estructura tridimensional de la enzima fosfo- β -galactosidasa silvestre (GnbG) determinada por difracción de rayos X. El tetrámero se genera por la interacción de dos dímeros, uno de ellos en gris oscuro (subunidades A y B) y otro en gris claro (subunidades C y D), interviniendo los extremos carboxi terminal, mostrados en esferas de Van der Waals, en el proceso de tetramerización.

8.2. Cristalización de la fosfo- β -galactosidasa mutante GnbGMutEnd y determinación de la estructura tridimensional por difracción de rayos X.

La enzima mutante GnbGMutEnd, que tiene delecionados los tres residuos carboxi terminales de ácido glutámico (Glu596, Glu597 y Glu598), se cristalizó y se determinó su estructura por difracción de Rayos X. El análisis de la estructura tridimensional de GnbG mutante (GnbGMutEnd) mostró una organización cuaternaria en forma de dímeros (Fig. 8.3).



Fig. 8.3. Estructura tridimensional de la enzima fosfo- β -galactosidasa mutante (GnbGMutEnd) determinada por difracción de rayos X. La proteína mutante presenta una organización cuaternaria dimérica, con un monómero en gris claro y otro en gris oscuro, que se muestran en la figura representados de forma esquemática.

Anexo 2



A unique gene cluster for the utilization of the mucosal and human milk-associated glycans galacto-*N*-biose and lacto-*N*-biose in *Lactobacillus casei*

Gonzalo N. Bidart,^{1,2} Jesús Rodríguez-Díaz,¹
Vicente Monedero¹ and María J. Yebra^{1*}

¹Laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos,
Departamento de Biotecnología de Alimentos,
IATA-CSIC, Valencia, Spain.

²Instituto de Investigaciones Biotecnológicas 'Dr.
Rodolfo A. Ugalde', Universidad Nacional de San
Martín, Buenos Aires, Argentina.

Summary

The probiotic *Lactobacillus casei* catabolizes galacto-*N*-biose (GNB) and lacto-*N*-biose (LNB) by using a transport system and metabolic routes different from those of *Bifidobacterium*. *L. casei* contains a gene cluster, *gnbREFGBCDA*, involved in the metabolism of GNB, LNB and also *N*-acetylgalactosamine. Inactivation of *gnbC* (EIIC) or *ptsI* (Enzyme I) of the phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system (PTS) prevented the growth on those three carbohydrates, indicating that they are transported and phosphorylated by the same PTS^{Gnb}. Enzyme activities and growth analysis with knockout mutants showed that GnbG (phospho-β-galactosidase) hydrolyses both disaccharides. However, GnbF (*N*-acetylgalactosamine-6P deacetylase) and GnbE (galactosamine-6P isomerase/deaminase) are involved in GNB but not in LNB fermentation. The utilization of LNB depends on *nagA* (*N*-acetylglucosamine-6P deacetylase), showing that the *N*-acetylhexosamine moieties of GNB and LNB follow different catabolic routes. A *lacAB* mutant (galactose-6P isomerase) was impaired in GNB and LNB utilization, indicating that their galactose moiety is channelled through the tagatose-6P pathway. Transcriptional analysis showed that the *gnb* operon is regulated by substrate-specific induction mediated by the transcriptional repressor GnbR, which binds to a 26 bp DNA region containing inverted repeats exhibiting a 2T/2A conserved core. The data represent the first characterization of novel metabolic pathways for

human milk oligosaccharides and glycoconjugate structures in Firmicutes.

Introduction

Galacto-*N*-biose (GNB; Galβ1-3GalNAc) is the common *O*-glycan core structure in glycoproteins, such as mucin present in human milk and in the gastrointestinal tract. GNB is also a crucial structure in functional sugar chains like the T-antigen disaccharide and it is also an essential part of the carbohydrate moieties of complex glycosphingolipids (Lloyd *et al.*, 1996; Moran *et al.*, 2011; Liu and Newburg, 2013). Another important disaccharide present in human secretions is lacto-*N*-biose (LNB; Galβ1-3GlcNAc), which is the major core structure of human milk oligosaccharides (HMO) (Thurl *et al.*, 2010; Urashima *et al.*, 2012). HMO are classified into type-1 and type-2, containing LNB and *N*-acetylglucosamine, respectively, as disaccharide building blocks. Human milk is unique since type-1 oligosaccharides are more abundant than type-2. In addition, LNB-containing oligosaccharides are not present or are present in very low amounts in the milk from other mammals (Urashima *et al.*, 2013), which may be an indication of the biological importance of type-1 HMO for both human health and human evolution. LNB is also found in the glycan domains of glycolipids and glycoproteins in several cell types including the intestinal epithelium and blood group antigens (Finne *et al.*, 1989; Hakomori, 2008). Studies on the utilization of GNB and LNB by bacteria are only available for *Bifidobacterium* species inhabiting the human gastrointestinal tract (Nishimoto and Kitaoka, 2007; Xiao *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2012; Satoh *et al.*, 2013). This exemplifies the adaptation of this bacterial group to exploit the carbohydrate resources present in the gastrointestinal niche. *Bifidobacterium bifidum* secretes a lacto-*N*-biosidase enzyme that hydrolyses lacto-*N*-tetraose (LNT) into LNB and lactose. The liberated LNB is then incorporated into the cells by an ABC transporter specific for this disaccharide and for GNB (Fig. 1). Internalized LNB and GNB are then phosphorytically cleaved by a GNB/LNB phosphorylase (LNBP) into galactose-1P and the respective *N*-acetylhexosamines (Wada *et al.*, 2008). By contrast, *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* directly incorporates LNT in the cytoplasm and subsequently

Accepted 16 June, 2014. *For correspondence. E-mail yebra@iata.csic.es; Tel. (+34) 963900022; Fax (+34) 963636301.

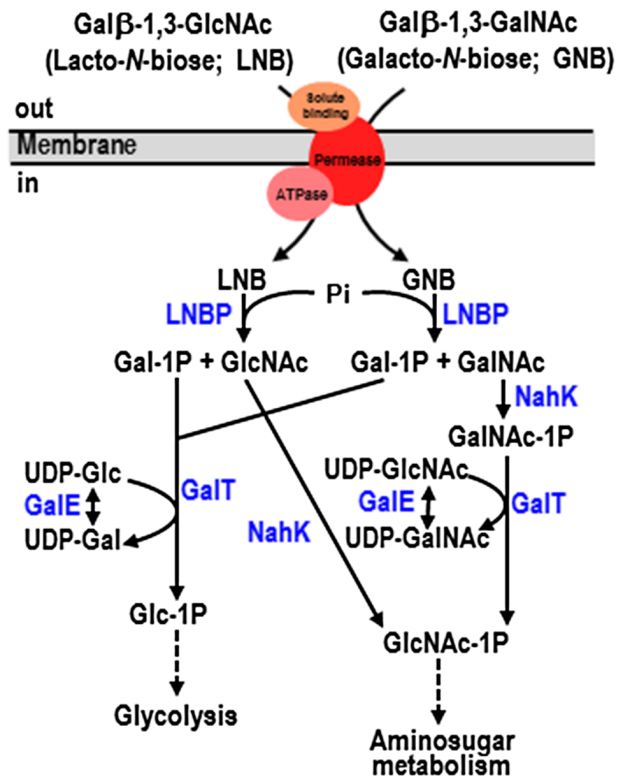


Fig. 1. Schematic presentation of the pathways for galacto-*N*-biose (GNB) and lacto-*N*-biose (LNB) transport and metabolism in *Bifidobacterium*. The components of the GNB- and LNB-specific ABC transporter are depicted. LNB-P, GNB/LNB phosphorylase; NahK, *N*-acetylhexosamine 1-kinase; GalT, UDP-glucose hexose 1P-uridylyltransferase; GalE, UDP-glucose 4-epimerase; Gal, galactose; Glc, glucose; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine.

hydrolyses it into LNB and lactose by a specific LNT β -1,3-galactosidase (Yoshida *et al.*, 2012). The GNB/LNB pathway in *B. longum* ssp. *longum* is encoded by the operon *InpABCD* that codes for LNB-P, *N*-acetylhexosamine 1-kinase (NahK), UDP-glucose hexose 1P-uridylyltransferase (GalT) and UDP-glucose 4-epimerase (GalE) respectively (Nishimoto and Kitaoka, 2007). In this pathway the LNB-P enzyme phosphorylates and hydrolyses LNB or GNB into galactose-1P, which is converted to glucose-1P by the activity of GalT and GalE, and *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) or *N*-acetylgalactosamine (GalNAc), which are phosphorylated by NahK to GlcNAc-1P or GalNAc-1P. *B. bifidum* strains contain the same operon but with two sugar kinases of unknown function located between the coding region of LNB-P and NahK (De Bruyn *et al.*, 2013).

Species of the genus *Lactobacillus* are found in the gastrointestinal tract of infants (Martin *et al.*, 2007; Albesharat *et al.*, 2011) and in human milk (Martin *et al.*, 2003; Fernandez *et al.*, 2013). Among them, *Lactobacillus casei* is commonly isolated from infant faeces (Martin

et al., 2007; Rubio *et al.*, 2014) and some strains of this species are also used as dairy starter cultures and as probiotics in functional foods. Regarding this, oral intake of *L. casei* reduces the frequency or the duration of episodes of acute diarrhoea in young children (Pedone *et al.*, 2000), increases the lactobacilli concentration in the gut microbiota of infants (Guerin-Danan *et al.*, 1998) and in combination with *Bifidobacterium breve* reduces the occurrence of necrotizing enterocolitis (Braga *et al.*, 2011). For the *L. casei* strain BL23 immunomodulatory properties have been shown *in vivo* (Foligne *et al.*, 2007; Rochat *et al.*, 2007). Recently, we have demonstrated that this strain is able to metabolize fucosyl- α 1,3-*N*-acetylglucosamine (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2012a), a disaccharide that forms part of human milk oligosaccharides (Kobata, 2010) and of the Lewis X antigen core, which is found in many human glycoproteins at mucosal surfaces (King, 1994). Transport of this disaccharide and other carbohydrates in *L. casei* BL23 occurs through the phosphoenolpyruvate (PEP):carbohydrate phosphotransferase system (PTS) (Yebra *et al.*, 2006; Alcantara *et al.*, 2008; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2012a; Bourand *et al.*, 2013). This is composed of two general proteins, enzyme I (EI) and HPr (Viana *et al.*, 2000), and carbohydrate-specific transporters (EII). The EI autophosphorylates at a histidine residue with PEP and then transfers the phosphoryl group to HPr, which becomes phosphorylated at the conserved histidine-15 residue. HPr functions as a phosphoryl donor for the different EII transporters, each of them is specific for a certain sugar, and they consist of three or four different proteins: the cytoplasmic domains EIIA and EIIB, and the transmembrane transporters EIIC and EIID (Postma *et al.*, 1993).

We report here that *L. casei* BL23 is able to ferment GNB, LNB and GalNAc and we identified a gene cluster (*gnbREFGBCDA*), which encodes a mannose-class PTS and the catabolic pathway necessary for the utilization of these carbohydrates. The involvement of *nagA*, encoding an *N*-acetylglucosamine-6P deacetylase, and *lacAB*, encoding the two subunits of the galactose-6P isomerase, in the utilization of GNB and LNB by *L. casei* was also determined. We studied the regulation of *gnb* genes expression via the transcriptional regulator GnbR and, by enzyme and mutant analysis, proposed detailed metabolic pathways for GNB and LNB catabolism in *L. casei*, which are completely different from the ones described until now for *Bifidobacterium* species.

Results

L. casei ferments galacto-*N*-biose (GNB) and lacto-*N*-biose (LNB) and hydrolyses them by using the same enzyme

In order to assess the capacity of *L. casei* strain BL23 to metabolize oligosaccharides we searched its genome

sequence (GenBank Accession No. FM177140) (Maze *et al.*, 2010) for genes encoding putative β -glycosidases. This analysis revealed that *L. casei* BL23 contains a gene *bgaC* (LCABL_02910), renamed here as *gnbG* (Fig. 2A), that is annotated as a putative β -galactosidase 3 (EC 3.2.1.23), although it turned out to be a phospho- β -galactosidase as we demonstrate below, and belongs to the glycosyl hydrolase family 35 (GH 35; <http://www.cazy.org>). The *gnbG* gene codes for a 598 amino acids protein, without a signal peptide or a cell wall-anchoring motif, that was purified as a His-tagged protein and displayed a molecular weight of 68 kDa, in agreement with the calculated mass of the 6x(His)-tagged protein (68.275 kDa; Fig. S1). GnbG hydrolysed 2-nitrophenyl(NP)- β -D-galactopyranoside, although with poor efficiency as demonstrated by the high *Km* and low *Vmax* (Table 1), and it showed an optimal pH of 7.0 and an optimal temperature of 45°C. Among the natural oligosaccharides tested (Table 1), GnbG was able to hydrolyse GNB and LNB, to release galactose (Gal) from lacto-*N*-tetraose (LNT) and to hydrolyse Gal β 1-6GlcNAc, although this last disaccharide was cleaved very inefficiently.

Growth of *L. casei* BL23 using MRS basal medium supplemented with 4 mM GNB, LNB or LNT was tested, showing that this strain was able to grow in the presence of GNB or LNB as a fermentable carbon source (Fig. 3A), whereas it was not able to ferment LNT (data not shown). The growth pattern of *L. casei* in the presence of lactose as a positive control is also shown (Fig. 3A). The maximum cell density reached by *L. casei* was alike in both GNB and lactose, although the adaptation period to each carbon source was lower for GNB than for lactose. Compared to GNB and lactose, LNB was a carbon and energy source less efficient for *L. casei*, as seen by the lower cell density reached in the presence of this disaccharide. To determine if the glycosidase GnbG was involved in the utilization of GNB and/or LNB in *L. casei* BL23, a mutant in *gnbG* was constructed (strain BL384). Interestingly, this mutant exhibited a diminished growth with GNB or LNB which was comparable to that of the negative control (non-supplemented MRS basal medium) (Fig. 3B), indicating that GnbG is necessary for the utilization of both disaccharides. Sugar content analysis of the culture supernatants detected GNB and LNB, respectively, in the supernatants from BL384 (*gnbG*), while they were completely consumed by the wild-type BL23 strain.

GNB, LNB and GalNAc are transported by the same mannose-type PTS

gnbG is organized in an operon-like structure (*gnbREFG-BCDA*) with genes encoding a putative transcriptional regulator, catabolic enzymes and sugar transporters

(Fig. 2A). Specifically, *gnbB*, *gnbC*, *gnbD* and *gnbA* (LCABL_02920, LCABL_02930, LCABL_02940 and LCABL_02950) encode proteins with homology to EIIB, EIIC, EIID and EIIA components of a mannose-class PTS transporter respectively. To determine if this PTS was involved in the internalization of GNB and LNB in *L. casei* BL23, a mutant disrupted in the gene encoding the EIIC domain was constructed (strain BL385). This strain was unable to grow in the presence of LNB or GNB as a carbon source (Fig. 3C). Analysis for sugar content in the supernatants showed that both disaccharides were not consumed, indicating that the EIIC domain encoded by *gnbC* is involved in the uptake of GNB and LNB (Fig. 2). In order to further confirm the involvement of the PTS^{Gnb} from *L. casei* BL23 in the transport of these disaccharides and to test if transport via the EII permease was coupled to phosphorylation, the growth pattern of BL126 (*ptsI*), a mutant deficient in the PTS-general component Enzyme I (Viana *et al.*, 2000), was tested in GNB or LNB as the carbon source. BL126 (*ptsI*) did not grow in the presence of GNB or LNB (Fig. 3D), confirming that their utilization is dependent on a fully functional PTS. As expected, BL126 was able to grow with glucose but not with lactose, a strict PTS-sugar in *L. casei* (Viana *et al.*, 2000) (Fig. 3D). These results suggest that GNB and LNB are internalized as phosphorylated derivatives.

We next tested whether *L. casei* was also able to grow with GalNAc, a monosaccharide constituent of GNB, since no previous report on the utilization of this sugar exists for lactobacilli and as seen below the *gnb* cluster is induced by this *N*-acetylhexosamine. *L. casei* BL23 grew in MRS basal medium supplemented with 4 mM GalNAc (Fig. 4). Furthermore, we showed that the PTS^{Gnb} was involved in the fermentation of GalNAc, as the BL385 (*gnbC*) strain showed a diminished growth rate (0.031 h⁻¹) compared to the wild type (0.128 h⁻¹), whereas the BL126 (*ptsI* strain) did not grow at all with GalNAc (Fig. 4). This indicated that the PTS^{Gnb} from *L. casei* in addition to GNB and LNB is also involved in the transport of GalNAc.

GnbE and GnbF are required for GNB but not for LNB metabolism

Upstream from *gnbG* there are two genes, *gnbE* (LCABL_02890) and *gnbF* (LCABL_02900) annotated as a tagatose-6P ketose/aldose isomerase and GlcNAc-6P deacetylase respectively. Therefore we hypothesized that these enzymes may be part of a pathway for the catabolism of the *N*-acetylhexosamine-P resulting from the transport of GalNAc via the PTS^{Gnb} or from the hydrolysis of LNB-P and GNB-P by the GnbG phospho- β -galactosidase (Fig. 2B). In this latter case, the resulting *N*-acetylhexosamines should be phosphorylated by specific

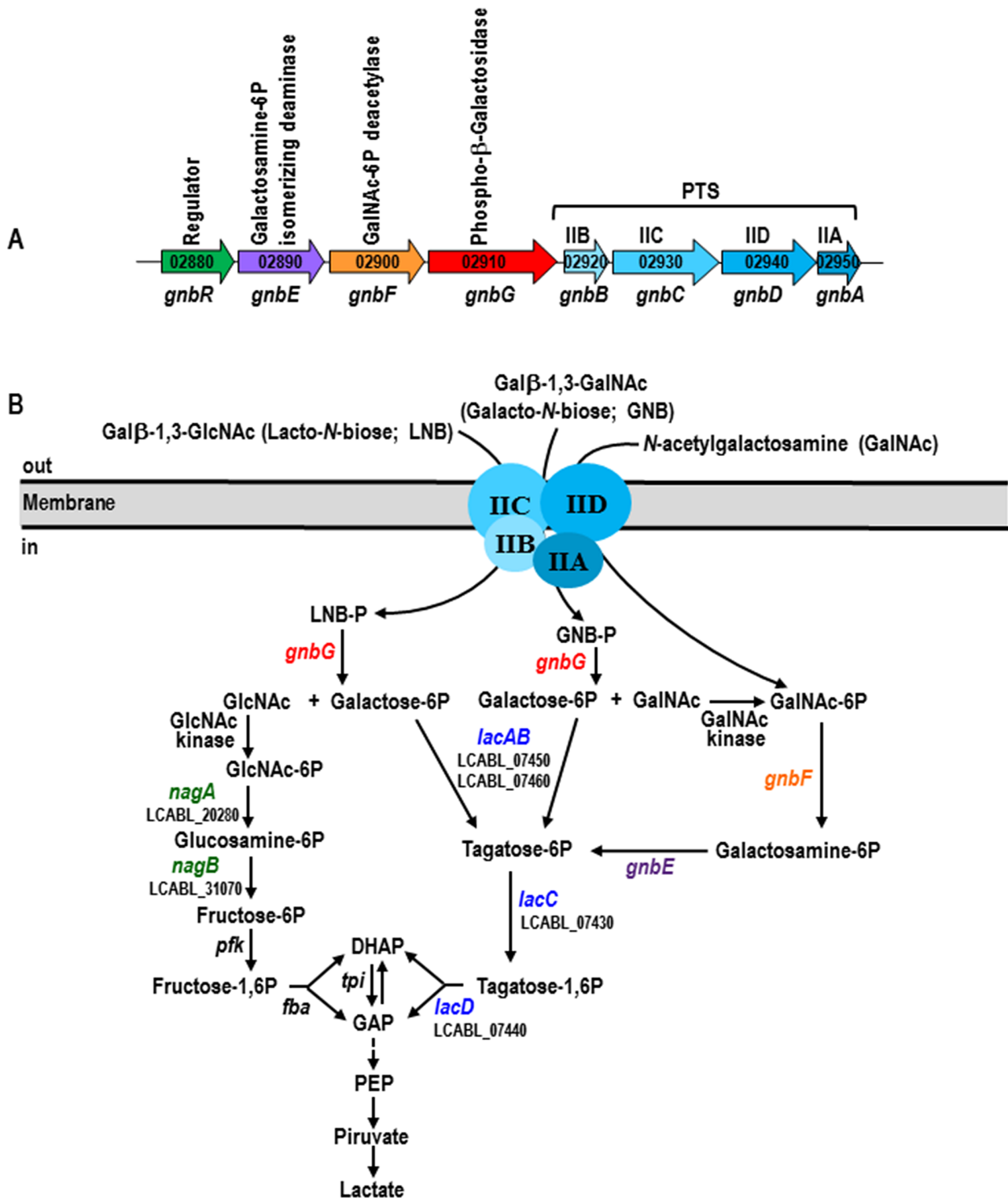


Fig. 2. A. Schematic presentation of the 8 kbp *Lactobacillus casei* BL23 DNA fragment containing the *gnb* operon. The numbers within the arrows correspond to the ORF numbers (LCABL_) from the genome sequence.

B. Schematic presentation of the pathways for galacto-*N*-biose (GNB), lacto-*N*-biose (LNB) and *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) transport and metabolism in *L. casei* BL23. PTS, phosphoenolpyruvate: phosphotransferase system; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; *nagB*, glucosamine-6P deaminase; *lacAB*, galactose-6P isomerase; *lacC*, tagatose-6P kinase; *lacD*, tagatose-1,6P aldolase; *pfk*, 6-phosphofructo-1-kinase; *fba*, fructose-1,6P aldolase; *tpi*, triose phosphate isomerase.

Table 1. Activity and characterization of enzyme GnbG.

Substrate ^a (structure)	Activity ^b
2-NP-β-D-galactopyranoside	+
4-NP-β-D-glucopyranoside	-
2-NP-1-thio-β-D-galactopyranoside	-
4-NP-β-D-glucuronide,	-
4-NP- <i>N</i> -acetyl-β-D-glucosaminide	-
4-NP-α-D-glucopyranoside	-
4-NP-α-D-galactopyranoside	-
4-NP-α-L-fucopyranoside	-
Galacto- <i>N</i> -biose (Galβ1-3GalNAc)	+
Lacto- <i>N</i> -biose (Galβ1-3GlcNAc)	+
Lacto- <i>N</i> -triose (GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc)	-
Lacto- <i>N</i> -tetraose (Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc)	+
Lacto- <i>N</i> -neotetraose (Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc)	-
6'-Galactopyranosyl-GlcNAc (Galβ1-6GlcNAc)	+/-
3'- <i>N</i> -Acetylgalactosaminyl-Gal (GalNAcβ1-3Gal)	-
3'- <i>N</i> -Acetylglucosaminyl-Man (GlcNAcβ1-3Man)	-
4'-Mannopyranosyl-GlcNAc (Manβ1-4GlcNAc)	-
4'-Galactofuranosyl-GlcNAc (Galβ1-4GlcNAc)	-
Lactose (Galβ1-4Glc)	-
<i>N</i> -acetyl-lactosamine (Galβ1-4GlcNAc)	-
Lactulose (Galβ1-4Fru)	-
Maltose (Glcα1-4Glc)	-
Maltotriose (Glcα1-4Glcα1-4Glc)	-
Sucrose	-
Characterization ^c	
V_{max} (μmol (mg protein ⁻¹ min ⁻¹))	1.7
K_m (mM)	2.3
Optimal pH	7.0
Optimal temperature (°C)	45

a. Carbohydrates used as substrates. NP, nitrophenyl; Glc, glucose; Gal, Galactose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; Man, mannose; Fru, fructose.

b. +, substrate is totally hydrolysed after 16 h reaction in the conditions described in *Experimental procedures*; +/-, substrate is partially hydrolysed after 16 h reaction in the conditions described in *Experimental procedures*; -, no activity detected.

c. The enzyme activity was determined with 2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside as the substrate.

kinases. In order to prove that, GnbF and GnbE were overexpressed as His-tagged proteins and purified to homogeneity (Fig. S1). Their putative activities were tested using GlcNAc-6P or GalNAc-6P as the substrate in a coupled assay as described in *Experimental procedures*. The simultaneous presence of both enzymes GnbF and GnbE was necessary to convert GalNAc-6P to Tagatose-6P, showing that GnbF deacetylated GalNAc-6P to galactosamine-6P, which was further converted to tagatose-6-P by GnbE (Fig. S2). This confirmed that GnbF is an *N*-acetylhexosamine-6P deacetylase, whereas GnbE exhibits deaminase and isomerase activity on galactosamine-6P. No activity was detected with GlcNAc-6P (Fig. S2). Accordingly, a constructed mutant in *gnbF* (BL383 strain) showed a growth rate in GNB (0.041 h⁻¹) (Fig. 5A) lower than the wild-type (0.192 h⁻¹) (Fig. 3A), whereas in LNB its growth rate (0.042 h⁻¹) was comparable to the wild-type (0.044 h⁻¹). Also, in agreement

with the activity of GnbF on GalNAc-6P, BL383 (*gnbF*) showed a growth rate in GalNAc (0.044 h⁻¹) lower than the wild-type (0.128 h⁻¹) (Fig. 4), whereas in GlcNAc its growth rate was identical to the wild-type (data not shown). Similarly, a mutant in *gnbE* (strain BL397) failed to grow in GNB, but no major effects on growth were shown in LNB or GlcNAc. The presence of GNB (Fig. 5D) or GalNAc (Fig. 4) but not LNB (Fig. 5D) was toxic for the *gnbE* mutant, as shown by the diminished growth compared with the residual growth of this strain in non-supplemented MRS basal medium (Fig. 5D).

The above results indicated that *gnbE* and *gnbF* are required for GNB but not for LNB utilization. The catabolism of LNB must therefore count on a second *N*-acetylhexosamine-P deacetylase able to act on the GlcNAc-6P generated from LNB (Fig. 2B). We speculated that this activity might be coded by another gene present in the genome, *nagA* (LCABL_20280), whose product showed an identity of 39% with GnbF. In order to test this, a mutant strain disrupted in *nagA* (strain BL388) was constructed. The growth rate of this mutant strain in MRS medium with LNB (0.035 h⁻¹) was similar to that of the control non-supplemented MRS (0.032 h⁻¹) (Fig. 5B). The growth on GNB (Fig. 5B) of the *nagA* mutant was barely affected, while growth on GalNAc (Fig. 4) was reduced, showing that both NagA and GnbF activities are required to fully sustain growth on this sugar. As expected, the *nagA* mutant was not able to grow on GlcNAc as a carbon source (data not shown), indicating that *nagA* is involved in the metabolism of this monosaccharide and also of the GlcNAc moiety of LNB. A double mutant strain (BL389) in *gnbF* and *nagA*, was not able to grow on GlcNAc (data not shown), GalNAc (Fig. 4), GNB or LNB (Fig. 5C). These results suggested that the residual growth displayed by BL383 (*gnbF*) on GNB was probably due to the activity of NagA on GalNAc-6P, while GnbF could only partly replace NagA. In addition, they suggested that the accumulation of the sugar-phosphates GalNAc-6P, GlcNAc-6P or galactosamine-6P have a toxic effect on *L. casei* cells' viability, since the galactose moiety of GNB or LNB cannot sustain growth in the double mutant strain BL389 and in the single *gnbE* mutant. Phosphorylated sugars have indeed been shown to be highly toxic in bacteria (Swiatek *et al.*, 2012; Phong *et al.*, 2013).

Similar to the reaction of GnbE on galactosamine-6P, deamination and isomerization of the glucosamine-6P generated from LNB to fructose-6P might be catalyzed by the product of the gene *nagB* (LCABL_31070) that encodes a presumed glucosamine-6P deaminase. Several efforts to disrupt *nagB* in the chromosome of *L. casei* were unsuccessful, thus confirming previous results that suggested that NagB plays an essential role in carbon fluxes in *L. casei* (Rodriguez-Diaz *et al.*, 2012b).

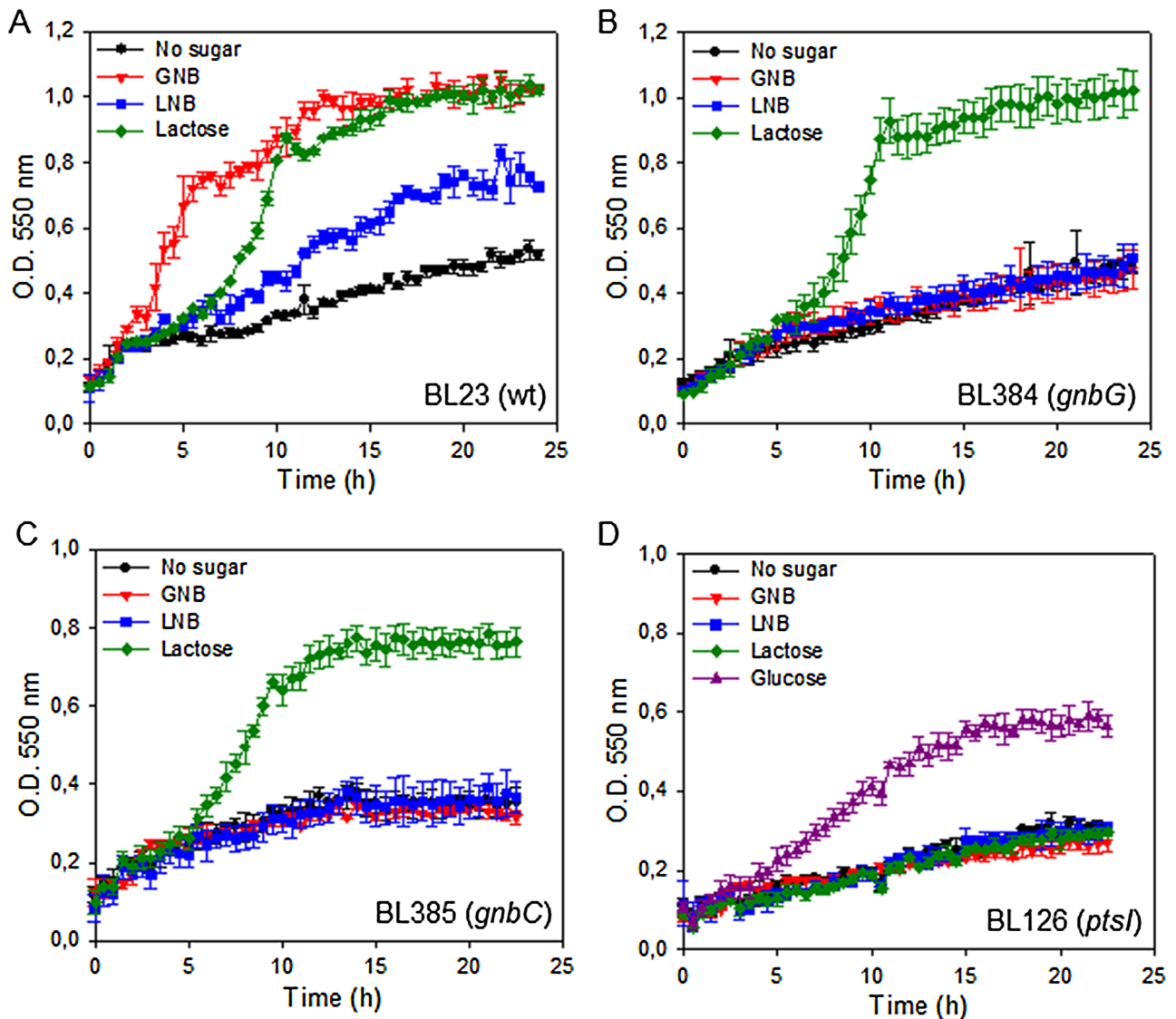


Fig. 3. Growth curves of *Lactobacillus casei* wild type strain BL23 (A), *L. casei* mutant strains BL384 (*gnbG*) (B) and BL385 (*gnbC*) (C) on MRS basal medium without carbon source (black), with galacto-*N*-biose (red), lacto-*N*-biose (blue) or lactose (green). Data presented are mean values based on at least three replicates. Error bars indicate standard deviations. Growth curves of *L. casei* mutant strain BL126 (*ptsI*) (D) on MRS basal medium without carbon source (black), with galacto-*N*-biose (red), lacto-*N*-biose (blue), lactose (green) or glucose (pink). Data presented are mean values based on at least three replicates. Error bars indicate standard deviations.

Identification of the tagatose-6P pathway in *L. casei* BL23 and assessment of its involvement in the GNB and LNB metabolism

The results shown above suggest that GNB and LNB are transported and phosphorylated by the PTS^{Gnb}, and subsequently hydrolysed by the phospho- β -galactosidase GnbG into the corresponding *N*-acetylhexosamine and Gal-6P (Fig. 2B). To further demonstrate this, we investigated whether the tagatose-6P (Tag-6P) route was involved in GNB and LNB catabolism. It is accepted that Gal-6P, which also results from the transport of galactose

by the PTS^{Gal} or from the lactose metabolism, is metabolized via the Tag-6P route in *L. casei* (Alpert and Siebers, 1997; Bettenbrock *et al.*, 1999), although this has never been investigated at the genetic level. Analysis of the genome sequence of *L. casei* BL23 (GenBank Accession No. FM177140) (Maze *et al.*, 2010) showed five genes *lacR1ABD2C* (LCABL_07470 to LCABL_07430) that encode a putative Tag-6P pathway (Fig. 2B), including a transcriptional regulator LacR1, the two subunits of the heteromeric Gal-6P isomerase (*lacAB*), a Tag-6P kinase (*lacC*) and a Tag-1,6-bisP aldolase (*lacD2*). A mutant with a deleted 3' end (204 bp) of *lacA* and a deleted 5' end (339

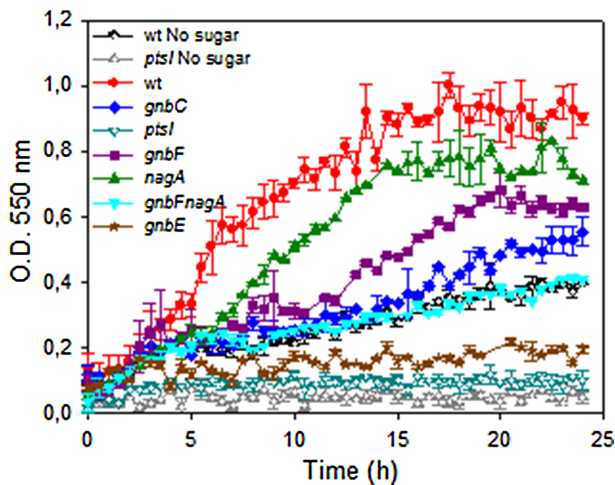


Fig. 4. Growth curves of *Lactobacillus casei* wild-type strain BL23 (red) and mutants BL126 (*ptsI*) (dark cyan), BL383 (*gnbF*) (pink), BL385 (*gnbC*) (blue), BL388 (*nagA*) (green), BL389 (*gnbF nagA*) (cyan) and BL397 (*gnbE*) (brown) on MRS basal medium supplemented with *N*-acetylgalactosamine. BL23 (black) and BL126 (*ptsI*) (gray) on MRS basal medium without carbon source. Data presented are mean values based on at least three replicates. Error bars indicate standard deviations.

bp) of *lacB* was constructed (strain BL393). This strain showed a growth rate in GNB (0.073 h^{-1}) and LNB (0.036 h^{-1}) lower than the wild-type in these sugars: (0.192 h^{-1}) and (0.044 h^{-1}), respectively, and it was not able to grow in galactose (Fig. 6). These results suggested that GNB and LNB utilization in *L. casei* employs the Tag-6P pathway for the catabolism of the galactose moiety and that the growth displayed by BL393 (*lacAB*) on those disaccharides would be only sustained by their *N*-acetylhexosamine moiety respectively. They also support that Gal-6P is the product of the hydrolysis of GNB-P and LNB-P by GnbG.

Transcriptional analyses of the *gnb* genes in *L. casei*

The operon structure of *gnbREFGBCDA* (Fig. 2A) suggests a co-ordinated transcription linked to GNB, LNB or GalNAc availability. RT-qPCR analyses were performed with RNA isolated from *L. casei* BL23 (wild type) grown in MRS basal medium containing GNB, LNB, GalNAc, GlcNAc, galactose and glucose (Fig. 7). Taking as a reference the transcript levels in cells growing in glucose, the *gnbR*, *gnbE*, *gnbF*, *gnbG* and *gnbC* were induced by GNB and GalNAc. The induction levels ranged from 3.2- to 38.8-fold and from 7.1- to 12.8-fold in GNB and GalNAc respectively. In contrast, growth in the presence of LNB and GlcNAc barely induced the *gnb* genes. Indeed, the above results with the knockout mutants showed that the catabolism of LNB only required some of the proteins encoded by the *gnb* cluster (the PTS^{Gnb} and GnbG, while

GnbF and GnbE are dispensable) and the metabolism of GlcNAc is totally independent of this cluster. The transcript levels of the *gnb* genes decreased, ranging from 4.2- to 7.3-fold, when the cells were grown with galactose. Therefore, a downregulation of the *gnb* gene cluster expression in the presence of the hexose moiety of GNB and LNB exists. This effect has also been observed for some genes in *Streptococcus mutans*, including several genes related with energy metabolism, which showed a lower expression when the cells were grown on galactose compared to glucose (Abranches *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2013).

gnbR codes for a transcriptional repressor of the *gnb* genes

LCABL_02880 (*gnbR*) (Fig. 2A) encodes a protein with homology to putative transcriptional regulators. It shows a conserved N-terminal winged helix–turn–helix (WHTH) DNA-binding domain (amino acid residues 5 to 69) of the GntR family of transcriptional regulators and a C-terminal ligand-binding domain (amino acid residues 90 to 230) homologous to the UbiC transcription regulator-associated (UTRA) domain. This domain has a fold similar to that in members of the HutC subfamily of GntR-type regulators (Rigali *et al.*, 2002). To determine the involvement of GnbR in the regulation of GNB and LNB utilization in *L. casei* BL23, a mutant in *gnbR* was constructed (strain BL382). In MRS basal medium with GNB, this mutant showed a growth rate (0.210 h^{-1}) similar to that of the wild-type (0.192 h^{-1}); however, in LNB its growth rate (0.180 h^{-1}) was higher than that of the wild-type (0.044 h^{-1}) (Fig. 8A). Transcription of *gnbE*, *gnbF*, *gnbG* and *gnbC* genes in BL382 (*gnbR*) mutant strain was similar irrespective of the presence of distinct sugars in the medium (GNB, LNB, GalNAc, GlcNAc, galactose and glucose) (Fig. 8B). In addition, it occurred at a higher level compared to the wild-type strain grown on glucose, indicating that GnbR acts as a transcriptional repressor of *gnb* genes.

Binding of GnbR to the *gnbREFGBCDA* promoter

To test whether the regulatory effect of GnbR required a direct interaction with the promoter region of the *gnb* operon, we purified GnbR as a His-tagged protein (Fig. S1) and it was used in gel mobility shift assays with two different fragments spanning the *gnbR* upstream region: a 192 bp DNA fragment close to the 3' end of the upstream gene (*manA*, LCABL_02870) from *gnbR* and a 172 bp DNA fragment immediately upstream of *gnbR* (Fig. 9A). GnbR retarded the 172 bp fragment but not the 192 bp. To identify the exact DNA binding site within the *gnb* promoter recognized for GnbR, DNase I footprinting assays with GnbR were performed (Fig. 9B). The analysis showed a protected region spanning 26 bases, from positions –9 to –34

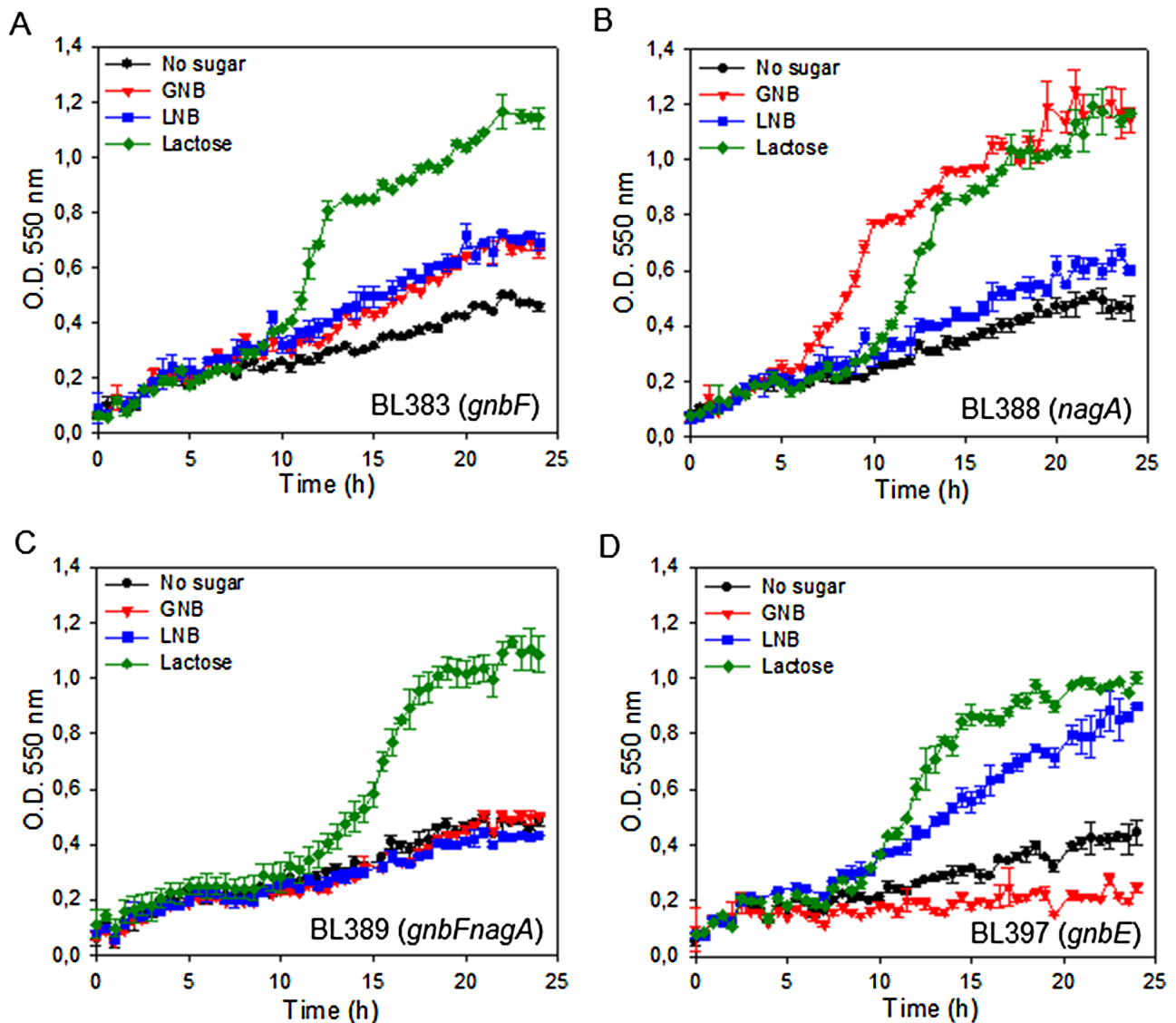


Fig. 5. Growth curves of *Lactobacillus casei* strains BL383 (*gnbF*) (A), BL388 (*nagA*) (B) and BL389 (*gnbFnagA*) (C) and BL397 (*gnbE*) (D) on MRS basal medium without carbon source (black), with galacto-*N*-biose (red), lacto-*N*-biose (blue) or lactose (green) as the carbon source. Data presented are mean values based on at least three replicates. Error bars indicate standard deviations.

respect to the start codon of *gnbR*. This 26 bp protected sequence contains three inverted repeat sequences that could be the recognition motif for GnbR (Fig. 9C). An alignment of the DNA-binding sequence determined for GnbR with known and experimentally identified promoters, which are regulated by the GntR/HutC family of transcriptional regulators, revealed a sequence core with 2T/2A conserved for all operators (Fig. 9C).

Discussion

Information on the utilization of mucosal and human milk associated glycans in probiotics is scarce and almost restricted to bifidobacteria. We have shown here that *L.*

casei is able to metabolize LNB, GNB and GalNAc, and that these are transported into the cells by the same mannose-type PTS. Although most PTS are specific for a particular carbohydrate, it has previously been described that PTS permeases transport two or more structurally related β -glucosides (Le Coq *et al.*, 1995; Deutscher *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2011). While studying the metabolism of other mucosal associated glycans in *L. casei* we showed that fucosyl- α 1,3-GlcNAc is transported by a specific PTS in a phosphorylation-independent manner before being intracellularly hydrolysed by an α -L-fucosidase (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2012a). In contrast, several lines of evidence support that GNB, LNB and GalNAc are taken up and phosphorylated by the same PTS^{Gnb}. First, the Enzyme

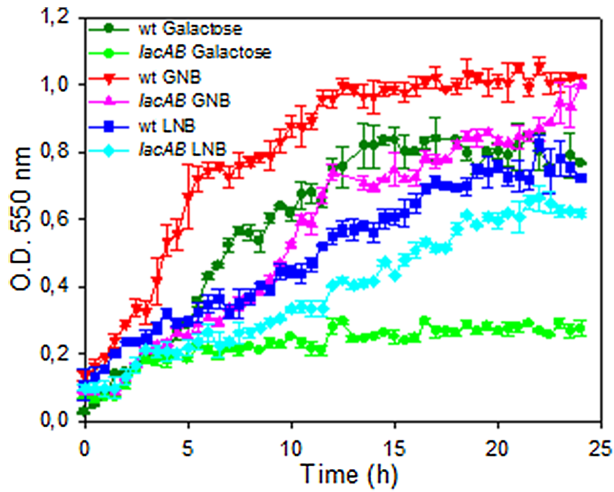


Fig. 6. Growth curves of *Lactobacillus casei* wild type strain BL23 on MRS basal medium with galactose (dark green), galacto-*N*-biose (red) or lacto-*N*-biose (blue) as carbon sources, and *L. casei* mutant strain BL393 (*lacAB*) on MRS basal medium with galactose (green), galacto-*N*-biose (pink) or lacto-*N*-biose (cyan) as carbon sources. Data presented are mean values based on at least three replicates. Error bars indicate standard deviations.

I of the PTS was required for their catabolism and second, the tagatose-6P pathway was involved in the metabolism of the galactose moiety of GNB and LNB. GNB-P and LNB-P are hydrolysed to Gal-6P and the corresponding *N*-acetylhexosamines by the product of the gene *gnbG*. Only two proteins homologous to GnbG have been characterized to date (Jeong *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2014). The

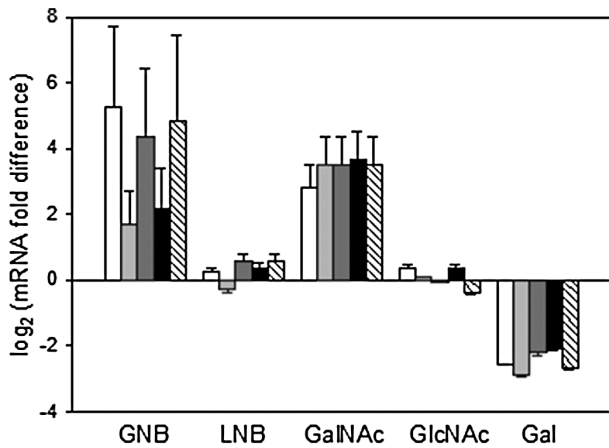


Fig. 7. Transcriptional analysis by RT-qPCR of the expression of *gnbR* (white bars), *gnbE* (clear grey bars), *gnbF* (dark grey bars), *gnbG* (black bars) and *gnbC* (diagonal strip lined bars) in *Lactobacillus casei* BL23 grown in MRS basal medium containing galacto-*N*-biose (GNB), lacto-*N*-biose (LNB), *N*-acetylgalactosamine (GalNAc), *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) or galactose (Gal). Cells grown in MRS basal medium with glucose were used as reference condition. Data presented are mean values based on three replicates of at least two biological independent samples. Bars indicate standard errors.

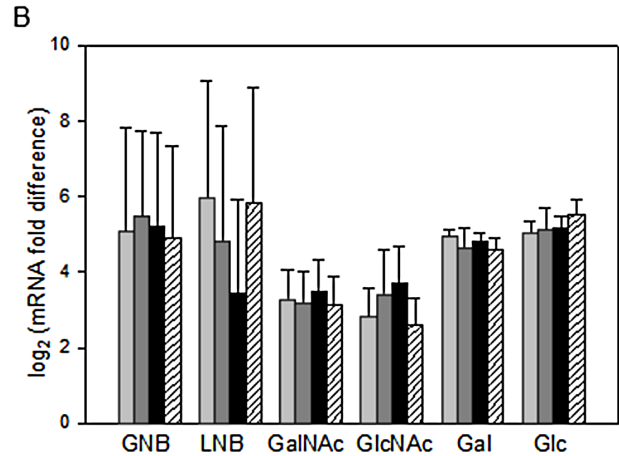
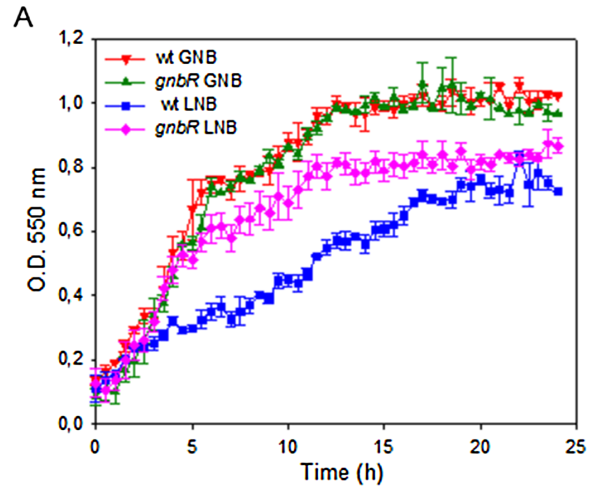


Fig. 8. A. Growth curves of *Lactobacillus casei* BL23 on MRS basal medium with galacto-*N*-biose (red) and lacto-*N*-biose (blue) as carbon sources, and BL382 (*gnbR*) on MRS basal medium with galacto-*N*-biose (green), and lacto-*N*-biose (pink) as the carbon source. Data presented are mean values based on at least three replicates. Error bars indicate standard deviations. B. Transcriptional analysis by RT-qPCR of the expression of *gnbE* (clear grey bars), *gnbF* (dark grey bars), *gnbG* (black bars) and *gnbC* (diagonal strip lined bars) in *L. casei* BL382 (*gnbR*) grown in MRS basal medium containing galacto-*N*-biose (GNB), lacto-*N*-biose (LNB), *N*-acetylgalactosamine (GalNAc), *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), galactose (Gal) or glucose (Glc). *L. casei* BL23 grown in MRS basal medium with glucose was used as reference strain. Data presented are mean values based on three replicates of at least two biological independent samples. Bars indicate standard errors.

predicted amino acid sequence of GnbG exhibits 60% and 59% identities to the BgaC enzymes from *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus suis* respectively. These proteins were localized at the bacterial cell surface and they catalysed the hydrolysis of the terminal galactose from lacto-*N*-tetraose and LNB-containing sugar chains (Jeong *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2014), but not from GNB-containing sugar chains (Hu *et al.*, 2014). Curiously, like *gnbG* the *bgaC* genes from streptococci are also clustered with genes encoding a putative mannose-type PTS (Jeong

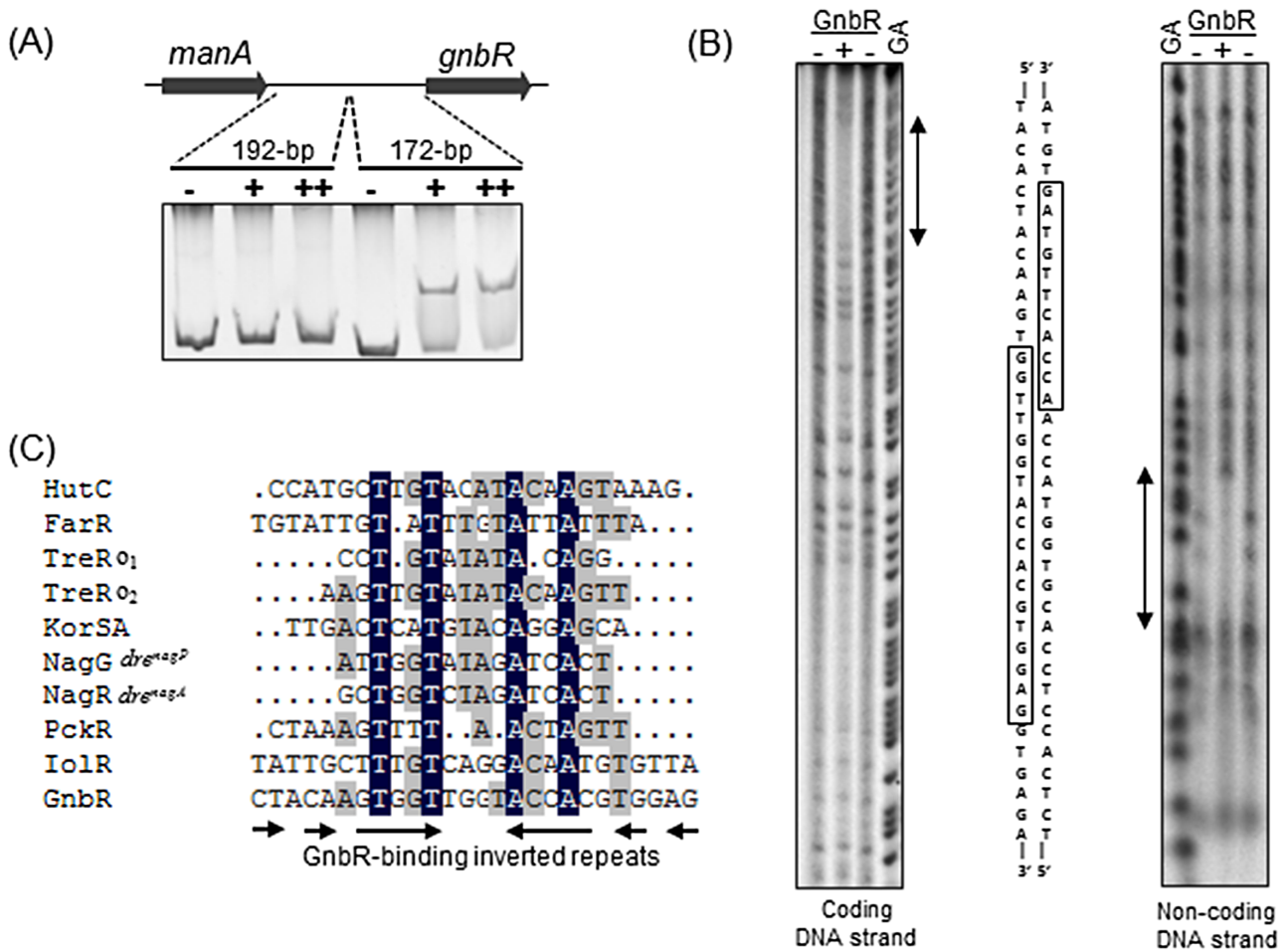


Fig. 9. A. Electrophoretic gel mobility shift assay with the 192-bp or 172-bp DNA fragments of the intergenic region between *manA* and *gnbR* genes, without (-), with 2 μ g (+) or 5 μ g (++) of His-tagged GnbR.

B. DNase I footprinting analysis of GnbR binding to the *gnb* promoter region (172-bp fragment). Digestion of the coding and non-coding DNA strands in the presence (+) or absence (-) of His-tagged GnbR is shown. The GnbR-protected regions are indicated by double arrowhead vertical bars and the corresponding sequence is within vertical rectangles. GA, lanes with the A+G Maxam and Gilbert reaction products.

C. Alignment of the GnbR-binding site with known promoter regions of the GntR/HutC family of transcriptional regulators: HutC (Hu *et al.*, 1989); FarR (Quail *et al.*, 1994); TreRo₁ and TreRo₂ (Schöck and Dahl, 1996); KorSA (Sezonov *et al.*, 2000); NagR^{dre^{nagP}} and NagR^{dre^{nagA}} (Bertram *et al.*, 2011); PckR (Hyeon *et al.*, 2012); IoIR (Klaffl *et al.*, 2013). Bases conserved in all sequences are shown against a dark background. Bases conserved in at least five of the ten sequences appear against a shaded background. Inverted repeats in the GnbR binding site are marked with arrows.

et al., 2009). This fact together with the lack of a signal peptide or a cell wall-anchoring motif suggests that the BgaC enzymes in addition to surface-associated β -galactosidase activity could have a phospho- β -galactosidase activity within the cells. Whether GnbG from *L. casei* exhibits similar surface location and activity remains to be investigated. However, the fact that GNB and LNB remained non-hydrolysed in the supernatants of strains defective in PTS^{Gnb} or the Enzyme I of the PTS argues against that, at least under our experimental conditions.

GalNAc or GlcNAc liberated by GnbG from GNB-P or LNB-P, respectively, would be phosphorylated by an *N*-acetylhexosamine kinase before entering two

different catabolic routes that will end in the same glycolytic intermediaries, dihydroxyacetone-P (DHAP) and D-glyceraldehyde-3P (GAP) (Fig. 2). In *B. longum* the operon *lpn*, which is involved in the metabolism of GNB and LNB, contains the gene *lnpB* encoding a kinase that phosphorylates GalNAc and GlcNAc to GalNAc-1P and GlcNAc-1P respectively (Nishimoto and Kitaoka, 2007). Unlike *Bifidobacterium* species, in *L. casei* the *gnb* cluster containing the genes involved in the metabolism of those disaccharides does not encode sugar kinases. We showed that the genes *gnbF*, encoding GalNAc-6P deacetylase, and *nagA*, encoding GlcNAc-6P deacetylase, were involved in the metabolism of GNB and LNB, respectively, which indicates that the GalNAc and GlcNAc resulting from

the hydrolysis of GNB-P and LNB-P, respectively, would be phosphorylated at the C-6 instead of C-1 position as occurs in bifidobacteria (Nishimoto and Kitaoka, 2007). We tried to find the kinases responsible for the catabolism of GlcNAc and GalNAc using the deduced amino acid sequence of *N*-acetylglucosamine 6-kinase (NagK) from *E. coli* (Uehara and Park, 2004) in BLAST searches against the *L. casei* BL23 genome (Maze *et al.*, 2010). Three putative sugar kinases were found: LCABL_18750 (annotated as *glk* gene), LCABL_28340 and LCABL_29280 (named here as *sugK* for sugar kinase). In order to test whether the genes *glk* and *sugK* (the third sugar kinase LCABL_28340 is within a hypothetical mannosyl-saccharide operon and therefore it was not tested) were involved in the metabolism of GNB and LNB, two mutants disrupted in *glk* (strain BL391) and *sugK* (strain BL392) were constructed. Both strains showed the same growth pattern as the wild-type strain in those disaccharides (data not shown), indicating that neither *glk* nor *sugK* are involved in GNB or LNB metabolism in *L. casei* or that they present redundant activities. Therefore, further analysis will be needed to determine the mechanisms by which GalNAc and GlcNAc are phosphorylated.

GalNAc is a constituent of the cell wall, lipopolysaccharides and exopolysaccharides in bacteria (Tallon *et al.*, 2003; Bernatchez *et al.*, 2005; Freymond *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2011), and it connects glycan chains with the protein backbone of mucins in humans (Jensen *et al.*, 2010). Even though GalNAc is an available source of carbon and nitrogen for bacteria, its catabolic pathway has only been characterized in *Escherichia coli* and *Shewanella* sp. (Brinkkotter *et al.*, 2000; Ray and Larson, 2004; Leyn *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013). The *gnb* gene cluster studied here encodes the catabolic enzymes that, with the exception of GnbG, comprise a GalNAc pathway. Unlike *L. casei*, in *E. coli* and other Proteobacteria (Leyn *et al.*, 2012) the gene cluster involved in GalNAc catabolism contains additional genes that encode enzymes involved in the Tag-6P metabolism, which includes a Tag-6P kinase and a Tag-1,6P aldolase. In *L. casei* the Tag-6P pathway is encoded by a different gene cluster containing the structural genes *lacR1ABD2C*, which would be responsible for the metabolism of the Tag-6P resulting from tagatose (Viana *et al.*, 2000), galactose (Bettenbrock *et al.*, 1999) and lactose (Gosalbes *et al.*, 1997) catabolism, and in the routes proposed here for GNB, LNB and GalNAc. Indeed, we showed that a mutant for the genes *lacAB* is not able to grow in galactose and it is impaired in the growth on GNB and LNB.

We have determined that the transcriptional regulation of the *gnb* gene cluster in *L. casei* comprises induction by GNB and GalNAc mediated by the transcriptional repressor GnbR. In *E. coli* the GalNAc catabolic operon is also regulated by a transcriptional repressor, although it belongs to the DeoR/GlpR protein family (Ray and Larson,

2004). Effector molecules of regulators in this family are usually phosphorylated intermediates of the respective metabolic pathways (van Rooijen *et al.*, 1993; Ray and Larson, 2004). Likewise, GlcNAc metabolism in *Bacillus subtilis* is regulated by a GntR-family transcriptional repressor inactivated by the catabolic intermediate glucosamine-6P (Bertram *et al.*, 2011). We have shown here that the *gnb* genes from *L. casei* are upregulated by growth on GNB and GalNAc. Therefore, the signal triggering GnbR inactivation could likely be the phosphorylated sugars GalNAc-6P and/or galactosamine-6P, derived either from the intracellular GalNAc moiety of GNB or from extracellular GalNAc transported and phosphorylated by the PTS^{Gnb}. Tag-6P, resulting from the activity of GnbE on galactosamine-6P or from the galactose-6P metabolism, probably is not an effector of GnbR since the *gnb* cluster is downregulated in the presence of galactose. LNB and GlcNAc, whose metabolism does not lead to GalNAc-6P or galactosamine-6P, barely induced the *gnb* operon. This suggested that GlcNAc-6P and glucosamine-6P are not effectors for GnbR. According to this, LNB utilization was suboptimal in the wild-type strain, probably due to the low induction of *gnb* genes. Thus, growth on LNB was enhanced by mutation in *gnbR*, which allowed constitutive expression of *gnb* genes. Although *L. casei* can be cultured on LNB as the only carbon source, the simultaneous presence of GNB and LNB in environments such as the gastrointestinal tract of breast-fed infants would possibly enhance the efficiency of LNB utilization. GNB and LNB form part of a great variety of bioactive molecules, such as HMO, glycosphingolipids, mucin glycoproteins and glycolipids (Hakomori, 2008; Thurl *et al.*, 2010; Moran *et al.*, 2011; Urashima *et al.*, 2012; Liu and Newburg, 2013). In order to be used by *L. casei*, they must be previously released from those glycoconjugates by the action of other microbial glycosidases. This is the case of endo- α -*N*-acetylgalactosaminidase that is able to liberate GNB from mucin-type *O*-glycans and lacto-*N*-biosidase that releases LNB from HMO (Ashida *et al.*, 2000; Fushinobu, 2010). Analysis of the available genome sequences of lactobacilli (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>) revealed that the *gnb* gene cluster is present only in the *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus* group of phylogenetically related lactobacilli. More than 80% of the sequenced strains of this group contain this cluster and the deduced amino acid sequences of the 8 *gnb* genes showed an identity ranging from 86% to 100% respect to the *L. casei* BL23 sequence. Indeed, the species of this group of *Lactobacillus* are common inhabitants of the gastrointestinal tracts of human and animals (Martin *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2009; Albesharat *et al.*, 2011). Genome analysis in *Lactobacillus* revealed that species of this genus have evolved by gene loss and acquisition driven by their specific ecological niche. Thus, lactobacilli from intestinal origin, such as

Table 2. Strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant genotype or properties	Source or reference
Strains		
<i>Lactobacillus casei</i>		
BL23	Wild type	CECT 5275
BL126	BL23 <i>ptsI</i>	Viana <i>et al.</i> (2000)
BL382	BL23 <i>gnbR</i> (frameshift at SphI site)	This work
BL383	BL23 <i>gnbF</i> (frameshift at BclI site)	This work
BL384	BL23 <i>gnbG</i> (frameshift at NdeI site)	This work
BL385	BL23 <i>gnbC</i> ::pRV300 <i>Erm</i> ^R	This work
BL388	BL23 <i>nagA</i> ::pRV300 <i>Erm</i> ^R	This work
BL389	BL23 <i>gnbF nagA</i> ::pRV300 <i>Erm</i> ^R	This work
BL391	BL23 <i>glk</i> ::pRV300 <i>Erm</i> ^R	This work
BL392	BL23 <i>sugK</i> ::pRV300 <i>Erm</i> ^R	This work
BL393	BL23 <i>lacAB</i> (204-bp deleted at <i>lacA</i> 3' end and 339 bp deleted at <i>lacB</i> 5' end)	This work
BL397	BL23 <i>gnbE</i> (266-bp deleted at <i>gnbE</i> 5' end and frameshift at second <i>AsuII</i> site)	This work
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	F ⁻ <i>endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr) sdrMS-mcrBC) λ⁻</i>	Invitrogen
GM119	F ⁻ <i>supE44, lacY1, galK2, galT22, metB1, dcm-6, dam-3, tsx-78 λ⁻</i>	ATCC53339
BE50	BL21(DE3) containing pREPGroES/GroEL	Dale <i>et al.</i> (1994)
PE155	DH10B containing pQEgnbR	This work
PE157	DH10B containing pQEgnbE	This work
PE158	BE50 containing pQEgnbF	This work
PE159	BE50 containing pQEgnbG	This work
Plasmids		
pRV300	Suicide vector carrying <i>Erm</i> ^R from pAMβ1	Leloup <i>et al.</i> (1997)
pRVgnbR	pRV300 with a frameshift at SphI site in <i>gnbR</i> fragment	This work
pRVgnbE	pRV300 with a 266-bp deleted at 5' end <i>gnbE</i> and frameshift at second <i>AsuII</i> site fragment	This work
pRVgnbF	pRV300 with a frameshift at BclI site in <i>gnbF</i> fragment	This work
pRVgnbG	pRV300 with a frameshift at NdeI site in <i>gnbG</i> fragment	This work
pRVgnbC	pRV300 with a 0.6-kb <i>gnbC</i> fragment	This work
pRVnagA	pRV300 with a 0.55-kb <i>nagA</i> fragment	This work
pRVnagB	pRV300 with a frameshift at BclI site in <i>nagB</i> fragment	This work
pRVglk	pRV300 with a 0.55-kb <i>glk</i> fragment	This work
pRVsugK	pRV300 with a 0.56-kb <i>sugK</i> fragment	This work
pRVlacAB	pRV300 with a fragment carrying a 204-bp deletion at <i>lacA</i> 3' end and a 339 bp deletion at <i>lacB</i> 5' end fragment	This work
pQE80	<i>E. coli</i> expression vector; <i>Amp</i> ^R	Qiagen
pQEgnbR	pQE80 containing <i>gnbR</i> -coding region	This work
pQEgnbE	pQE80 containing <i>gnbE</i> -coding region	This work
pQEgnbF	pQE80 containing <i>gnbF</i> -coding region	This work
pQEgnbG	pQE80 containing <i>gnbG</i> -coding region	This work

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo; ATCC, American Type Culture Collection; *Erm*^R, erythromycin resistance; *Amp*^R, ampicillin resistant.

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus johnsonii* or *Lactobacillus gasseri* carry genes for many traits related to survival and colonization of that environment, including carbohydrate fermentation capabilities (Pridmore *et al.*, 2004; Altermann *et al.*, 2005; Azcarate-Peril *et al.*, 2008). Regarding this, the *L. casei/paracasei/rhamnosus* group seems especially capable for the exploitation of mucosal oligosaccharides, as they represent the only lactobacilli where α -L-fucosidases (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2012a) and routes for the utilization of GNB, LNB and GalNAc are present. The work presented here reports the first characterization of the genes and the catabolic pathway for the utilization of these three structurally related carbohydrates in Firmicutes. The flexible functionalization of the *gnb*

genes probably represents an adaptation of these bacteria to a particular environmental niche like the gastrointestinal tract.

Experimental procedures

Bacterial strains, culture conditions and plasmids

The strains and plasmids used in this study are listed in Table 2. The *L. casei* strains were routinely grown at 37°C under static conditions on MRS medium (Difco). *E. coli*, which was used as host in cloning experiments, was grown in Luria–Bertani medium at 37°C (Oxoid). The corresponding solid media were prepared by adding 1.4% agar. *E. coli* DH10B and GM119 transformants were selected with ampicil-

lin (100 µg ml⁻¹) and *E. coli* BE50 with ampicillin (100 µg ml⁻¹) and kanamycin (25 µg ml⁻¹). *L. casei* transformants were selected with erythromycin (5 µg ml⁻¹).

Vector pRV300 (Leloup *et al.*, 1997) was used for cloning experiments with *E. coli* and for insertional inactivation of genes in *L. casei*. Vector pQE80 (Qiagen) was used for protein overproduction. *E. coli* and *L. casei* strains were transformed by electroporation with a Gene Pulser apparatus (Bio-Rad Laboratories) as recommended by the manufacturer (*E. coli*) or described earlier (*L. casei*) (Posno *et al.*, 1991).

Culture of L. casei strains with monosaccharides and the oligosaccharides galacto-N-biose (GNB), lacto-N-biose (LNB) and lacto-N-tetraose (LNT)

The *L. casei* strains were grown overnight at 37°C under static conditions on sugar-free MRS basal medium containing: bacto-peptone (Difco), 10 g l⁻¹; yeast extract (Pronadisa), 4 g l⁻¹; sodium acetate, 5 g l⁻¹; tri-ammonium citrate, 2 g l⁻¹; magnesium sulphate 7-hydrate, 0.2 g l⁻¹; manganese sulphate monohydrate, 0.05 g l⁻¹; and Tween 80, 1 ml l⁻¹. Overnight cultures were diluted to an OD₅₅₀ of 0.1 in 100 µl of MRS basal medium containing 4 mM of GNB, LNB, LNT, lactose, *N*-acetylgalactosamine, *N*-acetylglucosamine, galactose or glucose. GNB and LNB were obtained from Dextra Laboratories Ltd (Reading, UK) and LNT from Carbosynth (Compton, Berkshire, UK). Bacterial growth was monitored during 24 h by spectrophotometric measurements every 30 min at 550 nm in 96-well plates at 37°C without shaking in a POLARstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany). At least three independent biological replicates for each growth curve were obtained. Results were expressed as means ± standard deviations. The growth rates (µ) were calculated by using the Gompertz model (GraphPad Software, San Diego, CA).

DNA manipulation, oligonucleotides and sequencing

Total DNA was isolated from *L. casei* BL23 as described before (Posno *et al.*, 1991). Recombinant DNA techniques were performed by following standard procedures (Sambrook *et al.*, 1989). PCR primers (Table S1) were synthesized by Isogen Life Science (De Meern, The Netherlands). All PCR reactions were performed with the Expand High Fidelity PCR System (Roche). DNA sequencing was carried out by the Central Service of Research Support of the University of Valencia (Spain). M13 universal and reverse primers or custom primers hybridizing within the appropriate DNA fragments were used for sequencing. Sequence analyses were carried out with DNAMAN 4.03 for Windows (Lynnon BioSoft) and sequence similarities were analysed with the BLAST program (Altschul *et al.*, 1990).

Construction of recombinant strains

DNA fragments containing part of *gnbR*, *gnbE*, *gnbF* and *gnbG* were obtained by PCR using *L. casei* BL23 chromosomal DNA and the oligonucleotides pairs: LNBReg3/LNBReg4, LNB3Fow/LNB3Rev LNB4Fow/LNB4Rev and LNB5Fow/

LNB5Rev respectively. The PCR products were cloned into pRV300 digested with EcoRV. The resulting plasmids pRVgnbR, pRVgnbF and pRVgnbG were cleaved at the unique SphI, BclI and NdeI restriction sites present in the *gnbR*, *gnbF* and *gnbG* coding regions respectively. The plasmid pRVgnbE was cleaved with AsuII that removed a fragment of 266 bp in the coding region of *gnbE*. The four digested plasmids were then treated with the Klenow fragment of DNA polymerase I, ligated and transformed. Different constructs were selected in which a frameshift was introduced at the SphI, BclI and NdeI sites in *gnbR* (pRVgnbR), *gnbF* (pRVgnbF) and *gnbG* (pRVgnbG) respectively. For the *gnbE* gene a plasmid-containing clone was selected with a 266-bp deletion that also introduced a frameshift at the second AsuII in *gnbE* (pRVgnbE). *L. casei* was transformed with each of these plasmids and one erythromycin-resistant clone of each gene carrying the plasmid integrated by single cross-over was grown in MRS without erythromycin for 200 generations. Cells were plated on MRS and replicaplated on MRS plus erythromycin. Antibiotic-sensitive clones were isolated and, among them, one for each gene was selected (BL382, BL383, BL384 and BL397 strains) in which a second recombination event led to the excision of the plasmid leaving a mutated *gnbR*, *gnbF*, *gnbG* and *gnbE* copy, respectively, as was confirmed by sequence analysis of appropriate PCR products. To construct a *gnbC* mutant an internal DNA fragment of *gnbC* was obtained by PCR using *L. casei* BL23 chromosomal DNA and the oligonucleotides LNBICFow and LNBICRev. The PCR product was cloned into pRV300 digested with EcoRV. The resulting plasmid pRVgnbC was used to transform *L. casei* BL23 and single cross-over integrants were selected by resistance to erythromycin and confirmed by PCR analysis and DNA sequencing. One mutant was selected and named BL385.

To construct *nagA* mutant strains an internal DNA fragment of *nagA* was obtained by PCR using *L. casei* BL23 chromosomal DNA and the oligonucleotides 20280For and 20280Rev. The PCR product was cloned into pRV300 digested with EcoRV. The resulting plasmid pRVnagA was integrated in the *L. casei* BL23 genome by single cross-over recombination. One integrant was selected and named BL388. The same procedure was used to inactivate *nagA* gene in the mutant strain BL383 (*gnbF*) obtaining the double mutant *gnbF nagA* (strain BL389). To try to inactivate the *nagB* gene a DNA fragment containing part of *nagB* was obtained by PCR using *L. casei* BL23 chromosomal DNA and the oligonucleotides pair: NagBFW1/NagBRV2. The PCR product was cloned into pRV300 digested with EcoRV. The resulting plasmid pRVnagB was cleaved at the unique BclI restriction site present in the *nagB* coding region, treated with the Klenow fragment of DNA polymerase I, ligated and transformed. One plasmid was selected in which a frameshift was introduced at the BclI site in *nagB* (pRVnagB). This plasmid was used to transform *L. casei* BL23, however after several attempts no transformants were obtained on agar plates with erythromycin.

To construct mutant strains for *glk* and *sugK* genes, respectively, internal DNA fragments of each gene were obtained by PCR using *L. casei* BL23 chromosomal DNA and the oligonucleotides pairs 18750For/18750Rev and 29280For/29280Rev respectively. The PCR products were cloned into pRV300 digested with EcoRV. The resulting plasmids pRVglk and

pRVsugK were used to transform *L. casei* BL23 and single cross-over integrants were selected by resistance to erythromycin and confirmed by PCR. Strains mutated in each gene were selected and named BL391 (*glk*) and BL392 (*sugK*).

A DNA fragment containing part of *lacA* and *lacB* was obtained by PCR using *L. casei* BL23 chromosomal DNA and the oligonucleotides LacAfor and LacBrev. The PCR product was cloned into pRV300 digested with EcoRV. The resulting plasmid pRVlacAB was cleaved with NdeI, which removed a 543-bp fragment spanning the 3' end of *lacA* and 5' end of *lacB*, ligated and transformed. A plasmid was selected with a deletion in *lacAB* (pRVlacAB). *L. casei* was transformed with this plasmid and replacement of the *lacAB* genes by the mutated versions (strain BL393) was achieved as described above.

Oligosaccharide and monosaccharide analysis

To determine the carbohydrates present in the supernatants from the *L. casei* cultures, the cells were removed by centrifugation and the cultures were analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a Jasco PU2080Plus system coupled to a refractive index detector (Jasco RI-2031 Plus) using a Rezex RCM-Monosaccharide column (Phenomenex). The column was kept at 80°C and the samples were eluted in isocratic mode using water as the mobile phase at a flow rate of 0.6 ml min⁻¹. Oligo- and monosaccharides were confirmed by comparison of their retention times with those of standards.

RNA isolation and reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR)

For RNA isolation strains were grown at 37°C under static conditions in 1 ml MRS fermentation medium containing 4 mM of different sugars until mid-log phase was reached. The inocula for these cultures (starting OD of 0.1) were cells pre-grown in MRS basal medium without sugar added. Cells were collected by centrifugation, washed with 1 ml of 50 mM EDTA pH 8 and resuspended in 1 ml of Trizol (Gibco). One gram of 0.1-mm-glass beads was added and cells were broken with a Mini-BeadBeater apparatus (Biospec Products, Bartlesville, OK). RNA was isolated as described by the manufacturers of Trizol. One hundred nanograms of RNA was digested with DNaseI, RNase-free (Fermentas), and 50 ng of digested RNA was retro-transcribed using the Maxima First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) following manufacturer instructions. The resulted cDNA was subjected to quantitative PCR for the genes *gnbR*, *gnbE*, *gnbF*, *gnbG* and *gnbC*. RT-qPCR was performed using the Lightcycler 2.0 system (Roche) and LC Fast Start DNA Master SYBR green I (Roche). Primers were designed by using the Primer-BLAST service (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) in order to generate amplicons ranging from 70 to 200 bp in size (Table S1). RT-qPCR was performed for each cDNA sample in triplicate and using the primers pairs: qPCR2880for/qPCR2880rev (*gnbR*), qPCR2890for/qPCR2890rev (*gnbE*), qPCR2900for/qPCR2900rev (*gnbF*), qPCR2910for/qPCR2910rev (*gnbG*) and qPCR2930for/qPCR2930rev (*gnbC*). The reaction

mixture (10 µl) contained 5 µl of 2× master mix, 0.5 µl of each primer (10 µM), and 1 µl of a 20 times diluted sample from the cDNA synthesis reaction. Reaction mixtures without a template were run as controls. The cycling conditions were as follows: 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of three steps consisting of denaturation at 95°C for 10 s, primer annealing at 60°C for 20 s, and primer extension at 72°C for 20 s. For each set of primers, the cycle threshold values [crossing point (CP)] were determined by the automated method implemented in the Lightcycler software 4.0 (Roche). The *pyrG* gene was selected as reference gene on the base of previous studies (Landete *et al.*, 2010). The relative expression based on the expression ratio between the target genes and reference genes was calculated using the software tool REST (relative expression software tool) (Pfaffl *et al.*, 2002). Linearity and amplification efficiency were determined for each primer pair. Every RT-qPCR was performed at least in triplicates of two biological independent samples.

Expression and purification of His-tagged *GnbR*, *GnbE*, *GnbF* and *GnbG*

The coding regions of *gnbR*, *gnbE*, *gnbF* and *gnbG* were amplified by PCR using chromosomal DNA from *L. casei* BL23 as template and the primers pairs: 2880BamHIFw/2880HindIIIRv; 2890BamHIFw/2890PstIRv; 2900BamHIFw/2900HindIIIRv and 2910BamHIFw/2910HindIIIRv, respectively, with added restriction sites to the 5' and 3' ends. The PCR fragments were cleaved with the corresponding restriction enzymes and cloned into pQE80 digested with the same enzymes. The resulting plasmids pQEgnbR, pQEgnbE, pQEgnbF and pQEgnbG were used to transform *E. coli* DH10B, and the correct sequence of the inserts was confirmed by DNA sequencing. The proteins expressed from pQEgnbF and pQEgnbG formed inclusion bodies and they could not be obtained in soluble form. Those plasmids were therefore used to transform *E. coli* BE50 carrying the pREPGroES/GroEL plasmid coding for *E. coli* chaperones to improve solubility of recombinant proteins (Dale *et al.*, 1994). One clone of each, PE155 (pQEgnbR), PE157 (pQEgnbE), PE158 (pQEgnbF) and PE159 (pQEgnbG) was grown in 0.5 l Luria-Bertani medium with appropriate antibiotics at 20°C under agitation. When the cultures reach an OD₅₅₀ of 1.0, IPTG (1 mM) was added and incubation was continued for 5 h. Cells were harvested by centrifugation and resuspended in lysis buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, Na₂SO₄ 50 mM, dithiothreitol 0.5 mM and phenylmethylsulphonyl fluoride 1 mM). The suspensions were treated with 1 mg ml⁻¹ lysozyme at room temperature for 30 min. Cells lysates were then sonicated and the cell debris was removed by centrifugation at 12 000 *g* for 20 min at 4°C. The cleared extracts were loaded onto Ni Sepharose 6 Fast Flow columns (HisTrap affinity columns, GE Healthcare) and the proteins were purified using an Äkta Prime FPLC system (GE Healthcare). After washing the columns with buffer A (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM and Na₂SO₄ 50 mM) containing 10 mM imidazole, the proteins were eluted with a 10–500 mM imidazole gradient. Fractions containing the proteins of interest were analysed by SDS-PAGE gels, pooled, dialysed against Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, containing 20% glycerol and kept frozen at –80°C.

Protein concentrations were determined by spectrophotometric measurements at 280 nm in a NanoDrop Instrument (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

GnbG enzyme activity

The activity of the purified His-tagged GnbG enzyme was assayed at 37°C with different 2/4-nitrophenyl(NP)-sugars (Table 1) at 5 mM in 96-well plates. The 2/4-nitrophenol released was measured by following continuous changes in absorbance at 404 nm using a POLARstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany). Reaction mixtures (100 µl) containing the substrate in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, were initiated by adding 1 µg of enzyme. The optimal pH was determined with 5 mM 2-NP-β-D-galactopyranoside using 100 mM phosphate-citrate buffer, (pH 3.0–7.0) and 100 mM glycine-NaOH buffer (pH 7.5–9.5). The optimal temperature reaction was analysed in a range from 20°C to 60°C at the optimal pH. Kinetic studies were performed in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, at 37°C with 2-NP-β-D-galactopyranoside ranging from 0.5 to 7.5 mM.

In order to determine the ability of GnbG to hydrolyse natural oligosaccharides, several substrates were tested (Table 1). The reactions (100 µl) were performed at 37°C for 16 h using 4 mM substrate in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. The reaction mixtures were analysed by HPLC as described above.

GnbF and GnbE enzyme activities

The activity of the purified His-tagged GnbF and His-tagged GnbE enzymes were determined by using both enzymes in coupled reactions as previously described (Leyn *et al.*, 2012) with some modifications. The assay is based in the release of ammonium during the conversion of galactosamine-6P to tagatose-6P by the activity of GnbE. The ammonium is coupled to the oxidation of NADH to NAD⁺ via glutamate dehydrogenase and the disappearance of NADH was measured by following continuous changes in absorbance at 340 nm using a POLARstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany). The reaction mixtures (200 µl) were assayed at 37°C containing 2 mM GalNAC-6P, 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 1 mM α-ketoglutarate, 0.3 mM NADH, 2 units of glutamate dehydrogenase (Fluka), 1 µg of GnbF and 0.5 µg of GnbE. The activity was also assayed with 2 mM GlcNAC-6P as substrate. Control reactions with only GnbF or GnbE were also performed.

Electrophoretic gel mobility shift and DNase I footprinting assays

The upstream region of the *gnbR* gene was amplified by PCR with *L. casei* BL23 chromosomal DNA and two combinations of primers, Pre2880Afor/Pre2880Arev and Pre2880Bfor/Pre2880Brev. The first combination amplified 192 bp DNA fragment closest to the 3' end of the upstream gene (*manA*, LCABL_02870) from *gnbR* and the second pair amplified 172 bp DNA fragment next to the start codon of *gnbR*. Both DNA fragments were used in electrophoretic mobility shift assays with purified His-tagged GnbR. The binding assay was carried

out in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 40 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 10% glycerol) with 0.25 µg of target DNA and different amounts of His-tagged GnbR. The binding mixtures were incubated for 30 min at 37°C and separated on 6% non-denaturing polyacrylamide gels in 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA buffer at 60 V for 1 h. The DNA was stained with ethidium bromide. To perform footprinting assays, two single-end ³²P-labelled DNA probes of the GNB promoter region were synthesized in two PCR reactions respectively. The 172 bp DNA fragment described above was used as template and the oligonucleotides Pre2880Bfor or Pre2880Brev, 5'-labelled with Optikinase (Affymetrix) and [γ -³²P]-ATP, were used as primers with the second unlabelled oligonucleotide Pre2880Brev or Pre2880Bfor respectively. Reaction mixture contained binding buffer, 30 000 dpm of the labelled PCR fragments, 0.5 µg of herring sperm DNA and 20 µg of His-tagged GutR, in a final volume of 25 µl. After incubation for 30 min at 37°C, the DNA was digested with 0.04 U of DNase I (Roche) for 1 min at room temperature. The digestion was stopped by heating the samples for 3 min at 90°C. The reaction mixtures were separated on a 7% sequencing gel. A reference sequence ladder was generated using A+G Maxam and Gilbert reactions (Sambrook *et al.*, 1989) with the same labelled oligonucleotide.

Acknowledgements

This work was financed by funds of the Spanish Ministry for Economy and Competitiveness (MINECO)/FEDER through the Project AGL2010-18696 and of the Valencian Government through project ACOMP/2012/030. G.N.B. was supported by a predoctoral fellowship from the Carolina Foundation and Argentinian Ministry of Education.

References

- Abranches, J., Nascimento, M.M., Zeng, L., Browngardt, C.M., Wen, Z.T., Rivera, M.F., *et al.* (2008) CcpA regulates central metabolism and virulence gene expression in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **190**: 2340–2349.
- Albesharat, R., Ehrmann, M.A., Korakli, M., Yazaji, S., and Vogel, R.F. (2011) Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Syst Appl Microbiol* **34**: 148–155.
- Alcantara, C., Sarmiento-Rubiano, L.A., Monedero, V., Deutscher, J., Perez-Martinez, G., and Yebra, M.J. (2008) Regulation of *Lactobacillus casei* sorbitol utilization genes requires DNA-binding transcriptional activator GutR and the conserved protein GutM. *Appl Environ Microbiol* **74**: 5731–5740.
- Alpert, C.A., and Siebers, U. (1997) The lac operon of *Lactobacillus casei* contains lacT, a gene coding for a protein of the Bg1G family of transcriptional antiterminators. *J Bacteriol* **179**: 1555–1562.
- Altermann, E., Russell, W.M., Azcarate-Peril, M.A., Barrangou, R., Buck, B.L., McAuliffe, O., *et al.* (2005) Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 3906–3912.

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Ashida, H., Yamamoto, K., Murata, T., Usui, T., and Kumagai, H. (2000) Characterization of endo- α -N-acetylgalactosaminidase from *Bacillus* sp. and syntheses of neo-oligosaccharides using its transglycosylation activity. *Arch Biochem Biophys* **373**: 394–400.
- Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E., Goh, Y.J., Tallon, R., Sanozky-Dawes, R.B., Pfeiler, E.A., et al. (2008) Analysis of the genome sequence of *Lactobacillus gasserii* ATCC 33323 reveals the molecular basis of an autochthonous intestinal organism. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4610–4625.
- Bernatchez, S., Szymanski, C.M., Ishiyama, N., Li, J., Jarrell, H.C., Lau, P.C., et al. (2005) A single bifunctional UDP-GlcNAc/Glc 4-epimerase supports the synthesis of three cell surface glycoconjugates in *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* **280**: 4792–4802.
- Bertram, R., Rigali, S., Wood, N., Lulko, A.T., Kuipers, O.P., and Titgemeyer, F. (2011) Regulation of the N-acetylglucosamine utilization regulator NagR in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **193**: 3525–3536.
- Bettenbrock, K., Siebers, U., Ehrenreich, P., and Alpert, C.A. (1999) *Lactobacillus casei* 64H contains a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system for uptake of galactose, as confirmed by analysis of ptsH and different gal mutants. *J Bacteriol* **181**: 225–230.
- Bourand, A., Yebra, M.J., Boel, G., Maze, A., and Deutscher, J. (2013) Utilization of D-ribose by *Lactobacillus casei* BL23 requires a mannose-type phosphotransferase system and three catabolic enzymes. *J Bacteriol* **195**: 2652–2661.
- Braga, T.D., da Silva, G.A., de Lira, P.I., and de Carvalho Lima, M. (2011) Efficacy of *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus casei* oral supplementation on necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight preterm infants: a double-blind, randomized, controlled trial. *Am J Clin Nutr* **93**: 81–86.
- Brinkkotter, A., Kloss, H., Alpert, C., and Lengeler, J.W. (2000) Pathways for the utilization of N-acetyl-galactosamine and galactosamine in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **37**: 125–135.
- Cai, H., Thompson, R., Budinich, M.F., Broadbent, J.R., and Steele, J.L. (2009) Genome sequence and comparative genome analysis of *Lactobacillus casei*: insights into their niche-associated evolution. *Genome Biol Evol* **1**: 239–257.
- Dale, G.E., Schonfeld, H.J., Langen, H., and Stieger, M. (1994) Increased solubility of trimethoprim-resistant type S1 DHFR from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli* cells overproducing the chaperonins GroEL and GroES. *Protein Eng* **7**: 925–931.
- De Bruyn, F., Beauprez, J., Maertens, J., Soetaert, W., and De Mey, M. (2013) Unraveling the Leloir pathway of *Bifidobacterium bifidum*: significance of the uridylyltransferases. *Appl Environ Microbiol* **79**: 7028–7035.
- Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P.W. (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 939–1031.
- Fernandez, L., Langa, S., Martin, V., Jimenez, E., Martin, R., and Rodriguez, J.M. (2013) The microbiota of human milk in healthy women. *Cell Mol Biol (Noisy-Le-Grand)* **59**: 31–42.
- Finne, J., Breimer, M.E., Hansson, G.C., Karlsson, K.A., Leffler, H., Vliegthart, J.F., et al. (1989) Novel polyfucosylated N-linked glycopeptides with blood group A, H, X, and Y determinants from human small intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **264**: 5720–5735.
- Foligne, B., Nutton, S., Granette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poirer, S., et al. (2007) Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* **13**: 236–243.
- Freymond, P.P., Lazarevic, V., Soldo, B., and Karamata, D. (2006) Poly(glucosyl-N-acetylgalactosamine 1-phosphate), a wall teichoic acid of *Bacillus subtilis* 168: its biosynthetic pathway and mode of attachment to peptidoglycan. *Microbiology* **152**: 1709–1718.
- Fushinobu, S. (2010) Unique sugar metabolic pathways of bifidobacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**: 2374–2384.
- Gosalbes, M.J., Monedero, V., Alpert, C.A., and Perez-Martinez, G. (1997) Establishing a model to study the regulation of the lactose operon in *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiol Lett* **148**: 83–89.
- Guerin-Danan, C., Chabanet, C., Pedone, C., Popot, F., Vaissade, P., Bouley, C., et al. (1998) Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. *Am J Clin Nutr* **67**: 111–117.
- Hakomori, S.I. (2008) Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 325–346.
- Hu, D., Zhang, F., Zhang, H., Hao, L., Gong, X., Geng, M., et al. (2014) The beta-galactosidase (BgaC) of the zoonotic pathogen *Streptococcus suis* is a surface protein without the involvement of bacterial virulence. *Sci Rep* **4**: 4140.
- Hu, L., Allison, S.L., and Phillips, A.T. (1989) Identification of multiple repressor recognition sites in the hut system of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **171**: 4189–4195.
- Hu, Z., Patel, I.R., and Mukherjee, A. (2013) Genetic analysis of the roles of *agaA*, *agal*, and *agaS* genes in the N-acetyl-D-galactosamine and D-galactosamine catabolic pathways in *Escherichia coli* strains O157:H7 and C. *BMC Microbiol* **13**: 94.
- Hyeon, J.E., Kang, D.H., Kim, Y.I., You, S.K., and Han, S.O. (2012) GntR-type transcriptional regulator PckR negatively regulates the expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **194**: 2181–2188.
- Jensen, P.H., Kolarich, D., and Packer, N.H. (2010) Mucin-type O-glycosylation—putting the pieces together. *FEBS J* **277**: 81–94.
- Jeong, J.K., Kwon, O., Lee, Y.M., Oh, D.B., Lee, J.M., Kim, S., et al. (2009) Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* BgaC protein as a novel surface beta-galactosidase with specific hydrolysis activity for the Galbeta1-3GlcNAc moiety of oligosaccharides. *J Bacteriol* **191**: 3011–3023.
- King, M.J. (1994) Blood group antigens on human erythrocytes—distribution, structure and possible functions. *Biochim Biophys Acta* **1197**: 15–44.
- Klaffl, S., Brocker, M., Kalinowski, J., Eikmanns, B.J., and

- Bott, M. (2013) Complex regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene *pck* and characterization of its GntR-type regulator lolR as a repressor of myo-inositol utilization genes in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **195**: 4283–4296.
- Kobata, A. (2010) Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **86**: 731–747.
- Landete, J.M., Garcia-Haro, L., Blasco, A., Manzanares, P., Berbegal, C., Monedero, V., *et al.* (2010) Requirement of the *Lactobacillus casei* MaeKR two-component system for L-malic acid utilization via a malic enzyme pathway. *Appl Environ Microbiol* **76**: 84–95.
- Le Coq, D., Lindner, C., Kruger, S., Steinmetz, M., and Stulke, J. (1995) New beta-glucoside (*bgl*) genes in *Bacillus subtilis*: the *bglP* gene product has both transport and regulatory functions similar to those of BglF, its *Escherichia coli* homolog. *J Bacteriol* **177**: 1527–1535.
- Leloup, L., Ehrlich, S.D., Zagorec, M., and Morel-Deville, F. (1997) Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacL* genes. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2117–2123.
- Leyn, S.A., Gao, F., Yang, C., and Rodionov, D.A. (2012) N-acetylgalactosamine utilization pathway and regulon in proteobacteria: genomic reconstruction and experimental characterization in *Shewanella*. *J Biol Chem* **287**: 28047–28056.
- Lin, M.H., Yang, Y.L., Chen, Y.P., Hua, K.F., Lu, C.P., Sheu, F., *et al.* (2011) A novel exopolysaccharide from the biofilm of *Thermus aquaticus* YT-1 induces the immune response through Toll-like receptor 2. *J Biol Chem* **286**: 17736–17745.
- Liu, B., and Newburg, D.S. (2013) Human milk glycoproteins protect infants against human pathogens. *Breastfeed Med* **8**: 354–362.
- Lloyd, K.O., Burchell, J., Kudryashov, V., Yin, B.W., and Taylor-Papadimitriou, J. (1996) Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells. *J Biol Chem* **271**: 33325–33334.
- Martin, R., Langa, S., Reviriego, C., Jimenez, E., Marin, M.L., Xaus, J., *et al.* (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* **143**: 754–758.
- Martin, R., Heilig, G.H., Zoetendal, E.G., Smidt, H., and Rodriguez, J.M. (2007) Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *J Appl Microbiol* **103**: 2638–2644.
- Maze, A., Boel, G., Zuniga, M., Bourand, A., Loux, V., Yebra, M.J., *et al.* (2010) Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *J Bacteriol* **192**: 2647–2648.
- Moran, A.P., Gupta, A., and Joshi, L. (2011) Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut* **60**: 1412–1425.
- Nishimoto, M., and Kitaoka, M. (2007) Identification of N-acetylhexosamine 1-kinase in the complete lacto-N-biose I/galacto-N-biose metabolic pathway in *Bifidobacterium longum*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6444–6449.
- Pedone, C.A., Arnaud, C.C., Postaire, E.R., Bouley, C.F., and Reinert, P. (2000) Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. *Int J Clin Pract* **54**: 568–571.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**: e36.
- Phong, W.Y., Lin, W., Rao, S.P., Dick, T., Alonso, S., and Pethe, K. (2013) Characterization of phosphofructokinase activity in *Mycobacterium tuberculosis* reveals that a functional glycolytic carbon flow is necessary to limit the accumulation of toxic metabolic intermediates under hypoxia. *PLoS ONE* **8**: e56037.
- Posno, M., Leer, R.J., van Luijk, N., van Giezen, M.J., Heuvelmans, P.T., Lokman, B.C., *et al.* (1991) Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1822–1828.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., and Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 543–594.
- Pridmore, R.D., Berger, B., Desiere, F., Vilanova, D., Barretto, C., Pittet, A.C., *et al.* (2004) The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 2512–2517.
- Quail, M.A., Dempsey, C.E., and Guest, J.R. (1994) Identification of a fatty acyl responsive regulator (FarR) in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **356**: 183–187.
- Ray, W.K., and Larson, T.J. (2004) Application of AgaR repressor and dominant repressor variants for verification of a gene cluster involved in N-acetylgalactosamine metabolism in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **51**: 813–826.
- Rigali, S., Derouaux, A., Giannotta, F., and Dusart, J. (2002) Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J Biol Chem* **277**: 12507–12515.
- Rochat, T., Bermudez-Humaran, L., Gratadoux, J.J., Fourage, C., Hoebler, C., Corthier, G., *et al.* (2007) Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microb Cell Fact* **6**: 22.
- Rodriguez-Diaz, J., Rubio-del-Campo, A., and Yebra, M.J. (2012a) *Lactobacillus casei* ferments the N-acetylglucosamine moiety of fucosyl-alpha-1,3-N-acetylglucosamine and excretes L-fucose. *Appl Environ Microbiol* **78**: 4613–4619.
- Rodriguez-Diaz, J., Rubio-Del-Campo, A., and Yebra, M.J. (2012b) Regulatory insights into the production of UDP-N-acetylglucosamine by *Lactobacillus casei*. *Bioengineered* **3**: 339–342.
- van Rooijen, R.J., Dechering, K.J., Niek, C., Wilmlink, J., and de Vos, W.M. (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. *Protein Eng* **6**: 201–206.
- Rubio, R., Jofre, A., Martin, B., Aymerich, T., and Garriga, M. (2014) Characterization of lactic acid bacteria isolated from

- infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiol* **38**: 303–311.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satoh, T., Odamaki, T., Namura, M., Shimizu, T., Iwatsuki, K., Nishimoto, M., *et al.* (2013) *In vitro* comparative evaluation of the impact of lacto-N-biose I, a major building block of human milk oligosaccharides, on the fecal microbiota of infants. *Anaerobe* **19**: 50–57.
- Schöck, F., and Dahl, M.K. (1996) Expression of the tre operon of *Bacillus subtilis* 168 is regulated by the repressor TreR. *J Bacteriol* **178**: 4576–4581.
- Sezonov, G., Possoz, C., Friedmann, A., Pernodet, J.L., and Guerineau, M. (2000) KorSA from the *Streptomyces* integrative element pSAM2 is a central transcriptional repressor: target genes and binding sites. *J Bacteriol* **182**: 1243–1250.
- Swiatek, M.A., Urem, M., Tenconi, E., Rigali, S., and van Wezel, G.P. (2012) Engineering of *N*-acetylglucosamine metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*A3(2) and an unsuspected role of NagA in glucosamine metabolism. *Bioengineered* **3**: 280–285.
- Tallon, R., Bressollier, P., and Urdaci, M.C. (2003) Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res Microbiol* **154**: 705–712.
- Tanaka, Y., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. (2011) Translation efficiency of antiterminator proteins is a determinant for the difference in glucose repression of two beta-glucoside phosphotransferase system gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* R. *J Bacteriol* **193**: 349–357.
- Thurl, S., Munzert, M., Henker, J., Boehm, G., Muller-Werner, B., Jelinek, J., *et al.* (2010) Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *Br J Nutr* **104**: 1261–1271.
- Uehara, T., and Park, J.T. (2004) The *N*-acetyl-D-glucosamine kinase of *Escherichia coli* and its role in murein recycling. *J Bacteriol* **186**: 7273–7279.
- Urashima, T., Fukuda, K., and Messer, M. (2012) Evolution of milk oligosaccharides and lactose: a hypothesis. *Animal* **6**: 369–374.
- Urashima, T., Taufik, E., Fukuda, K., and Asakuma, S. (2013) Recent advances in studies on milk oligosaccharides of cows and other domestic farm animals. *Biosci Biotechnol Biochem* **77**: 455–466.
- Viana, R., Monedero, V., Dossonnet, V., Vadeboncoeur, C., Perez-Martinez, G., and Deutscher, J. (2000) Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Mol Microbiol* **36**: 570–584.
- Wada, J., Ando, T., Kiyohara, M., Ashida, H., Kitaoka, M., Yamaguchi, M., *et al.* (2008) *Bifidobacterium bifidum* lacto-N-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3996–4004.
- Xiao, J.Z., Takahashi, S., Nishimoto, M., Odamaki, T., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., *et al.* (2010) Distribution of *in vitro* fermentation ability of lacto-N-biose I, a major building block of human milk oligosaccharides, in bifidobacterial strains. *Appl Environ Microbiol* **76**: 54–59.
- Yebra, M.J., Monedero, V., Zuniga, M., Deutscher, J., and Perez-Martinez, G. (2006) Molecular analysis of the glucose-specific phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system from *Lactobacillus casei* and its links with the control of sugar metabolism. *Microbiology* **152**: 95–104.
- Yoshida, E., Sakurama, H., Kiyohara, M., Nakajima, M., Kitaoka, M., Ashida, H., *et al.* (2012) *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* uses two different beta-galactosidases for selectively degrading type-1 and type-2 human milk oligosaccharides. *Glycobiology* **22**: 361–368.
- Zeng, L., Choi, S.C., Danko, C.G., Siepel, A., Stanhope, M.J., and Burne, R.A. (2013) Gene regulation by CcpA and catabolite repression explored by RNA-Seq in *Streptococcus mutans*. *PLoS ONE* **8**: e60465.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Anexo 3



The Extracellular Wall-Bound β -*N*-Acetylglucosaminidase from *Lactobacillus casei* Is Involved in the Metabolism of the Human Milk Oligosaccharide Lacto-*N*-Triose

Gonzalo N. Bidart, Jesús Rodríguez-Díaz,* María J. Yebra

Laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos, Departamento de Biotecnología de Alimentos, IATA-CSIC, Valencia, Spain

Human milk oligosaccharides (HMOs) are considered to play a key role in establishing and maintaining the infant gut microbiota. Lacto-*N*-triose forms part of both type 1 and type 2 HMOs and also of the glycan moieties of glycoproteins. Upstream of the previously characterized gene cluster involved in lacto-*N*-biose and galacto-*N*-biose metabolism from *Lactobacillus casei* BL23, there are two genes, *bnaG* and *mana*, encoding a β -*N*-acetylglucosaminidase precursor and a mannose-6-phosphate isomerase, respectively. In this work, we show that *L. casei* is able to grow in the presence of lacto-*N*-triose as a carbon source. Inactivation of *bnaG* abolished the growth of *L. casei* on this oligosaccharide, demonstrating that BnaG is involved in its metabolism. Interestingly, whole cells of a *bnaG* mutant were totally devoid of β -*N*-acetylglucosaminidase activity, suggesting that BnaG is an extracellular wall-attached enzyme. In addition to hydrolyzing lacto-*N*-triose into *N*-acetylglucosamine and lactose, the purified BnaG enzyme also catalyzed the hydrolysis of 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose and 3'-*N*-acetylgalactosaminyl-galactose. *L. casei* can be cultured in the presence of 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose as a carbon source, but, curiously, the *bnaG* mutant strain was not impaired in its utilization. These results indicate that the assimilation of 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose is independent of BnaG. Enzyme activity and growth analysis with a *mana*-knockout mutant showed that ManA is involved in the utilization of the mannose moiety of 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose. Here we describe the physiological role of a β -*N*-acetylglucosaminidase in lactobacilli, and it supports the metabolic adaptation of *L. casei* to the *N*-acetylglucosaminide-rich gut niche.

Glycans in human milk are present as free oligosaccharides or conjugated to proteins and lipids (1, 2), and they have been proposed to directly influence the composition of the infant gut microbiota (3, 4). Furthermore, the free human milk oligosaccharides (HMOs), the third largest solid component in milk, act as prebiotics to promote colonization by beneficial bacterial species (5, 6). HMOs contain a lactose moiety (Gal β 1-4Glc) at their reducing end, which is elongated by β 1,3-linked lacto-*N*-biose units (Gal β 1-3GlcNAc) to give the type 1 HMOs, including lacto-*N*-tetraose (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc), or by β 1,3/6-linked *N*-acetyllactosamine units (Gal β 1-4GlcNAc) to give the type 2 HMOs, such as lacto-*N*-neotetraose (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc). Further elongation of these core structures is made by the addition of fucose and sialic acid residues (1). Both types of HMOs contain a lacto-*N*-triose unit (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc), highlighting the importance of this trisaccharide in the total pool of HMOs. In addition, lacto-*N*-triose and other *N*-acetylhexosaminyl-oligosaccharides also form part of the structure of glycans conjugated to proteins and lipids present in human milk. The carbohydrate moieties of these molecules also have a prebiotic role, and besides the monosaccharides described above for HMOs, they also contain *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) and mannose (2).

Species belonging to the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are found as part of the gastrointestinal microbiota of infants (7–9). Specific *Bifidobacterium* strains are efficient consumers of HMOs (10), which is in agreement with the presence in these strains of a large number of conserved genes with the predicted capacity to hydrolyze those complex glycan structures (11). This is the case for genes encoding enzymes from glycoside hydrolase family 20 (GH20), which comprises lacto-*N*-biosidases (EC 3.2.1.140) and β -*N*-acetylhexosaminidases (EC 3.2.1.52). They

are endoglycosidases, like the lacto-*N*-biosidase from *Bifidobacterium bifidum*, which degrades lacto-*N*-tetraose into lacto-*N*-biose and lactose (12), or exoglycosidases with specificity for β (1-2), β (1-3), β (1-4), and/or β (1-6) glycosidic linkages (13–15). Unlike the case for *Bifidobacterium* species, data about the capacity of *Lactobacillus* species to metabolize human milk and mucosa-associated glycans are limited. The species *Lactobacillus casei* is commonly isolated from the feces of breast-fed infants (7, 8). In this work, we used *L. casei* strain BL23 as a laboratory model because it is easy to manipulate genetically. We have previously characterized three α -*L*-fucosidases from this strain (16) and demonstrated that in the species *L. casei* the utilization of fucosyl- α -1,3-*N*-acetylglucosamine, an abundant structural disaccharide present in human milk glycans, is dependent on the specific α -*L*-fucosidase AlfB (17). Recently, we have identified in *L. casei* BL23 the unique metabolic pathway for both lacto-*N*-biose and galacto-*N*-biose (Gal β 1-3GalNAc). The latter is a core structure in mucin glycans. These disaccharides are transported and phosphorylated by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system

Received 3 September 2015 Accepted 3 November 2015

Accepted manuscript posted online 6 November 2015

Citation Bidart GN, Rodríguez-Díaz J, Yebra MJ. 2016. The extracellular wall-bound β -*N*-acetylglucosaminidase from *Lactobacillus casei* is involved in the metabolism of the human milk oligosaccharide lacto-*N*-triose. *Appl Environ Microbiol* 82:570–577. doi:10.1128/AEM.02888-15.

Editor: C. A. Elkins

Address correspondence to María J. Yebra, yebra@iata.csic.es.

* Present address: Jesús Rodríguez-Díaz, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, Spain.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

TABLE 1 Strains and plasmids used in this study^a

Strain or plasmid	Relevant genotype or description	Source or reference
Strains		
<i>Lactobacillus casei</i>		
BL23	Wild type	CECT 5275
BL126	BL23 <i>ptsI</i>	28
BL380	BL23 <i>bnag</i> (frameshift at SphI site)	This work
BL381	BL23 <i>manA</i> (frameshift at XagI site)	This work
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	F ⁻ <i>endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 φ80dlacZΔM15 araD139 Δ(ara leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ⁻</i>	Invitrogen
BE50	BL21(DE3) containing pREPGroES/GroEL	34
PE168	BE50 containing pQEbnag	This work
PE169	BE50 containing pQEmanA	This work
Plasmids		
pRV300	Suicide vector carrying Erm ^r from pAMβ1	20
pRVbnag	pRV300 with a frameshift at SphI site in <i>bnag</i>	This work
pRVmanA	pRV300 with a frameshift at XagI site in <i>manA</i>	This work
pQE80	<i>E. coli</i> expression vector; Amp ^r	Qiagen
pQEbnag	pQE80 containing <i>bnag</i> coding region	This work
pQEmanA	pQE80 containing <i>manA</i> coding region	This work

^a CECT, Colección Española de Cultivos Tipo; Erm^r, erythromycin resistance; Amp^r, ampicillin resistant.

(PTS), and then they are hydrolyzed into galactose-6-phosphate (galactose-6P) and the corresponding *N*-acetylhexosamine by the intracellular GH35 phospho-β-galactosidase GnbG (18). A gene encoding a GH20 β-*N*-acetylglucosaminidase from *L. casei* ATCC 27092 has also been cloned, and the purified enzyme has been biochemically characterized (19), but natural substrates were not tested and the physiological role of this enzyme was not determined. In this work, we demonstrated that *L. casei* BL23 is able to grow in the presence of lacto-*N*-triose. The chromosomal inactivation of the *bnag* gene, encoding an extracellular β-*N*-acetylglucosaminidase, prevented growth on this carbohydrate, revealing the physiological role of a β-*N*-acetylglucosaminidase from *Lactobacillus*. Additionally, we showed that 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose is also a fermentable carbon source for *L. casei* and that a mutant of *manA*, encoding a mannose-6P isomerase, is involved in its metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, culture conditions, and plasmids. The strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. The *Lactobacillus casei* strains were routinely grown at 37°C under static conditions on MRS medium (Difco). *Escherichia coli*, which was used as the host in cloning experiments, was grown in Luria-Bertani medium at 37°C (Oxoid). The corresponding solid media were prepared by adding 1.8% agar. *E. coli* DH10B transformants were selected with ampicillin (100 μg/ml), and *E. coli* BE50 transformants were selected with ampicillin (100 μg/ml) and kanamycin (25 μg/ml). *L. casei* transformants were selected with erythromycin (5 μg/ml).

Vector pRV300 (20) was used for cloning experiments with *E. coli* and for insertional inactivation of genes in *L. casei*. Vector pQE80 (Qiagen) was used for protein overproduction. *E. coli* and *L. casei* strains were transformed by electroporation with a Gene Pulser apparatus (Bio-Rad Laboratories) as recommended by the manufacturer (*E. coli*) or as described earlier (*L. casei*) (21).

Culture of *L. casei* strains with oligosaccharides. The *L. casei* strains were grown overnight at 37°C under static conditions on sugar-free MRS fermentation medium (18). Overnight cultures were diluted to an optical density (OD) at 550 nm (OD₅₅₀) of 0.05 in 100 μl of MRS medium con-

taining 2 mM lacto-*N*-neotetraose, lacto-*N*-triose, 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose, 3'-*N*-acetylglucosaminyl-galactose, lactose, *N*-acetylglucosamine, or mannose. The first four oligosaccharides were obtained from Carbosynth (Compton, Berkshire, United Kingdom). Bacterial growth was monitored for 24 h by obtaining spectrophotometric measurements at 550 nm every 30 min in 96-well plates at 37°C without shaking in a POLARstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany). At least three independent biological replicates for each growth curve were obtained. Results are expressed as means ± standard deviations. The growth rates (μ) were calculated by using the Gompertz model (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

DNA manipulation and sequencing. Total DNA was isolated from *L. casei* BL23 as described before (21). Recombinant DNA techniques were performed by following standard procedures (22). All PCRs were performed with an Expand high-fidelity PCR system (Roche). DNA sequencing was carried out by the Central Service of Research Support of the University of Valencia (Valencia, Spain). M13 universal and reverse primers or custom primers hybridizing within the appropriate DNA fragments were used for sequencing. Sequence analyses were carried out with dnaman (version 4.03) for Windows (Lynnon Biosoft), and sequence similarities were analyzed with the BLAST program (23).

Construction of recombinant strains. DNA fragments containing part of *bnag* and *manA* were obtained by PCR using *L. casei* BL23 chromosomal DNA and the following oligonucleotide pairs: BnaGFow (5'-AGCTGCTGCTGATAACACC)/BnaGRev (5'-TCGGCTGGGCGAACTAAG) and ManAFow (5'-TTCATAGTGTCACGCAAGG)/ManA Rev (5'-TGAACGTCATGGTGCATC), respectively. The PCR products were cloned into pRV300 that had been digested with EcoRV. The resulting plasmids, pRVbnag and pRVmanA, respectively, were cleaved at the unique SphI and XagI restriction sites present in the *bnag* and *manA* coding regions, respectively. The two digested plasmids were then treated with the Klenow fragment of DNA polymerase I, ligated, and transformed. Different constructs in which a frameshift was introduced at the SphI and XagI sites in *bnag* (pRVbnag) and *manA* (pRVmanA), respectively, were selected. *L. casei* was transformed with each of these plasmids. A single-crossover integrant of each gene was selected based on its resistance to erythromycin. Subsequently, these integrants were grown in MRS medium without erythromycin for about 200 generations. Cells were plated on MRS medium and replica plated on MRS medium plus eryth-

romycin. Antibiotic-sensitive clones were isolated, and among them, we selected one clone for each gene (strains BL380 and BL381) in which a second recombination event led to the excision of the plasmid, leaving a mutated *bnag* copy and a mutated *manA* copy in strains BL380 and BL381, respectively, as was confirmed by sequence analysis of appropriate PCR products.

Oligosaccharide and monosaccharide analysis. To determine the carbohydrates present in the supernatants from the *L. casei* cultures, the cells were removed by centrifugation and the cultures were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a Jasco PU2080Plus system (for *L. casei* cultures on lacto-*N*-neotetraose, lacto-*N*-triose, 3'-*N*-acetylgalactosaminyl-galactose, or lactose) or an ICS3000 chromatographic system (Dionex) (for *L. casei* cultures on 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose or mannose). The PU2080Plus system was coupled to a refractive index detector (Jasco RI-2031 Plus) using a Rezex RCM-monosaccharide column (Phenomenex). The column was kept at 80°C, and the samples were eluted in isocratic mode using water as the mobile phase at a flow rate of 0.6 ml/min. For the Dionex system, a CarboPac PA100 column with pulsed amperometric detection was used. A combined gradient of 100 to 300 mM NaOH and 0 to 300 mM acetic acid was used (100 mM NaOH for 2 min, 100 to 300 mM NaOH for 3 min, 300 mM NaOH and 0 to 300 mM acetic acid for 15 min) at a flow rate of 1 ml/min. Oligo- and monosaccharides were confirmed by comparison of their retention times with those of standards (glucose, galactose, GlcNAc, GalNAc, mannose, fructose, and the di-, tri-, and tetrasaccharides listed in Table 3).

BnaG enzyme activity in whole cells and supernatants of *L. casei* cultures. The *L. casei* strains were grown overnight at 37°C under static conditions on 10 ml of MRS fermentation medium containing 0.5% glucose or 0.5% ribose. When the cultures reached an OD₅₅₀ of 1.5 (glucose) or 1.2 (ribose), cells were collected by centrifugation at 8,000 × *g* for 10 min, and the supernatants were subjected to ultracentrifugation at 100,000 × *g* for 60 min to remove the cell debris. The cell pellets were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in this buffer to an OD₅₅₀ of 2. The BnaG enzyme activity was determined at 37°C with 2.5 mM 4-nitrophenyl (NP)-*N*-acetyl-β-D-glucosaminide (pNPGlcNAc) in 96-well plates. The 4-nitrophenol released was measured by continuously following the changes in the absorbance at 404 nm using a POLARstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany). Reactions with reaction mixtures (100 μl) containing the substrate in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, were initiated by adding 75 μl of cell suspension or culture supernatant.

Expression and purification of His-tagged BnaG and ManA. The coding regions of *bnag* and *manA* were amplified by PCR using chromosomal DNA from *L. casei* BL23 as the template and the primer pairs 2860BamHIFW (5'-TTTGGATC CGCTGATAACACCTTGAAAAGCG)/2860HindIIIRV (5'-TTTTAAGCTTTTACCGGTCT GGATTCACAA TGG) and 2870BamHIFW (5'-TTTTGGATCCTTGACAGAACCAT TATT TTTAAAACC)/2870HindIIIRV (5'-TTTTAAGCTTTTATGCGT ATCCCTGGAGTAG), respectively, to which restriction sites were added to the 5' and 3' ends (underlined). The PCR fragments were cleaved with the corresponding restriction enzymes and cloned into pQE80 digested with the same enzymes. The resulting plasmids, pQEbnag and pQEmanA, respectively, were used to transform *E. coli* BE50, and the correct sequence of the inserts was confirmed by DNA sequencing. One clone of each, PE168 (pQEbnag) and PE169 (pQEmanA), was grown in 0.5 liter Luria-Bertani medium with appropriate antibiotics at 20°C under agitation. When the cultures reach an OD₅₅₀ of 1.0, IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; 1 mM) was added and incubation was continued for 5 h. Cells were harvested by centrifugation and resuspended in lysis buffer (Tris-HCl, 50 mM, pH 7.5; NaCl, 100 mM; Na₂SO₄, 50 mM; dithiothreitol, 0.5 mM; phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM). The recombinant proteins were purified as described previously (18). Fractions containing the proteins of interest were analyzed by SDS-PAGE, pooled, dialyzed against Tris-HCl (100 mM, pH 7.5) containing 20% glycerol, and

kept frozen at -80°C. Protein concentrations were determined from spectrophotometric measurements at 280 nm in a NanoDrop instrument (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

His-tagged BnaG enzyme activity. The activity of the purified His-tagged BnaG enzyme was assayed at 37°C with different 2/4-NP-sugars (see Table 3) at 5 mM in 96-well plates. The 2/4-nitrophenol released was measured by continuously following the changes in the absorbance at 404 nm using a POLARstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany). Reactions with reaction mixtures (100 μl) containing the substrate in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, were initiated by adding 1 μg of enzyme. The optimal pH was determined with 5 mM pNPGlcNAc using 100 mM phosphate-citrate buffer (pH 3.0 to 7.0) and 100 mM glycine-NaOH buffer (pH 7.5 to 9.5). The optimal temperature of the reaction was analyzed by performing the reaction at temperatures ranging from 20 to 60°C and at the optimal pH. Kinetic studies were performed in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, at 37°C with pNPGlcNAc at concentrations ranging from 0.5 to 7.5 mM.

In order to determine the ability of BnaG to hydrolyze natural oligosaccharides, several substrates were tested (see Table 3). The reactions were performed with 100 μl of the reaction mixture at 37°C for 16 h using 4 mM substrate in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. The reaction mixtures were analyzed by HPLC using the Jasco PU2080Plus system as described above.

His-tagged ManA enzyme activity. The activity of the purified His-tagged ManA enzyme was assayed as previously described (24) with some modifications. A typical reaction mixture (100 μl) contained 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 0.5 U of phosphoglucose isomerase, 1.0 U of glucose-6P dehydrogenase, and 3 mM mannose-6P. The reactions were initiated by adding 2 μg of enzyme. The activity was assayed at 37°C in 96-well plates, and the NADPH formation was monitored by continuously following the changes in the absorbance at 340 nm using the POLARstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany). Kinetic studies were performed with mannose-6P at concentrations ranging from 1.0 to 10 mM.

Nucleotide sequence accession numbers. The sequences of the truncated genes were deposited in GenBank under accession numbers KT954009 and KT954010.

RESULTS AND DISCUSSION

***L. casei* β-N-acetylglucosaminidase BnaG is an extracellular wall-attached protein.** Analysis of the genome surroundings of the *gnb* operon, which is involved in the utilization of lacto-*N*-biose and galacto-*N*-biose in *L. casei* BL23 (18), revealed the presence of two genes, one named *bnag* (LCABL_02860) and one named *manA* (LCABL_02870) here, that are annotated as a putative β-*N*-acetylglucosaminidase precursor and a putative mannose-6P isomerase, respectively (Fig. 1A). The deduced amino acid sequence of *bnag* showed a conserved protein domain, GH20_DspB_LnbB-like (cd06564), from amino acids 38 to 377 (25). Sequence analysis using the SignalP (version 4.0) program (<http://www.cbs.dtu.dk>) additionally showed that BnaG displayed an N-terminal signal peptide for secretion (amino acids 1 to 32), and a predicted C-terminal sortase-dependent cell wall-anchoring domain (amino acids 533 to 569) was already described (26). In order to determine if the *bnag* gene was responsible of the β-*N*-acetylglucosaminidase activity in whole cells of *L. casei* BL23 (26), a mutant with a mutation in *bnag* was constructed (strain BL380). The results showed that in the wild type the activity was higher in cells grown in ribose than in cells grown in glucose (Table 2), confirming the findings of previous studies that showed that the β-*N*-acetylglucosaminidase activity in *L. casei* was subjected to catabolic repression by glucose (27). β-*N*-Acetylglucosaminidase activity was also found in the supernatants of strain

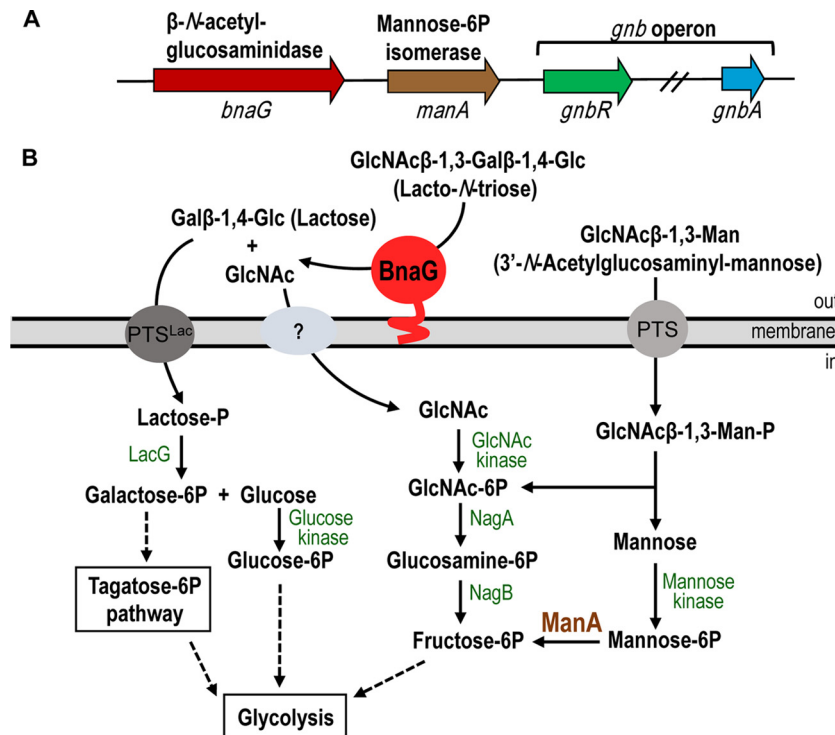


FIG 1 (A) Schematic presentation of the 11.2-kbp *Lactobacillus casei* BL23 DNA fragment containing the β-*N*-acetylglucosaminidase precursor and a mannose-6P isomerase in the surroundings of the galacto-*N*-biose (*gnb*) operon (18). The first (*gnbR*) and last (*gnbA*) genes of this operon are represented. (B) Schematic presentation of proposed pathways for lacto-*N*-triose and 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose metabolism in *L. casei* BL23. PTS, phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; Gal, galactose; Man, mannose; LacG, phospho-β-galactosidase; NagA, *N*-acetylglucosamine-6P deaminase; NagB, glucosamine-6P deaminase.

BL23 (Table 2), suggesting that part of the enzyme is liberated into the culture medium as a free enzyme. Interestingly, whole cells and supernatants of the BL380 mutant were totally devoid of activity (Table 2), indicating that the *bnaG* gene is responsible for the β-*N*-acetylglucosaminidase activity present in *L. casei*.

Substrate specificity and enzymatic characteristics of *L. casei* β-*N*-acetylglucosaminidase BnaG. The His-tagged β-*N*-acetylglucosaminidase BnaG from *L. casei* without the N-terminal signal peptide and the C-terminal cell wall-anchoring domain was expressed in *E. coli*. The purified protein showed a molecular mass of 55 kDa, in agreement with the calculated mass of the 6×His-

tagged protein (55,250 Da; Fig. 2). The recombinant BnaG hydrolyzed *p*NPGlcNAc and 2-NP-β-D-galactopyranoside; however, the latter was poorly hydrolyzed (Table 3). The catalytic properties of BnaG using *p*NPGlcNAc as the substrate were determined (Table 3). Although the deduced amino acid sequences of BnaG and the *N*-acetylglucosaminidase from *L. casei* ATCC 27092 (19) showed a high degree of homology (91.7% identity), the K_m , op-

TABLE 2 *N*-Acetylglucosaminidase activity in whole cells and supernatants of *L. casei* cultured in MRS fermentation medium with glucose or ribose^a

Strain	<i>N</i> -Acetylglucosaminidase activity ^b (nmol/min/OD unit) in medium with:	
	Glucose	Ribose
Whole cells		
BL23 (wild type)	0.223 ± 0.015	2.962 ± 0.011
BL380 (<i>bnaG</i>)	0.0 ± 0.013	0.0 ± 0.015
Supernatants		
BL23 (wild type)	0.247 ± 0.003	0.934 ± 0.075
BL380 (<i>bnaG</i>)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

^a *N*-Acetylglucosaminidase activity was determined with 4-nitrophenyl-β-D-glucosaminide as the substrate.

^b Each value represents the mean of four different measurements ± standard deviation.

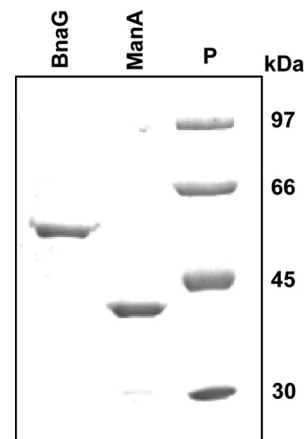


FIG 2 Coomassie brilliant blue-stained 10% SDS-polyacrylamide gel showing the His-tagged proteins β-*N*-acetylglucosaminidase BnaG and mannose-6P isomerase ManA. Lane P, protein standards. The numbers on the right are molecular masses.

TABLE 3 Activity and characterization of enzyme BnaG^c

Substrate ^a (structure)	Activity ^b
4-NP- <i>N</i> -acetyl- β -D-glucosaminide	+
2-NP- β -D-galactopyranoside	+/-
4-NP- β -D-glucopyranoside	-
2-NP-1-thio- β -D-galactopyranoside	-
4-NP- β -D-glucuronide	-
4-NP- α -D-glucopyranoside	-
4-NP- α -D-galactopyranoside	-
4-NP- α -L-fucopyranoside	-
Lacto- <i>N</i> -triose (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)	+
3'- <i>N</i> -Acetylglucosaminyl-Man (GlcNAc β 1-3Man)	+
3'- <i>N</i> -Acetylgalactosaminyl-Gal (GalNAc β 1-3Gal)	+
Galacto- <i>N</i> -biose (Gal β 1-3GalNAc)	+/-
Lacto- <i>N</i> -biose (Gal β 1-3GlcNAc)	+/-
Lacto- <i>N</i> -tetraose (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)	-
Lacto- <i>N</i> -neotetraose (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)	-
6'-Galactopyranosyl-GlcNAc (Gal β 1-6GlcNAc)	-
4'-Mannopyranosyl-GlcNAc (Man β 1-4GlcNAc)	-
4'-Galactofuranosyl-GlcNAc (Gal β 1-4GlcNAc)	-
Lactose (Gal β 1-4Glc)	-
<i>N</i> -Acetyllactosamine (Gal β 1-4GlcNAc)	-
Lactulose (Gal β 1-4Fru)	-
Maltose (Glc α 1-4Glc)	-
Maltotriose (Glc α 1-4Glc α 1-4Glc)	-

^a Carbohydrates used as the substrates. NP, nitrophenyl; Glc, glucose; Gal, galactose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; Man, mannose; Fru, fructose.

^b +, the substrate was totally hydrolyzed after a 16-h reaction under the conditions described in the Materials and Methods section; +/-, the substrate was partially hydrolyzed after a 16-h reaction under the conditions described in the Materials and Methods section; -, no activity was detected.

^c The enzyme activity was determined with 4-nitrophenyl- β -D-glucosaminide as the substrate. V_{max} was 33.3 μ mol/mg protein/min, K_m was 2.3 mM, the optimal pH was 6.5, and the optimal temperature was 53°C.

timum pH, and optimum temperature were different. The K_m (6.4 μ M) of the enzyme from the ATCC 27092 strain showed that the affinity for the substrate pNPGlcNAc was about 350-fold higher than that of BnaG. The modifications of the sequence described above for the purified BnaG could account for those differences between the two β -*N*-acetylglucosaminidases. Indeed, the enzyme from the ATCC 27092 strain showed a molecular mass (39 kDa) (19) lower than that determined for BnaG. Regarding natural oligosaccharides, BnaG is able to degrade lacto-*N*-triose into GlcNAc and lactose. However, it does not hydrolyze lacto-*N*-tetraose or lacto-*N*-neotetraose, which contain the same GlcNAc β 1,3-glycosidic linkage, indicating that BnaG showed exoglycosidase activity but not endoglycosidase activity. BnaG also degrades the disaccharides 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose, 3'-*N*-acetylgalactosaminyl-galactose, galacto-*N*-biose, and lacto-*N*-biose, although the last two were cleaved very inefficiently (Table 3). These results indicate that the β -*N*-acetylglucosaminidase BnaG from *L. casei* showed specificity for β 1,3-glycosidic linkages, and within these, *N*-acetylhexosaminyl- β 1,3-linked sugars are better substrates than their corresponding hexoses.

***L. casei* ferments lacto-*N*-triose and hydrolyzes it by using the β -*N*-acetylglucosaminidase BnaG.** In order to determine the capacity of *L. casei* BL23 to metabolize lacto-*N*-triose, 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose, and 3'-*N*-acetylgalactosaminyl-galactose, which were substrates *in vitro* for the β -*N*-acetylglucosaminidase BnaG, the growth profile in MRS basal medium

supplemented with 2 mM those oligosaccharides was determined independently. *L. casei* BL23 was able to grow in the presence of lacto-*N*-triose and 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose as fermentable carbon sources (Fig. 3A). However, the presence of 3'-*N*-acetylgalactosaminyl-galactose resulted in diminished growth compared with the residual growth of *L. casei* in nonsupplemented MRS basal medium (Fig. 3A). The growth pattern of *L. casei* in the presence of lactose as a positive control is also shown (Fig. 3A). To determine if the β -*N*-acetylglucosaminidase BnaG was involved in the utilization of lacto-*N*-triose and 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose in *L. casei* BL23, the mutant strain BL380 (*bnaG*) was cultured in the presence of those oligosaccharides as carbon sources. Interestingly, this mutant exhibited diminished growth with lacto-*N*-triose which was comparable to that of the negative control (with nonsupplemented MRS basal medium), indicating that BnaG is necessary for the utilization of this oligo-

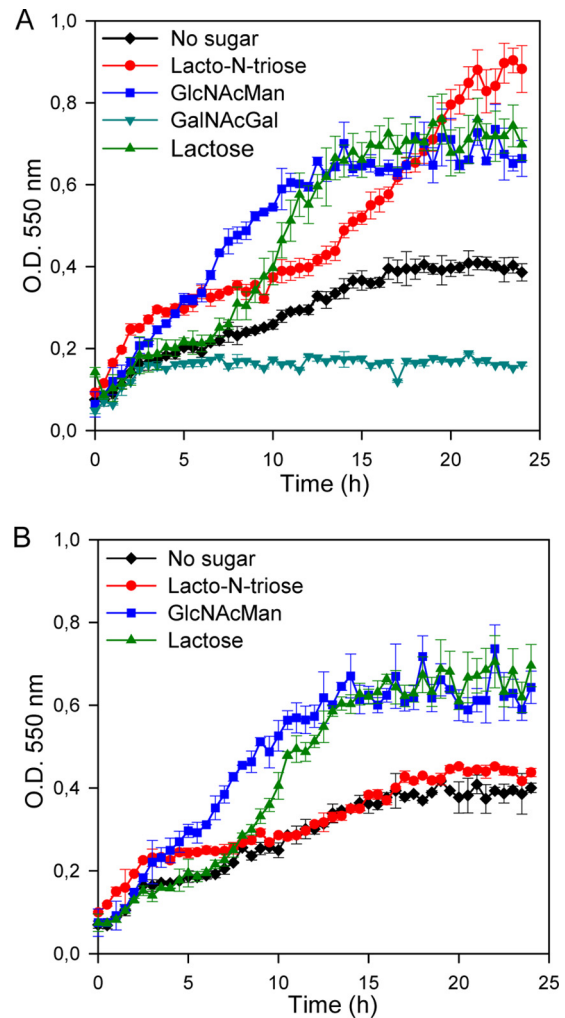


FIG 3 (A) Growth curves of *Lactobacillus casei* wild-type strain BL23 on MRS basal medium without a carbon source (black) or with lacto-*N*-triose (red), 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose (blue), 3'-*N*-acetylgalactosaminyl-galactose (dark cyan), or lactose (green). (B) Growth curves of *L. casei* mutant strain BL380 (*bnaG*) on MRS basal medium without a carbon source (black) or with lacto-*N*-triose (red), 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose (blue), or lactose (green). The data presented are mean values based on at least three replicates. Error bars indicate standard deviations.

saccharide (Fig. 3B). Sugar content analysis of the culture supernatants detected lacto-*N*-triose in the supernatants from BL380 (*bn*aG), while it was completely consumed by the wild-type BL23 strain. In the wild-type strain, the resulting products (GlcNAc and lactose) from the lacto-*N*-triose hydrolysis by BnaG were also exhausted. The results presented above suggest that BnaG is an extracellular enzyme and that it would then hydrolyze lacto-*N*-triose from outside the cells into GlcNAc and lactose. GlcNAc would then be transported inside the cells by a yet unknown PTS and/or a PTS-independent permease (28). The lactose moiety would be internalized by the already characterized PTS^{Lac} into the cells as lactose-6P, and this phosphorylated sugar would be degraded by the phospho- β -galactosidase LacG into galactose-6P and glucose (29) (Fig. 1B). Although 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose is an *in vitro* substrate for BnaG, the results showed that the growth rate (0.120 h⁻¹) of BL380 (*bn*aG) is similar to the rate of the wild type (0.113 h⁻¹) (Fig. 3B), suggesting that its metabolism is independent of that of glycosidase. Sugar content analysis of the culture supernatants did not detect 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose in either BL23 or BL380 culture supernatants.

The metabolism of lacto-*N*-triose resulting from the catabolism of lacto-*N*-neotetraose has been previously reported in *B. bifidum* (13). This tetrasaccharide was sequentially hydrolyzed from its nonreducing terminus by two extracellular exoenzymes with β -galactosidase and β -*N*-acetylglucosaminidase activity, respectively (13). *L. casei* was able to grow in the presence of lacto-*N*-triose, whereas it was not able to ferment lacto-*N*-neotetraose (data not shown), suggesting that this strain lacks a β -galactosidase activity able to convert the tetrasaccharide into galactose and lacto-*N*-triose, at least under our experimental conditions. Analysis of the available genome sequences of lactobacilli (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>) showed that the *bn*aG gene was present only in the species *L. casei* and *Lactobacillus paracasei*. Notably, it was not conserved in the phylogenetically related species *Lactobacillus rhamnosus*. The lack of a *bn*aG gene in the latter species correlated with the inability of two strains of *L. rhamnosus* (strains ATCC 9595 and ATCC 53103 [*L. rhamnosus* GG]) to metabolize lacto-*N*-triose. However, *L. rhamnosus* strain HN001 was able to grow using lacto-*N*-triose as a carbon source (G. N. Bidart, J. Rodríguez-Díaz and M. J. Yebra, unpublished results), suggesting that, in addition to BnaG, lactobacilli have other enzymes involved in the catabolism of this trisaccharide.

ManA is required for mannose and 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose metabolism in *L. casei*. As shown above, 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose was a carbon source for *L. casei* BL23, and a mutant deficient in the general component enzyme I of the PTS (28) was unable to ferment that disaccharide, which remained nonhydrolyzed in the culture supernatant (data not shown). These results suggest that 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose is transported and phosphorylated by the PTS and it might be hydrolyzed inside the cells by a yet unknown phospho- β -glycosidase (Fig. 1B). The PTS phosphorylates the incoming disaccharides at the nonreducing end (18, 29); therefore, the intracellular products generated from 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose would probably be GlcNAc-P and mannose. We analyzed if the *man*A gene was involved in the metabolism of that disaccharide. The deduced amino acid sequence of *man*A showed 53% and 48% identity with the sequences of the characterized type I mannose-6P isomerases (EC.5.3.1.8) from *Streptococcus mutans* (30) and *Bacillus subtilis* (31), respectively. The *man*A gene from *L.*

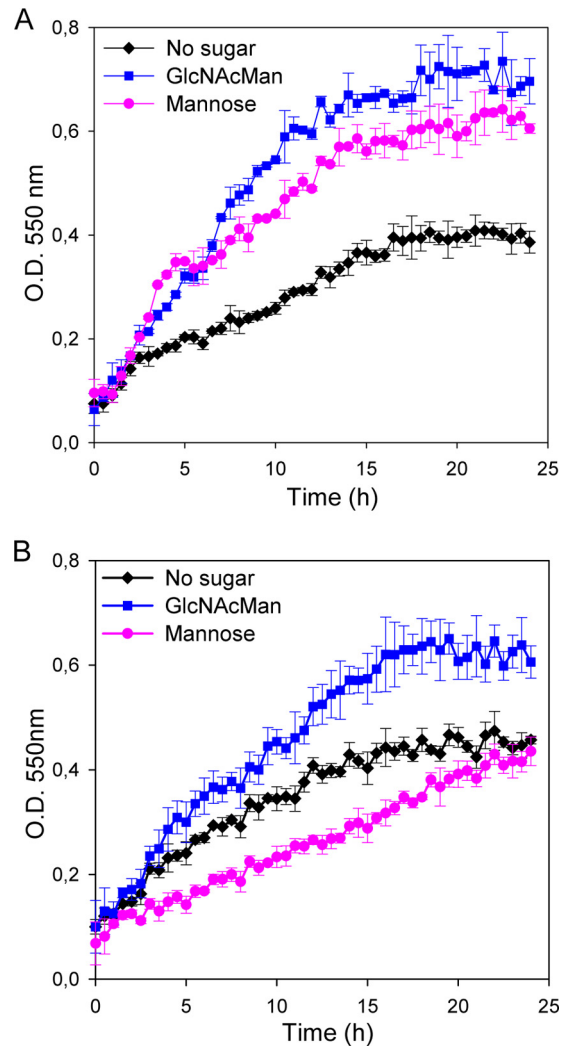


FIG 4 Growth curves of *Lactobacillus casei* wild-type strain BL23 (A) and *L. casei* mutant strain BL381 (*man*A) (B) on MRS basal medium without a carbon source (black) or with 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose (blue) or mannose (pink). Data are presented as mean values based on at least three replicates. Error bars indicate standard deviations.

casei BL23 codes for a 323-amino-acid protein without a signal peptide or a cell wall-anchoring motif, and it was expressed in *E. coli*. The purified His-tagged protein showed a molecular mass of 37 kDa, in agreement with the calculated mass of the 6 \times His-tagged protein (36,815 Da; Fig. 2). ManA activity was analyzed by following the conversion of mannose-6P into fructose-6P, and it exhibited a V_{\max} of 1.11 μ mol/mg protein/min and a K_m of 2.78 mM. This and the results presented below also suggest that the mannose resulting from the hydrolysis of 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose would be phosphorylated by a mannose kinase at the C-6 position. Mannose-6P would be converted into the glycolytic intermediate fructose-6P by ManA (Fig. 1B).

To determine if the mannose-6P isomerase ManA was involved in the utilization of 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose in *L. casei* BL23, a mutant with a mutation in *man*A was constructed (strain BL381). Interestingly, this mutant showed a growth rate (0.064 h⁻¹) lower than that of the wild-type strain BL23 (0.113 h⁻¹) with that disaccharide as the carbon source in the culture

medium (Fig. 4), indicating that *manA* is involved in the utilization of 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose. However, mannose was not detected in the culture supernatants from BL381, which is in agreement with the fact that the maximum cell density reached by this strain was similar to that of the wild-type strain BL23. The rate of growth of strain BL381 (*manA*) with mannose as the carbon source was lower (0.026 h^{-1}) than that of the negative control grown on nonsupplemented MRS basal medium (0.038 h^{-1}) (Fig. 4B), indicating that ManA is necessary for the utilization of mannose in *L. casei*. Curiously, after 24 h the culture reached an OD similar to that of the control, which indicates that the growth of strain BL381 was recovering. These results and the growth profile of strain BL381 in the presence of 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose suggested that additional genes involved in the metabolism of the mannose might be expressed. Using the deduced amino acid sequence of ManA in BLAST searches against the *L. casei* BL23 genome (32), another mannose-6P isomerase (LCABL_06290) was found. It showed 47% homology (30% identity) with the ManA characterized here. Hence, the catabolism of 3'-*N*-acetylglucosaminyl-mannose in the *manA* mutant might depend on this additional mannose-6P isomerase being able to utilize the mannose-6P generated.

The species *Lactobacillus casei* is associated with the infant and adult human gastrointestinal tract, and some strains are considered beneficial for the host (7, 8, 33). The establishment of this species in the gut and its interaction with the host rely on its nutritional capacities. The extracellular localization of the β -*N*-acetylglucosaminidase studied here and its activity on human milk and mucosa-linked glycans probably constitute a molecular strategy that these bacteria use to survive in the gut.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed by funds of the Spanish Ministry for Economy and Competitiveness (MINECO)/FEDER through projects AGL2014-52996-C2 (1-R and 2-R) and of the Valencian government through project ACOMP/2012/030. G.N.B. was supported by a predoctoral fellowship from the Carolina Foundation and Argentinian Ministry of Education.

REFERENCES

- Bode L. 2012. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 22:1147–1162. <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cws074>.
- Garrido D, Dallas DC, Mills DA. 2013. Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: mechanisms and implications. *Microbiology* 159:649–664. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.064113-0>.
- Wang M, Li M, Wu S, Lebrilla CB, Chapkin RS, Ivanov I, Donovan SM. 2015. Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 60:825–833. <http://dx.doi.org/10.1097/MPG.0000000000000752>.
- De Leoz ML, Kalanetra KM, Bokulich NA, Strum JS, Underwood MA, German JB, Mills DA, Lebrilla CB. 2015. Human milk glycomics and gut microbial genomics in infant feces show a correlation between human milk oligosaccharides and gut microbiota: a proof-of-concept study. *J Proteome Res* 14:491–502. <http://dx.doi.org/10.1021/pr500759e>.
- Yu ZT, Chen C, Kling DE, Liu B, McCoy JM, Merighi M, Heidtman M, Newburg DS. 2013. The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology* 23:169–177. <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cws138>.
- Li M, Monaco MH, Wang M, Comstock SS, Kuhlenschmidt TB, Fahey GC, Jr, Miller MJ, Kuhlenschmidt MS, Donovan SM. 2014. Human milk oligosaccharides shorten rotavirus-induced diarrhea and modulate piglet mucosal immunity and colonic microbiota. *ISME J* 8:1609–1620. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2014.10>.
- Martin R, Heilig GH, Zoetendal EG, Smidt H, Rodriguez JM. 2007. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *J Appl Microbiol* 103:2638–2644. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03497.x>.
- Albesharat R, Ehrmann MA, Korakli M, Yazaji S, Vogel RF. 2011. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Syst Appl Microbiol* 34:148–155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2010.12.001>.
- Turroni F, Peano C, Pass DA, Foroni E, Severgnini M, Claesson MJ, Kerr C, Hourihane J, Murray D, Fuligni F, Gueimonde M, Margolles A, De Bellis G, O'Toole PW, van Sinderen D, Marchesi JR, Ventura M. 2012. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS One* 7:e36957. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0036957>.
- Locascio RG, Ninonuevo MR, Kronewitter SR, Freeman SL, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. 2009. A versatile and scalable strategy for glycoprofiling bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides. *Microb Biotechnol* 2:333–342. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00072.x>.
- LoCascio RG, Desai P, Sela DA, Weimer B, Mills DA. 2010. Broad conservation of milk utilization genes in *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* as revealed by comparative genomic hybridization. *Appl Environ Microbiol* 76:7373–7381. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00675-10>.
- Wada J, Ando T, Kiyohara M, Ashida H, Kitaoka M, Yamaguchi M, Kumagai H, Katayama T, Yamamoto K. 2008. *Bifidobacterium bifidum* lacto-*N*-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Appl Environ Microbiol* 74:3996–4004. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00149-08>.
- Miwa M, Horimoto T, Kiyohara M, Katayama T, Kitaoka M, Ashida H, Yamamoto K. 2010. Cooperation of beta-galactosidase and beta-*N*-acetylhexosaminidase from bifidobacteria in assimilation of human milk oligosaccharides with type 2 structure. *Glycobiology* 20:1402–1409. <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwq101>.
- Jiang YL, Yu WL, Zhang JW, Frolet C, Di Guilmi AM, Zhou CZ, Vernet T, Chen Y. 2011. Structural basis for the substrate specificity of a novel beta-*N*-acetylhexosaminidase StrH protein from *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Biol Chem* 286:43004–43012. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.256578>.
- Thi NN, Offen WA, Shareck F, Davies GJ, Doucet N. 2014. Structure and activity of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) beta-*N*-acetylhexosaminidase provides further insight into GH20 family catalysis and inhibition. *Biochemistry* 53:1789–1800. <http://dx.doi.org/10.1021/bi401697j>.
- Rodriguez-Diaz J, Monedero V, Yebra MJ. 2011. Utilization of natural fucosylated oligosaccharides by three novel alpha-L-fucosidases from a probiotic *Lactobacillus casei* strain. *Appl Environ Microbiol* 77:703–705. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01906-10>.
- Rodriguez-Diaz J, Rubio-del-Campo A, Yebra MJ. 2012. *Lactobacillus casei* ferments the *N*-acetylglucosamine moiety of fucosyl-alpha-1,3-*N*-acetylglucosamine and excretes L-fucose. *Appl Environ Microbiol* 78:4613–4619. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00474-12>.
- Bidart GN, Rodriguez-Diaz J, Monedero V, Yebra MJ. 2014. A unique gene cluster for the utilization of the mucosal and human milk-associated glycans galacto-*N*-biose and lacto-*N*-biose in *Lactobacillus casei*. *Mol Microbiol* 93:521–538. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12678>.
- Senba M, Kashige N, Nakashima Y, Miake F, Watanabe K. 2000. Cloning of the gene of beta-*N*-acetylglucosaminidase from *Lactobacillus casei* ATCC 27092 and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Biol Pharm Bull* 23:527–531. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.23.527>.
- Leloup L, Ehrlich SD, Zagorec M, Morel-Deville F. 1997. Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacL* genes. *Appl Environ Microbiol* 63:2117–2123.
- Posno M, Leer RJ, van Luijk N, van Giezen MJ, Heuvelmans PT, Lokman BC, Pouwels PH. 1991. Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. *Appl Environ Microbiol* 57:1822–1828.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Gill JF, Deretic V, Chakrabarty AM. 1986. Overproduction and assay of

- Pseudomonas aeruginosa* phosphomannose isomerase. J Bacteriol 167: 611–615.
25. Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Bryant SH. 2015. CDD: NCBI's Conserved Domain Database. Nucleic Acids Res 43:D222–D226. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku1221>.
 26. Munoz-Provencio D, Rodriguez-Diaz J, Collado MC, Langella P, Bermudez-Humaran LG, Monedero V. 2012. Functional analysis of the *Lactobacillus casei* BL23 sortases. Appl Environ Microbiol 78:8684–8693. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02287-12>.
 27. Monedero V, Gosalbes MJ, Perez-Martinez G. 1997. Catabolite repression in *Lactobacillus casei* ATCC 393 is mediated by CcpA. J Bacteriol 179:6657–6664.
 28. Viana R, Monedero V, Dossonnet V, Vadeboncoeur C, Perez-Martinez G, Deutscher J. 2000. Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. Mol Microbiol 36:570–584.
 29. Gosalbes MJ, Monedero V, Alpert CA, Perez-Martinez G. 1997. Establishing a model to study the regulation of the lactose operon in *Lactobacillus casei*. FEMS Microbiol Lett 148:83–89. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10271.x>.
 30. Sato Y, Yamamoto Y, Kizaki H, Kuramitsu HK. 1993. Isolation and sequence analysis of the *pmi* gene encoding phosphomannose isomerase of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett 114:61–66. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06551.x>.
 31. Yeom SJ, Ji JH, Kim NH, Park CS, Oh DK. 2009. Substrate specificity of a mannose-6-phosphate isomerase from *Bacillus subtilis* and its application in the production of L-ribose. Appl Environ Microbiol 75:4705–4710. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00310-09>.
 32. Maze A, Boel G, Zuniga M, Bourand A, Loux V, Yebra MJ, Monedero V, Correia K, Jacques N, Beaufils S, Poncet S, Joyet P, Milohanic E, Casaregola S, Auffray Y, Perez-Martinez G, Gibrat JF, Zagorec M, Francke C, Hartke A, Deutscher J. 2010. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. J Bacteriol 192:2647–2648. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00076-10>.
 33. Turrone F, Ventura M, Butto LF, Duranti S, O'Toole PW, Motherway MO, van Sinderen D. 2014. Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective. Cell Mol Life Sci 71:183–203. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-013-1318-0>.
 34. Dale GE, Schonfeld HJ, Langen H, Stieger M. 1994. Increased solubility of trimethoprim-resistant type S1 DHFR from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli* cells overproducing the chaperonins GroEL and GroES. Protein Eng 7:925–931. <http://dx.doi.org/10.1093/protein/7.7.925>.