Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Biosíntesis de glucanos Beta 1-2 cíclicos en Rhizobiaceae

Zorreguieta, Angeles

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Zorreguieta, Angeles. (1988). Biosíntesis de glucanos Beta 1-2 cíclicos en Rhizobiaceae. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2110_Zorreguieta.pdf

Cita tipo Chicago:
Zorreguieta, Angeles. "Biosíntesis de glucanos Beta 1-2 cíclicos en Rhizobiaceae". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2110_Zorreguieta.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"BIOSINTESIS DE GLUCANOS β1-2 CICLICOS EN Rhizobiaceae"

Autor: Angeles Zorreguieta

Director: Luis Federico Leloir

Co-director: Rodolfo Augusto Ugalde

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas
"Fundación Campomar"

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

2110
Ej. 2.

Año 1988

a Fernando

a Sebastián y Facundo

a la memoria del Pirc.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis F. Leloir, director de esta tesis, por haberme brindado la posibilidad de trabajar en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas y conocer el mundo de la ciencia. Por transmitirme su curiosidad, entusiasmo y optimismo. Por su constante apoyo y por las gratísimas charlas que tuvimos.

Al Dr. Rodolfo A. Ugalde, codirector de esta Tesis, por su incansable entusiasmo, el aporte constante de ideas y proyectos, por sus prácticas enseñanzas y por escuchar atentamente mis propuestas.

A los miembros del Comité Directivo por permitirme realizar el presente trabajo de investigación en el mencionado instituto.

A los Dres. Roberto J. Staneloni y Marcelo E. Tolmasky, junto a quienes me inicié en la investigación bioquímica, por todas sus enseñanzas y útiles consejos.

A mis compañeros de laboratorio y amigos -Antonio Coira, Sonia Cavaignac, Roberto Geremía y Nora Iñón- por los momentos tan agradables y divertidos que compartimos en nuestro lugar de trabajo.

A los Dres. Armando Parodi, Ricardo Wolosiuk, Marcelo Dankert, Clara Krisman y Juana Tandecarz, por mantener diálogos abiertos y sinceros y por los valiosos consejos que me dieron durante estos años.

A mis amigos Mariana Stein, Marcelo Tolmasky, Viviana Lepek, Margarita Bosch, Diana Tolmasky, Daniel Boscoboinik, Cecilia Hertig, Gerardo Lederkremer, Roxana Chamorro, Patricia Marini, Olga Castro, Marta Bravo, Manuel Hidekel, Angel Cataldi y Marcela Ferrer, quienes con su amistad y su afecto hicieron que todo resultara más fácil.

Al Dr. Manuel García Patrone y a Alejandra Raymondi por su colaboración en la realización de algunos experimentos.

A Norberto Malarini por su esmero en la realización de las figuras que se presentan en esta tesis.

A Irene Cangiano y Maria Dolores Turró por su disposición y eficiencia en la transcripción de esta tesis.

A Margarita Mazardi y Soledad Giménez por la colaboración proporcionada durante estos años.

Finalmente, quisiera agradecer a mis padres, quienes me dieron el impulso inicial.

Parte de los resultados descriptos en el presente trabajo de Tesis ha sido publicada en los siguientes artículos:

-"The enzymatic synthesis of β1-2 glucans".
Zorreguieta, A., Tolmasky, M.E. and Staneloni, R.J.
(1985) Arch. Biochem. Biophys. 238, 368-372.

-"An intermediate in cyclic β1-2 glucan biosynthesis".
Zorreguieta, A., Ugalde, R.A. and Leloir, L.F.
(1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 126, 352-357.

-"Formation in Rhizobium and Agrobacterium spp. of a 235-kilodalton protein intermediate in β-D(1-2) glucan synthesis".
Zorreguieta, A. and Ugalde, R.A.
(1986) J. Bacteriol. 167, 947-951.

ABREVIATURAS

A.	Agrobacterium
ATP	5' adenosina trifosfato
Ci	Curie
cpm	Cuentas por minuto
DEAE-celulosa	Dietilaminoetil-celulosa
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
EPS	Exopolisacárido
G.P.	Grado de polimerización
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolisacárido
MDO	Oligosacáridos derivados de membrana
NAD	Nicotinamida, adenina dinucleótido (forma oxidada)
R.	Rhizobium
R.g.	Relación de movilidad de un compuesto respecto a la glucosa
SDS	Sodio dodecil sulfato
TCA	Acido tricloroacético
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
UDP	5' uridina difosfato
UDP-Glc	5' uridina difosfato-glucosa
UMP	5' uridina monofosfato
V	Voltio

INDICE

	Pag.
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
I.1. Formación del tumor por Agrobacterium	2
I.1.a. Plásmido Ti	3
I.1.b. Genes cromosomales requeridos para la virulencia	4
I.1.c. Unión de Agrobacterium a la planta	8
I.2. Infección de las leguminosas por Rhizobium	12
I.2.a. Ubicación de los genes requeridos para la simbiosis	14
I.2.b. Unión de Rhizobium a la célula de la planta	20
I.3. Polisacáridos producidos por Rhizobium y Agrobacterium	23
I.3.a. Exopolisacáridos	23
I.3.b. Glucanos β1-2	30
I.3.c. Glucanos β1-3	37
I.3.d. Glucanos α1-4 y glucanos β1-4	38
I.3.e. Lipopolisacáridos	39
I.3.f. Polisacárido tipo ácido teicurónico	42
I.3.g. Otros oligosacáridos	44
I.4. Ciclodextrinas	45

I.5. Comentario sobre la biosíntesis de polisacáridos en otros sistemas 47

I.5. Objetivos de esta tesis 50

II. MATERIALES Y METODOS 51

II.1. Organismos utilizados 51

II.2. Condiciones de cultivo 51

II.3. Preparaciones enzimáticas 52

II.3.a. Células permeabilizadas 52

II.3.b. Membranas internas 52

II.4. Aislamiento del glucano β1-2 de las células 53

II.5. Medición de la actividad enzimática 54

II.5.a. Células permeabilizadas 54

II.5.b. Membranas internas 54

II.6. Tratamientos químicos 55

II.6.a. Hidrólisis ácida total 55

II.6.b. Hidrólisis ácida parcial 55

II.6.c. Reducción con borohidruro de sodio 55

II.6.d. Permetilación de sacáridos 56

II.7. Tratamientos enzimáticos 56

II.7.a. Glicosidasas 56

II.7.b. Proteasa 57

II.8. Cromatografía 57

II.8.a. Filtración por geles 57

i) Bio Gel P-4 57

ii) Bio Gel P-2 58

iii) Sephadex G-100 58

iv) Sephadex G-150 58

II.8.b. Cromatografía en papel 59

II.8.c. Cromatografía en capa delgada 59

II.8.d. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 59

II.9. Electroforesis 60

II.9.a. Electroforesis en papel 60

II.9.b. Electroforesis en geles de poliacrilamida 60

II.10. Dosaje de proteínas y carbohidratos 61

II.11. Métodos de detección en cromatografías y electroforesis 62

II.11.a. Detección de proteínas en los geles de poliacrilamida 62

II.11.b. Detección de carbohidratos en cromato-

grafías y electroforesis 62

II.11.c. Detección de la radioactividad en las cromatografías y electroforesis 62

III. RESULTADOS Y DISCUSION 63

III.1. Antecedentes obtenidos en el laboratorio 63

III.2. Caracterización de los productos de reacción formados "in vitro" por A. tumefaciens. Comparación con los formados por R. meliloti 64

III.2.a. Filtración por geles 64

III.2.b. Hidrólisis ácida 64

III.2.c. Reducción con borohidruro de sodio 67

III.2.d. Permetilación 67

III.2.e. Separación de los distintos componentes presentes en el producto de reacción 70

i) Cromatografía en papel 70

ii) Filtración por geles 70

iii) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 71

III.2.f. Acción de las glicosidasas 75

III.3. Síntesis "in vivo" del glucano β1-2 79

III.4. Otro producto formado durante la reacción "in vitro" 79

III.5. Localización de la actividad enzimática en las membranas internas de A. tumefaciens 85

III.5.a. Caracterización del producto 85

III.5.b. Método rápido para el dosaje de la actividad 88

III.6. Búsqueda de los compuestos intermediarios de la síntesis del glucano β1-2 en A. tumefaciens 88

III.7. Cinética de la reacción 91

III.8. Caracterización de los compuestos insolubles en TCA 91

III.8.a. Sensibilidad a tratamientos ácidos 95

III.8.b. Solubilidad en solventes orgánicos 95

III.8.c. Proteólisis 96

i) Sensibilidad a la proteólisis 96

ii) Caracterización de los productos de proteólisis 96

III.8.d. Tratamientos alcalinos 101

III.8.e. Filtración por geles 103

III.9. Componentes del sistema enzimático 103

III.9.a. Concentración del ion divalente 103

III.9.b. Efecto del pH 105

III.9.c. NAD y ATP 108

III.10. Identificación de la proteína intermediaria por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS 108

III.11. Efecto del EDTA sobre la acumulación de los compuestos intermediarios 111

III.12. Efecto del detergente Nonidet P-40 sobre la biosíntesis del glucano β1-2 114

III.13. Efecto de osmolitos iónicos y no iónicos sobre la síntesis "in vitro" del glucano β1-2 116

III.14. Síntesis "in vitro" del glucano β1-2 por diferentes cepas de A. tumefaciens virulentas y no virulentas 118

III.14.a. Síntesis "in vitro" del glucano β1-2 utilizando células permeabilizadas de las diferentes cepas 119

III.14.b. Síntesis "in vitro" del glucano β1-2 utilizando membranas internas de las diferentes cepas 122

III.14.c. Caracterización parcial de los productos insolubles en TCA formados por las mutantes 125

III.14.d. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS de las membranas internas de las diferentes cepas analizadas 129

III.14.e. Estudio de la reacción de elongación. Soforosa como aceptor exógeno 133

III.14.f. Resumen de las características fenotípicas de las diferentes cepas y discusión 134

III.15. Estudio de los compuestos intermediarios de la biosíntesis del glucano β1-2 en R. meliloti 138

III.16. Comparación con el sistema enzimático de síntesis de los "Oligosacáridos Derivados de Membrana" (MDO) de E. coli 144

III.16.a. Características del sistema enzimático de síntesis de los MDO 144

III.16.b. Soforosa como aceptor exógeno 145

III.16.c. Efecto del octil-β-glucósido 148

IV. CONCLUSIONES GENERALES Y COMENTARIOS 151

V. BIBLIOGRAFIA 160

RESUMEN

La biosíntesis del glucano β1-2 cíclico en *A. tumefaciens* y *R. meliloti* transcurre por transferencia de residuos de glucosa desde el nucleótido UDP-glucosa a una proteína intermediaria de 235 kDa (P235), presente en las membranas internas, para formar glucooligosacáridos β1-2 unidos covalentemente a la proteína. Cuando los glucooligosacáridos alcanzan un grado de polimerización de 14 a 24 se ciclan y se liberan de la proteína. Lo descripto se esquematiza de la siguiente manera:

Etapa 1 $\quad P235 + nUDP\text{-}Glc \longrightarrow P235(Glc\beta1\text{-}2)_n + nUDP$ (elongación)

Etapa 2 $\quad P235\text{-}(Glc\beta1\text{-}2)_n \longrightarrow P235 + (Glc\beta1\text{-}2)_n$ cíclico (terminación, ciclación)

Las mutantes cromosomales chvB avirulentas y defectivas en la unión con la planta de *A. tumefaciens*, son incapaces de sintetizar el glucano β1-2 cíclico por carecer de la proteína intermediaria de 235 kDa. Esto último enfatiza el rol de la proteína intermediaria en la síntesis del glucano. La ausencia de la proteína de 235 kDa es posiblemente el defecto bioquímico primario de estas mutantes, lo que sugiere fuertemente una función del glucano β1-2 cíclico en el proceso infectivo y más específicamente en la adherencia.

INTRODUCCION

Dentro de la familia Rhizobiaceae se encuentran los géneros Rhizobium y Agrobacterium. Dichos géneros tienen características genéticas y bioquímicas muy similares. Sin embargo, estas dos bacterias que habitan el suelo, producen efectos muy diferentes en los tejidos vegetales. Agrobacterium es capaz de producir tumores en diversas plantas. La formación de estos tumores está dirigida fundamentalmente por el plásmido Ti. Rhizobium induce la formación de nódulos en las leguminosas y fija el nitrógeno atmosférico en simbiosis con la planta. En este proceso otro plásmido (Sym), tiene un rol preponderante.

Existen evidencias genéticas que indican que los mapas cromosomales de Agrobacterium tumefaciens y Rhizobium meliloti son muy similares (101). El plásmido Ti es funcional en la mayor parte de los Rhizobium (100,99) y los plásmidos Sym de R. leguminosarum, R. phaseoli y R. trifolii son considerablemente funcionales en diferentes cepas de Agrobacterium (102,103).

I.1. Formación del tumor por Agrobacterium

Las especies de Agrobacterium virulentas inducen tumores ("agalla de corona") en gran variedad de plantas dicotiledóneas, luego de invadir una herida presente en las mismas. El mecanismo central que provoca la hiperplasia es la transferencia a las células de la planta, de una porción del DNA (T-DNA) del plásmido Ti (239,244,45,135,250,253). El T-DNA es integrado y mantenido establemente en el DNA nuclear de la célula infectada (253,45,226). Esta transferencia, cuyo mecanismo aún no ha sido totalmente dilucidado, pro-

duce nuevas características metabólicas en las células infectadas, como es la síntesis de opinas (224,86,174). Las bacterias pueden utilizar asimismo estos compuestos como fuente de energía, de carbono y de nitrógeno (174). Por otro lado, los tejidos transformados crecen axénicamente en cultivo en ausencia de las hormonas vegetales auxina y citoquinina exógenas (34), debido a que estas las producen como consecuencia de la transformación por el T-DNA.

I.1.a. Plásmido Ti

El plásmido Ti contiene tres regiones asociadas con la interacción planta-bacteria: 1) T-DNA: Esta región es la que se transfiere a la célula de la planta y está directamente involucrada en la transformación neoplásica. Adicionalmente dirige la producción de opinas en la célula infectada. 2) Región Vir: Esta región se encuentra relacionada a estadíos tempranos del proceso de infección. 3) Región involucrada en el transporte y utilización de opinas por la bacteria.

Como ya se mencionó, el crecimiento de células en cultivo que fueron transformadas por el plásmido Ti es independiente del agregado exógeno de auxinas y citoquininas (34). Esta propiedad se debe a la expresión de los genes presentes en el T-DNA (Fig. 1). Recientemente se ha demostrado que estos genes codifican para enzimas que participan en la biosíntesis de las hormonas auxina y citoquinina (112,202,119,4,36). Diferentes mutaciones en esta zona provocan alteraciones morfológicas de los tumores.

Por mutagénesis por inserción de transposones, la región vir del plásmido pTiA6 ha sido dividida en por lo menos siete locus: virA, virB, virC, virD, virE y virG. Cada locus se separó del locus adyacente por al

menos una inserción que no tenía efecto sobre la virulencia (209,113). Como ya se mencionó, los genes presentes en estos locus están involucrados en los primeros pasos de la transferencia del T-DNA a la célula de la planta. La expresión de los locus virB, virC, virD y virE es activada por compuestos fenólicos presentes en los exudados de las células dañadas (209-212). Por otro lado, cada locus está constituído por una única unidad transcripcional (209).

Dentro de las primeras etapas que serían dirigidas por genes de la región vir, se encuentran la formación de moléculas de T-DNA simple cadena (213) y la formación de intermediarios circulares de T-DNA (126).

Para la formación de los círculos de T-DNA dirigida por las secuencias de borde solamente hace falta un segmento de 3,6 Kb de la región vir que correspondería a vir C/D (6). Recientemente, por análisis por computadora de secuencias, el locus virD se dividió en cinco posibles marcos de lectura abierta, pero solo se detectaron dos productos proteicos. Estos productos exhibieron actividad de endonucleasa específica de la secuencia de borde de T-DNA doble cadena (116).

I.1.b. Genes cromosomales requeridos para la virulencia

Garfinkel y Nester (82) describieron el aislamiento de mutantes de A. tumefaciens obtenidas por inserción de elementos transponibles (transposones), afectadas en la virulencia. Varias de estas inserciones fueron localizadas en el cromosoma. Cinco de las mutantes cromosomales obtenidas fueron avirulentas en cualquiera de las plantas ensayadas. Existían, previo a este trabajo, evidencias del requerimiento de genes cromosomales

para el proceso de infección. Estas evidencias estaban relacionadas a la capacidad de la bacteria de unirse a la célula de la planta (138,147,246, 247).

Las inserciones cromosomales del transposon Tn5 que provocaban una pérdida de la virulencia y de la capacidad de unión planta-bacteria, se localizaron en una región cromosomal de 11 kilobases (66,67). Esta región se mutagenizó a su vez con Tn3::HoHo1 (Tn3 que contiene lacZ), para crear simultáneamente una fusión del DNA de esta zona con lacZ, el cual carece de su propio promotor. De esta forma, midiendo actividad de β-galactosidasa se pudo estudiar la expresión, dirección de transcripción, etc., de los locus identificados (67). Este análisis demostró la presencia de dos diferentes locus: el chvA y el chvB de 1,5 y 5 kilobases de longitud respectivamente, que se transcriben en direcciones opuestas (Fig. 2). Los estudios de complementación indicaron que cada locus consiste en una única unidad transcripcional (67).

Las inserciones fuera de dichos locus no tuvieron efecto sobre la virulencia y aquellas que se encontraban entre ambos locus fueron indistinguibles de la cepa salvaje con respecto a la virulencia y a la unión a la planta. La Fig. 2 esquematiza la ubicación de algunas inserciones de los transposones Tn5, Tn3 o Tn3::HoHo1 en los locus chvA y chvB que dan el fenotipo descripto (67). Como se verá en la sección de "Resultados", las mutantes de A. tumefaciens A1011, A1020, A1038 y A1045 (Fig. 2) y las cepas que contienen las inserciones ME2 y ME116 serán utilizadas en el presente trabajo de investigación. Recientemente (46), se ha aislado una mutante cromosomal de A. tumefaciens (Ros) que eleva el nivel de expresión de ciertos genes vir del plásmido Ti sin afectar la virulencia. El locus cromosomal (ros) que contiene a esta

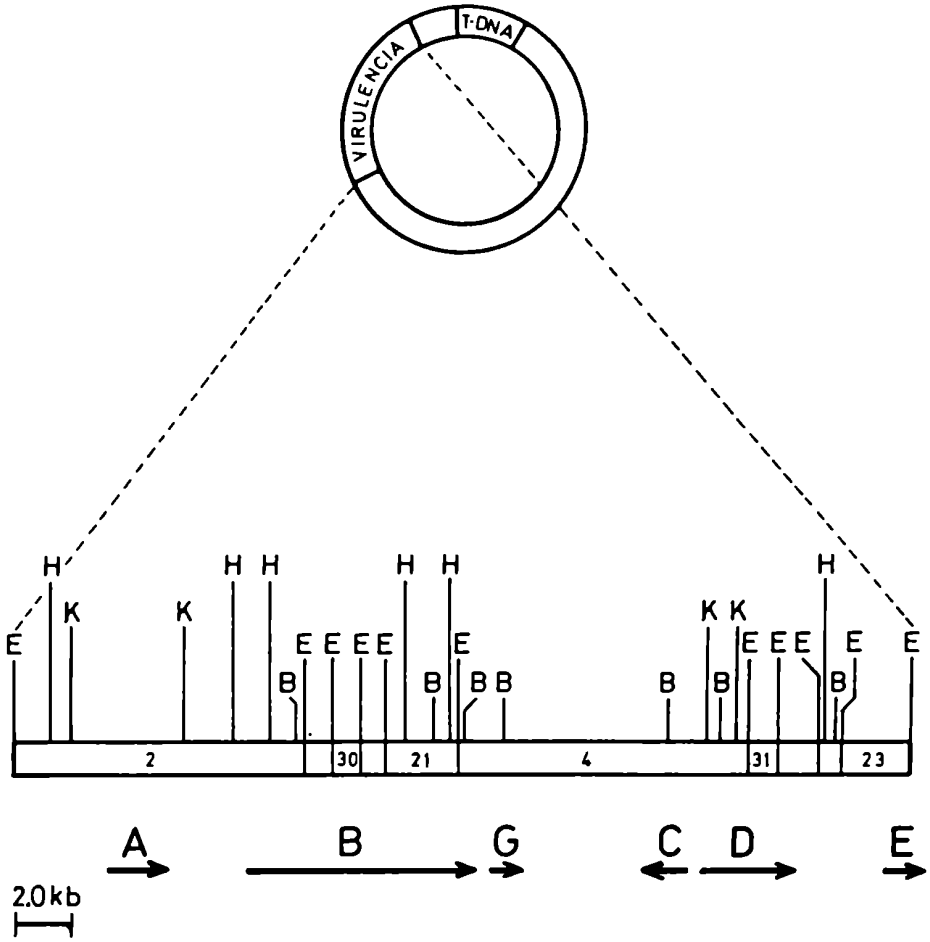

Fig. 1: Plásmido Ti.
Este plásmido (pTiA6) contiene dos regiones involucradas en la formación del tumor: la región vir (virulencia) y el T-DNA (región que se transfiere a la célula de la planta). La región vir está organizada transcripcionalmente como muestra la figura en la parte inferior, siendo A,B,G,C,D y E diferentes locus, cuya orientación transcripcional está indicada por la flecha (209,113). Los sitios de restricción están indicados por las líneas verticales. B, BamHI; E, EcoRI; H, HpaI; K, KpnI.

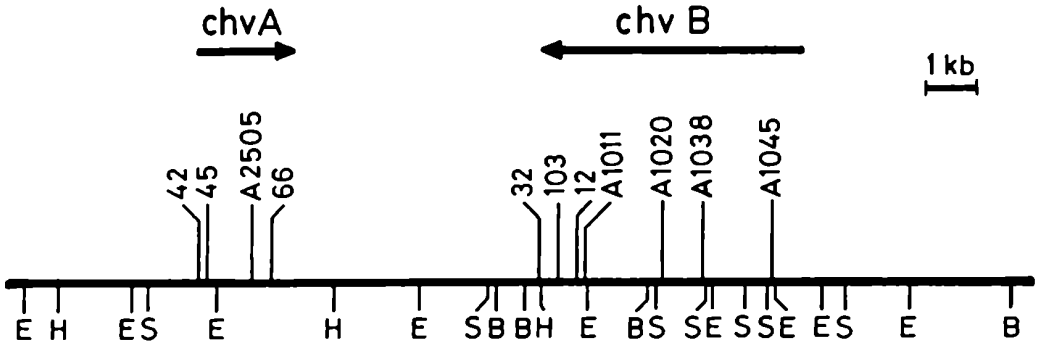

Fig. 2: Locus cromosomales chvA y chvB.
En líneas verticales sobre la línea horizontal se indican las inserciones cromosomales que producen un defecto en la virulencia y en la unión a la planta, y que definen los locus chvA y chvB (67), cuyas direcciones de transcripción están indicadas por las flechas. El mapa de restricción bajo la línea horizontal está dado para BamHI, B; EcoRI, E y SalI, S.

mutante es fenotípicamente pleiotrópico, ya que la mutación también produce un cambio morfológico de la colonia y no permite el crecimiento de la bacteria a una temperatura de 12°C, la cual es permisiva para la cepa salvaje.

También se ha identificado otro locus cromosomal (pscA) que, al igual que chvA y chvB está involucrado en la virulencia y la unión a la planta (225). Las mutantes no virulentas que definieron el locus pscA tuvieron una composición alterada de polisacáridos. Por otro lado, Matthysse (150) obtuvo, por inserción de Tn5, mutantes de A. tumefaciens incapaces de unirse a células en cultivo de zanahoria, todas las cuales fueron no virulentas.

El transposón Tn5 utilizado para mutagenizar se localizó en un fragmento EcoRI de 12 kilobases del cromosoma de las mutantes. Este locus estaría relacionado a la presencia de polipéptidos de aproximadamente 34-38 kDa, los cuales tendrían algún rol en la unión de la bacteria a la planta.

I.1.c. Unión de Agrobacterium a la planta

Lippincott y Lippincott (138) fueron los primeros que presentaron evidencias que sugirieron que la unión de Agrobacterium a una herida de la planta sería uno de los primeros pasos en la iniciación del tumor. Mezclando un inóculo de una cepa no virulenta de A. tumefaciens con otro de una cepa virulenta se inhibió en hojas de porotos pinto la formación del tumor. Las bacterias no virulentas se unirían a sitios específicos de la herida, bloqueando la posterior unión de la cepa virulenta (138). Los estudios realizados sobre discos de papas sugirieron que existe dentro de los primeros 10 minutos una unión física y específica de A. tumefaciens a las células de papa, la cual sería necesaria para la formación del tumor (84). Posteriormen-

te el cultivo de tejidos de plantas facilitó el estudio de la asociación específica entre la bacteria y la planta en forma más definida, reproducible y cuantitativa (139,170).

La necesidad de una unión bacteria-planta requeriría la presencia de receptores o sitios de unión sobre la planta y sobre la superficie bacteriana. A este respecto existen datos controvertidos.

Tanto en un sistema de planta en presencia de una herida (246) como en sistemas in vitro (cultivo de tejidos) (152), el agregado del lipopolisacárido de la pared celular de Agrobacterium inhibió la interacción entre la bacteria y la célula de la planta, sugiriendo que el receptor sobre la planta reconocería al lipopolisacárido de la pared bacteriana. Con el fin de dilucidar la identidad de los carbohidratos del lipopolisacárido que participarían en la unión planta-bacteria, se utilizó un derivado fluorescente del lipopolisacárido para estudios de interacción. Los resultados obtenidos (17) sugirieron que los azúcares N-acetil-D-galactosamina y β-D-galactosa, que se localizan en la región O-antigénica del lipopolisacárido de Agrobacterium estarían involucrados en la adherencia bacteria-huésped durante la iniciación del tumor. La introducción de un plásmido (pSa) a A. tumefaciens provocó una pérdida de la habilidad de esta bacteria de unirse a células de porotos pinto, aparentemente debido a una modificación del LPS (lipopolisacárido) (163).

Matthysse y col. (151) estudiaron la unión de A. tumefaciens a células en cultivo de zanahoria y observaron por microscopía electrónica, luego de la unión de las bacterias a la células de zanahoria, el desarrollo de fibrillas sintetizadas por la bacteria que rodearon a las mismas y las anclaron a la superficie celular de la planta. Estas fibrillas estaban compuestas por

celulosa. Estos autores presentaron un modelo hipotético que incluye, además de la formación de fibrillas de celulosa, la inducción de la síntesis de enzimas (quitinasas) por la bacteria. Estas enzimas degradarían la quitina de la pared celular de la planta, permitiendo el contacto entre la bacteria y la membrana plasmática celular de la planta, lo que facilitaría la transferencia del plásmido Ti (151). Sin embargo, mutantes bloqueadas en la síntesis de estas fibrillas fueron virulentas y capaces de unirse a la planta (148). Por otro lado, mutantes no virulentas cromosomales obtenidas por mutagénesis con el transposon Tn5, fueron incapaces de unirse a las células de tres diferentes plantas y retuvieron la capacidad de sintetizar celulosa (82). Recientemente, Sykes y Matthysse (219) describieron mutantes de A. tumefaciens que no sintetizaban celulosa, las cuales fueron virulentas pero fácilmente removidas de las heridas por lavados con agua. La celulosa podría influenciar la cinética de unión planta-bacteria y favorecer la infección en condiciones naturales (82).

Adicionalmente, se han obtenido algunas evidencias de la participación de polipéptidos presentes en la envoltura de A. tumefaciens (membrana externa, periplasma) en la adherencia bacteria-planta (150,149,18). Por parte del huésped, se ha demostrado que las moléculas de ácido poligalacturónico localizadas en la parte más externa de la pared de la célula de la planta, participarían en el proceso de adherencia (137,177). Estas moléculas, las cuales forman parte de la pectina, estarían expuestas al producirse la herida. Por otro lado, el grado de metilación de la pectina presente en la pared celular sería un factor crítico en el fenómeno de adherencia (181). Se ha sugerido que las lectinas del huésped se adhieren a Rhizobium (como se verá en la sección I.2.b.), mediando la unión de la bacteria a las raíces de

la leguminosa. Puepke y col. (178) estudiaron el efecto de una lectina aislada de papa (que tiene especificidad para oligómeros de N-acetil-D-glucosamina) sobre la unión planta-bacteria. Si bien esta lectina causa la aglutinación de varias cepas de Agrobacterium (42), los resultados obtenidos descartan que la lectina tenga una función en la adherencia de Agrobacterium a las superficies de las heridas de tubos de papas como regla general.

Como ya se mencionó, Agrobacterium es capaz de infectar gran variedad de plantas dicotiledóneas. Se han estudiado derivados del plásmido Ti para utilizarlos como vectores de información genética, con la finalidad de mejorar los cultivos (4,182). Las plantas monocotiledóneas generalmente no son susceptibles a la infección por Agrobacterium. Douglas y col. estuvieron interesados en determinar qué etapa de la tumorigénesis se encuentra bloqueada y demostraron que A. tumefaciens puede unirse específicamente a células de plantas monocotiledóneas, indicando que la iniciación del tumor está bloqueada en una etapa posterior (68).

Hasta ahora se han acumulado ciertas evidencias de que la información necesaria para la capacidad de unión Agrobacterium-célula de la planta, se encuentra codificada tanto en el cromosoma como en el plásmido Ti. Cepas avirulentas de A. tumefaciens que no contienen el plásmido Ti pudieron competir por los sitios de unión con cepas virulentas provocando inhibición de la formación del tumor (138). Sin embargo, cuando Whatley y col. (247) transfirieron el plásmido Ti de una cepa virulenta a una no virulenta e incapaz de unirse a la planta, esta última se convirtió en virulenta y capaz de competir en ensayos de inhibición de formación del tumor. La evidencia más clara de que por lo menos algunos genes cromosomales con seguridad son requeridos para la capacidad de A. tumefaciens de unirse a la planta fue obtenido por Douglas

y col. (66). Como ya se describió en la sección I.1.b., estos autores obtuvieron mutantes avirulentas de A. tumefaciens por inserción cromosomal del transposon Tn5 que eran defectivas en su unión a células en cultivo de tabaco o células mesófilas de hojas de Zinnia. Estas mutantes perdieron la sensibilidad a dos fagos, aparentemente por una pérdida de la habilidad para adsorberlos, lo que sugería un cambio en las propiedades de la superficie (66). Posteriormente y como ya se mencionó en la sección I.1.b., se encontró que las inserciones de Tn5 que producen el fenotipo descripto se encuentran en dos locus cromosomales chvA y chvB.

Recientemente Puvanesarajah y col. (180) presentaron evidencia de que las mutantes chvB son incapaces de producir glucanos β1-2. Este resultado sugiere algún rol de dicho glucano en la unión de A. tumefaciens a la célula de la planta. De acuerdo con los resultados que se han obtenido en el presente trabajo de investigación, el posible rol del glucano β1-2 en el proceso de infección será discutido en "Resultados y Discusión" y en "Conclusiones Generales".

I.2. Infección de las leguminosas por Rhizobium

Rhizobium es capaz de infectar en forma específica las raíces de las leguminosas y luego en asociación simbiótica con la planta, de fijar el nitrógeno atmosférico convirtiéndolo en nitrógeno asimilable. Rhizobium prolifera en la rizósfera de las raíces de la planta y se une a la superficie de las células. La especie de Rhizobium compatible con la leguminosa, induce el enrulamiento de los pelos radiculares y la posterior formación de los hilos de infección. Después de un recorrido por los hilos de infección, las bac-

terias entran al citoplasma de las células del huésped y son rodeadas por las membranas plasmáticas de las mismas. Durante esta etapa las bacterias se diferencian a bacteroides. La enzima nitrogenasa se sintetiza en los bacteroides y convierte el nitrógeno atmosférico en amonio a expensas de la energía proveniente de la fotosíntesis de la planta infectada. El amonio pasa al citoplasma de la célula de la planta donde es asimilado a aminoácidos (23).

El proceso de infección es muy selectivo para ciertas combinaciones de Rhizobium y leguminosa y el alto grado de especificidad se usa para definir las distintas especies de Rhizobium. La especificiad estaría regida por el primer paso del proceso de infección que es la unión de la bacteria a la célula de la raíz.

Luego de la unión bacteria-célula de la raíz y enrulamiento de los pelos radiculares, se produce una penetración de las bacterias a los mismos. Vance (240) describe tres hipótesis diferentes que explicarían el fenómeno de penetración: 1) invaginación, 2) presencia de enzimas que degradan las paredes celulares, 3) teoría que involucra una lectina y enzimas degradantes.

La infección podría ocurrir a través de una invaginación de la pared del pelo radicular con un subsecuente atrapamiento de la bacteria. Sin embargo, en esta instancia se considera que la bacteria aún se encuentra fuera del huésped. La penetración de Rhizobium ocurriría por la acción de enzimas pectinolíticas y celulolíticas que serían liberadas por la célula de la planta en respuesta a una señal proveniente de la bacteria.

La tercer teoría mencionada que involucra lectinas, polisacáridos y enzimas que degradan la pared celular, fue propuesta por Hubbell (106). En esta teoría se proponen componentes análogos sobre la superficie de los pelos

radiculares y sobre Rhizobium, ambos responsables del fenómeno de adherencia y de la infección. Lectinas de la planta actuarían como enzimas modificando las propiedades antigénicas de Rhizobium. Estos cambios controlarían los fenómenos de adherencia y reconocimiento. Simultáneamente, enzimas de la bacteria se unirían a los polisacáridos de la pared de las células de los pelos radiculares degradándolos e induciendo su propia penetración.

La formación de los hilos de infección y la proliferación estaría regulada por la propia planta (167,168,23). De esta forma, sólo un número limitado de células sería susceptible de ser infectadas, y sólo unos pocos hilos de infección terminarían su recorrido, formando finalmente los nódulos. Por otro lado, el desarrollo del primer nódulo inhibe una infección subsecuente y la aplicación de nitrógeno inhibe la penetración de la bacteria y la formación de los hilos de infección, así como también induce el aborto de hilos de infección en formación.

I.2.a. Ubicación de los genes requeridos para la simbiosis

El proceso de fijación del nitrógeno atmosférico propiamente dicho, efectuado por el sistema simbiótico bacteria-planta es dirigido por los genes nif (fijación del nitrógeno) presentes en la bacteria (143,166,196).

Se ha descripto la presencia de plásmidos de gran tamaño (de más de 200 Md) en la mayor parte de cepas de Rhizobium examinadas (165,41). Por mutación de dichos plásmidos con distintos mutagenos pueden obtenerse cepas capaces de nodular (Nod+) pero incapaces de fijar el nitrógeno atmosférico (Fix-) o mutantes incapaces de nodular y de fijar (Nod- Fix-) (35,117). Por eliminación del plásmido, proceso que se denomina curación, la cepa se con-

vierte en Fix-, y el fenotipo salvaje puede recuperarse luego de la introducción del plásmido correspondiente.

Por otro lado, también se puede modificar el rango de especificidad de huésped transfiriendo los plásmidos de nodulación entre diferentes especies (117).

Rhizobium meliloti contiene un megaplásmido (el plásmido Sym: simbiótico) que lleva los genes que le confieren la capacidad de nodular alfalfa y fijar el nitrógeno atmosférico en simbiosis con la planta. Los genes de nodulación nod se encuentran en dicho plásmido en la vecindad de los genes de fijación del nitrógeno nif (19,192,37). Las mutaciones en esta región pueden ser suprimidas por complementación con plásmidos Sym provenientes de otras especies (125). Por tal motivo se la llama región nod común. Se han identificado cuatro genes A, B, C y D en la región nod, tres de los cuales, A, B y C son esenciales para inducir el enrulamiento del pelo radicular (Fig. 3) (114,234). Los productos de estos genes se han identificado recientemente en un sistema de expresión "in vitro" de maxicélulas de E. coli por electroforesis y autorradiografía (74). La cantidad de proteína codificada por el gen nodA se ve muy incrementada por la presencia de los exudados de la raíz del huésped, lo que indicaría que su expresión se encuentra regulada por la planta (74,199). Aún no se conoce el rol bioquímico de las proteínas codificadas por estos genes.

También se han identificado otros genes en el plásmido Sym no complementables. Esto significa que mutaciones en esta zona no son suprimidas por genes provenientes de especies heterólogas. Estos genes no complementables están implicados en el reconocimiento del huésped (104) y se denominan nodE, F, G y H (o hsn A, B, C y D por hüesped, especificidad, nodulación) (Fig. 3).

La secuencia predicha para el producto del gen nodF (o hsnB) es muy similar a la secuencia de la "acyl-carrier-protein" descripta en varios sistemas, especialmente cerca del residuo de serina que une al cofactor fosfopanteteína (206). Debido a que una deleción en este gen no afecta el crecimiento de la bacteria, el gen F (hsnB) no se requeriría en la biosíntesis de ácidos grasos, de tal manera que podría tener algún rol en la biosíntesis de algún otro polímero implicado en las etapas iniciales de la nodulación o en el reconocimiento bacteria-huésped. El gen nodH (o hsnD) determina la especificidad del proceso de enrulamiento y los genes F, E y G (o hsnB, A, C) la especificidad del proceso de formación del hilo de infección (104). Los genes hsnA, B, C y D codifican para proteínas de 9.7, 41.7, 26.7 y 28.6 KDalton respectivamente.

Los genes estructurales de la nitrogenasa, nifH, nifD y nifK, se encuentran en el plásmido Sym de R. meliloti (196). Estos genes son adyacentes y constituyen un operón. Recientemente, un gen fix regulatorio similar al descripto en Klebsiella pneumoniae (nifA) se ha encontrado en la región nif-fix (Fig. 3) (220). Klebsiella pneumoniae es una bacteria fijadora de nitrógeno de vida libre y contiene los genes nif (fijadores de nitrógeno) que son regulados positivamente por nifA (65). El gen equivalente a nifA, actúa en forma similar a nifA de K. pneumoniae, activando la expresión desde el promotor de nifH (220,218).

Cerca de la zona nif-fix se encuentra otro gen necesario para la fijación simbiótica del nitrógeno. Este gen se llama fixF (Fig. 3) y codifica para una proteína de 36 KDalton (2). La transcripción del gen fixF es activada por el gen regulatorio nifA (2).

Se han descripto otros genes esenciales para la fijación del nitrógeno

en R. meliloti pero que no tienen o no se les ha encontrado homología estructural o funcional con los genes nif de K. pneumoniae. Estos genes se denominan por definición fix. Los genes fixA, B, C y X se encuentran muy cercanos a los nif ya mencionados, en el plásmido Sym (Fig. 3) (197,179,73). Constituyen un operón (30,197) y su transcripción es activada coordinadamente con la de los genes estructurales de la nitrogenasa nifH, D y K, por el producto del gen nifA (220). Las funciones biológicas de los productos de fixA, B, C y X aún no se conocen. Por otro lado, el gen fixX es altamente homólogo a los correspondientes de las ferredoxinas presentes en otras epecies fijadoras de nitrógeno como Azotobacter vinelandii (73). Muy recientemente se ha localizado un gen adyacente y hacia el extremo 3' que presenta alta homología con nifB de K. pneumoniae (38). El gen nifB se requiere para el procesamiento del cofactor de hierro y molibdeno de la nitrogenasa (185,186). En la Fig. 3 se presenta un esquema de la localización de los genes mencionados.

Finan y col. (77) aislaron mutantes espontáneas de R. meliloti en un locus simbiótico nuevo. Estas mutantes son resistentes a diferentes fagos e insensibles a un anticuerpo monoclonal contra antígenos de la superficie bacteriana. Por otro lado, no producen el enrulamiento del pelo radicular, pero inducen la formación de nódulos, los cuales carecen de hilos de infección y bacteroides y son incapaces de fijar el nitrógeno (Fix-). Las características de la morfogénesis vegetal inducida por estas bacterias sugieren que el locus afectado tendría algún rol en el proceso invasivo de la bacteria y que ésta induce a las células de la planta a diferenciarse y formar los nódulos a través de una señal a distancia. Estas mutantes fix- son deficientes en la producción del exopolisacárido (77), indicando alguna función para dicho polisacárido en el proceso de invasión a la planta.

Más aún, también recientemente Leigh y col. (132) aislaron 26 mutantes de R. meliloti obtenidas por inserción del transposon Tn5 que son, al igual que las mutantes Fix- mencionadas en el párrafo anterior, deficientes en la producción del exopolisacárido. Estas mutantes forman nódulos inefectivos (Fix-) que no contienen bacteroides ni hilos de infección. El exopolisacárido entonces cumpliría una función (como mensaje o componente estructural) en el proceso invasivo de la bacteria más que en la formación del nódulo. Hasta el momento no se conoce la ubicación del o los locus relacionados al fenotipo descripto.

Es importante mencionar que se han identificado genes esenciales para la simbiosis que están relacionados a los genes presentes en el locus cromosomal chvB de A. tumefaciens (72). El locus chvB, como ya se mencionó en la sección I.1.b., es esencial para el proceso de formación del tumor y para la unión bacteria-planta (82,67). Las mutantes en el locus equivalente a chvB de R. meliloti (ndvB, nodule development) obtenidas por inserción de transposones, inducen la formación de nódulos pero que carecen de bacteroides, hilos de infección y no fijan el nitrógeno atmosférico.

Son muchos los eventos que transcurren desde la primer interacción Rhizobium-planta y enrulamiento del pelo radicular hasta la formación del nódulo efectivo y la fijación del nitrógeno atmosférico. Por otro lado, son varios los genes y locus identificados que son esenciales para alguno o algunos de estos eventos. Se han descripto genes que se requieren para eventos tempranos (formación de los hilos de infección, de los bacteroides o de los nódulos) o más tardíos (fijación del nitrógeno en el nódulo). También se han identificado genes particulares de cada especie que de alguna forma rigen la

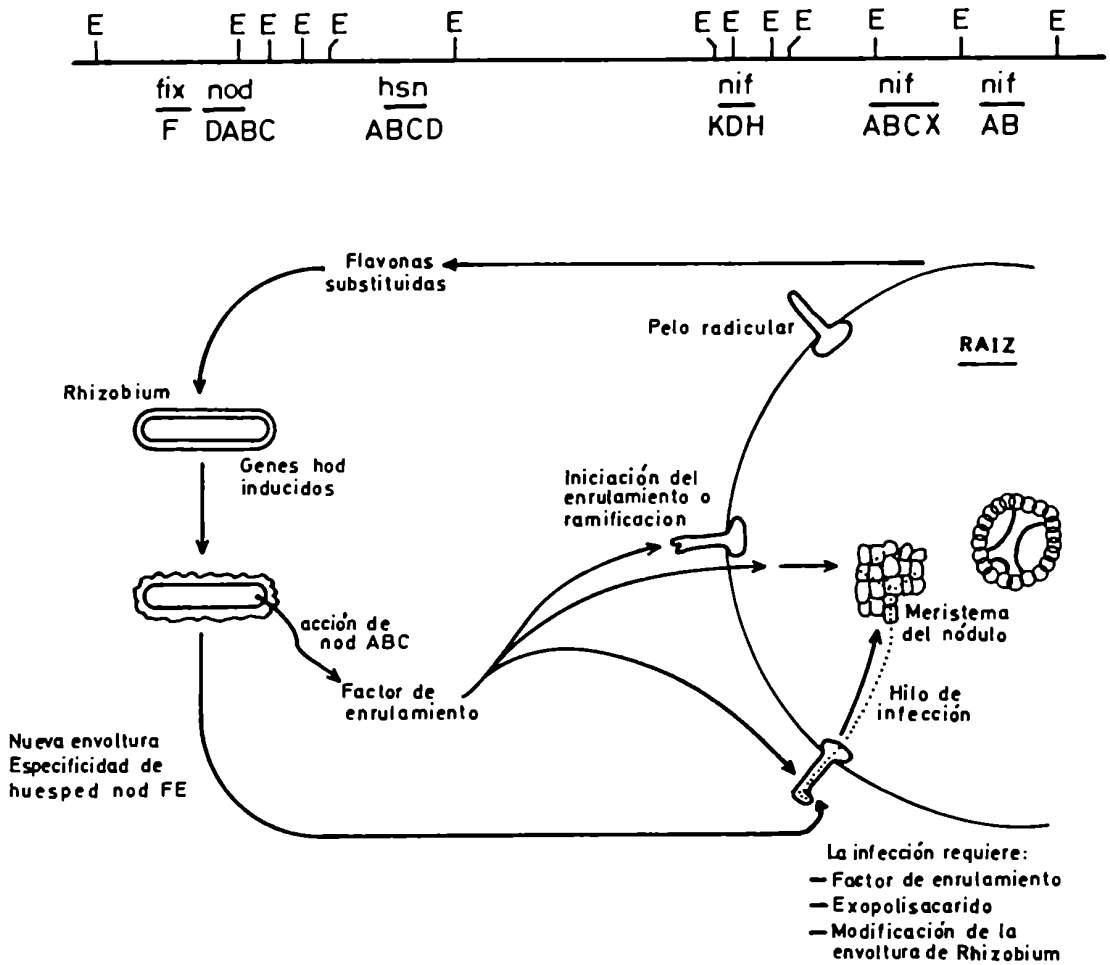

Fig. 3: Genes requeridos para la simbiosis.
En la parte superior se muestra un esquema de las regiones genéticas del plásmido pSym de R. meliloti requeridas para la simbiosis, en un mapa de restricción de EcoRI (E) (3).
Nod, nodulación; hsn, especificidad de huésped; nif, fijación del nitrógeno, que tiene equivalente en K. pneumoniae; fix, fijación de nitrógeno. En la parte inferior se presenta un modelo de la relación entre algunos de los genes requeridos para la simbiosis y los eventos de la nodulación propuestos por Downie y Johnston (69).

especificidad de huésped. En la mayor parte de los genes de simbiosis no se conoce la función bioquímica del correspondiente producto aunque sí se sabe con cierta aproximación en qué etapa de la secuencia coordinada de eventos tiene algún rol. En la Fig. 3 se presenta un modelo propuesto por Downie y Johnson (69) que relaciona algunos de los genes mencionados con la secuencia de eventos que llevan a la formación del nódulo fijador de nitrógeno.

I.2.b. Unión de Rhizobium a la célula de la planta

Parecería que la unión de la bacteria a las células de los pelos radiculares es un paso temprano de reconocimiento en el proceso de infección.

Dazzo y col. (55) dividen esta primera etapa en dos fases:

1) Unión de las bacterias a los pelos radiculares: Los resultados obtenidos para R. trifolii y trébol hicieron que Dazzo y Hubbell (57) propusieran el siguiente modelo: la trifolina A (aglutinante de células y multivalente) reconocería residuos similares de sacáridos sobre R. trifolii y sobre las células del trébol, haciendo de puente entre ellos. Encontraron que la 2-deoxi-D-glucosa es un haptene específico que inhibe la unión entre la trifolina A y los receptores sobre la bacteria (57,52). Los resultados inmunoquímicos y genéticos sugirieron que tanto la trifolina A como anticuerpos anti trébol se unen a determinantes sacarídicos sobre R. trifolii muy similares a los determinantes de la célula de trébol. En cuanto a cuál sería el polisacárido de la bacteria que participaría en esta etapa existe mucha información acumulada confusa y es uno de los puntos de mucho interés que diversos grupos están investigando.

Se ha demostrado una unión específica de polisacáridos bacterianos a los pelos radiculares en los sistemas R. meliloti-alfalfa (52), R. leguminosarum-arveja (118), R. japonicum-soja (108,107).

2) Adherencia: En esta fase del reconocimiento, la bacteria se anclaría firmemente a la superficie de los pelos de la raíz (51,54). Durante esta fase, se han visto materiales fibrilares por microscopía electrónica asociados a la bacteria adherida. Estos podrían ser microfibrillas de celulosa (62,161,207) o conjuntos de "pili" (204).

Sin embargo, aún suponiendo ciertas las 2 fases mencionadas, serían necesarios otros eventos en la etapa de reconocimiento para que la infección avance (55). Estos incluyen la inducción de enzimas que hidrolizan las paredes celulares de las células de la planta (106,146), poligalacturonasa del huésped (140,173) y factores que provocan el enrulamiento de los pelos radiculares (251).

El nitrógeno combinado inhibe el desarrollo del proceso infectivo (231). Un aumento en la concentración de nitrato en el medio inhibe la unión de R. trifolii 0403 a los pelos radiculares de trébol, así como paralelamente los niveles de trifolina A sobre estas células epidérmicas (53). Parece probable que más que la unión planta-bacteria, el nitrato module algún proceso primario involucrado en la simbiosis, el cual a su vez regularía los eventos tempranos de reconocimiento del proceso infectivo (54).

Se ha observado una dependencia con la edad de un cultivo de R. trifolii de la unión trifolina A -R. trifolii, la cual estuvo relacionada a la aparición de un determinante del LPS sobre la bacteria (105).

Por microscopía de fluorescencia, microscopía electrónica, y experimentos de reconstitución se ha observado una adherencia polar de células de

R. trifolii mediada por trifolina A a los pelos radiculares de trébol debida a alteraciones de la cápsula de la bacteria, provocadas por enzimas liberadas por el huésped (58).

Se han presentado evidencias de la presencia de una lectina en los exudados de las raíces de soja que tendría algún rol en la nodulación de R. japonicum (88). El haptene de esta lectina (N-acetil-D-galactosamina) bloquea la unión de R. japonicum a los pelos radiculares de la raíz. Por otro lado, también se observó una transiente aparición y desaparición del receptor sobre R. japonicum que específicamente se une a la lectina de soja (31). En este caso, la edad del cultivo tuvo alguna influencia sobre el contenido de residuos de 4-O-metil galactosa o galactosa en el EPS (158).

Sin embargo, existen distintas evidencias que indican que las lectinas no serían determinantes de especificidad (44,176,24).

Recientemente, Lepek y Marechal (enviado para publicación), estudiaron más en detalle la interacción entre una aglutinina aislada de semilla de alfalfa y R. meliloti. Obtuvieron distintas evidencias que sugieren fuertemente que dicha aglutinina (o potencial lectina) no es responsable de la especificidad del proceso de simbiosis. Esta proteína es capaz de aglutinar otras especies incapaces de nodular alfalfa. Dependiendo del punto isoeléctrico, otras proteínas no vegetales presentaron la misma propiedad de aglutinación. Por otro lado, la inhibición de la aglutinación también fue inespecífica ya que diferentes polímeros con una carga negativa neta al igual que el lipopolisacárido de R. meliloti provocaron tal inhibición.

Al igual que en el sistema A. tumefaciens -planta dicotiledónea-, existe una gran controversia respecto de cuál (lipopolisacárido, exopolisacáridos o glucanos neutros) es el receptor sobre Rhizobium que reconocería

a la lectina u otra molécula sobre raíz. Los resultados obtenidos en diversos sistemas por diferentes grupos de investigación no son contundentes. Una posibilidad es que existan varios receptores sobre Rhizobium que cumplan diferentes funciones en las primeras etapas del proceso infectivo. Una de ellas es la deformación de los pelos radiculares como se vio en trébol blanco inducido por distintos componentes del medio extracelular de R. trifolii (76), o la inducción de hilos de infección en la que se sugirió que el lipopolisacárido tendría alguna función (164).

Bauer (23) propuso un modelo, el cual sugiere que el reconocimiento no es un proceso de una sola etapa sino un efecto acumulativo de una serie de interacciones que incluyen señales y respuestas por parte de la bacteria y el huésped.

I.3. Polisacáridos producidos por Rhizobium y Agrobacterium

En los últimos años ha existido un contínuo interés en el estudio de la relación entre los polisacáridos producidos por Rhizobium y Agrobacterium y el mecanismo del proceso infectivo de dichas bacterias a los tejidos vegetales. Varios grupos de investigación se han dedicado a la dilucidación de la composición y estructura química de los diferentes polisacáridos producidos por estas bacterias.

I.3.a. Exopolisacáridos

Los exopolisacáridos son excretados al medio de cultivo o permanecen asociados a la bacteria formando parte del material capsular de la misma. Los exopolisacáridos (EPS) de las especies de Rhizobium de crecimiento lento (a

diferencia de los EPS de las especies de Rhizobium de crecimiento rápido y Agrobacterium), tienden a adherirse más fuertemente a las células como formando parte del material capsular y presentan mayor diversificación en cuanto a la composición química en diferentes cepas analizadas (71). El fraccionamiento del medio de cultivo de distintas especies de Rhizobium por precipitación con cantidades crecientes de etanol lleva a la separación de polisacáridos de peso molecular decreciente. Las fracciones precipitables con 3 volúmenes de etanol son productos de alto peso molecular que dan soluciones acuosas altamente viscosas (256). Estos polisacáridos se pueden dividir en cuanto a la composición química en dos clases:

Clase I: Los polisacáridos carecen de ácidos urónicos y tienen D-glucosa, D-galactosa y ácido pirúvico en relación 7:1:1.
Clase II: Están compuestos por D-glucosa, D-galactosa, ácido D-glucurónico y ácido pirúvico en una relación molar 5:1:2:2.

Los polisacáridos de la clase I son producidos fundamentalmente por Rhizobium meliloti y Agrobacterium (Fig. 4) (254) y los de la clase II por R. leguminosarum, R. phaseoli y R. trifolii (187,255).

Como ya se mencionó, una considerable parte de estos polisacáridos permanece unida a la célula. En algunos Rhizobium, especialmente en las especies de crecimiento lento se ha encontrado que el polisacárido unido a la célula, el cual tiene una apariencia mucosa y se lo denomina "zooglea", difiere del polisacárido acídico difusible sólo en el grado de polimerización (232). Se ha descripto que la unidad repetitiva del polisacárido de una cepa de A. tumefaciens estaba constituida por D-glucosa, ácido pirúvico, O-succinilo y O-acetilo en una relación molar de 5,8:1,03:0,91:0,87 y la de A.

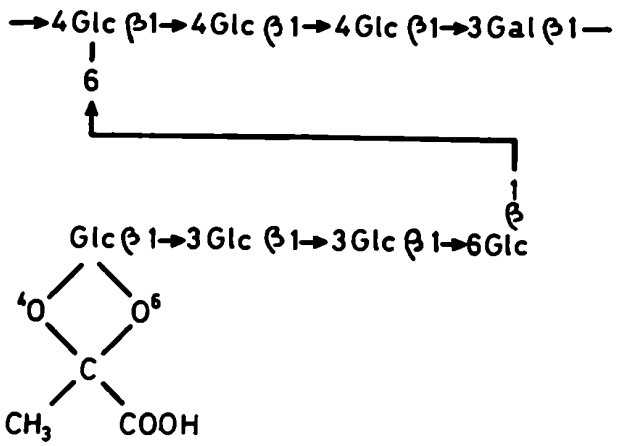

Fig. 4: Unidad repetitiva del exopolisacárido de R. meliloti y A. tumefaciens (115,91).
Los grupos acilo están presentes en sitios no determinados.

radiobacter por D-glucosa, D-galactosa, ácido pirúvico, O-succinilo y O-acetilo en una relación molar de 3,1:2,2:1,2:1,1:1,02 (75).

Aman y col. (8) utilizaron un nuevo método de secuenciación de restos glicosídicos para dilucidar la estructura del polisacárido acídico excretado por R. meliloti 1021. Su relación molar fue galactosa, glucosa, pirúvico 1:7:1. El método está basado en el análisis por HPLC-espectrometría de masa y GLC-espectrometría de masa de los oligosacáridos alditoles peralquilados correspondientes al polisacárido, y permite la determinación de las uniones glicosídicas involucradas.

Debido a las grandes posibilidades estructurales que ofrecen los EPS o polisacáridos capsulares, diversos autores los han propuesto como determinantes de especificidad. Sin embargo, evidencias obtenidas en los últimos tiempos parecen no apoyar tal hipótesis. Estas evidencias son:

1) Ghai y col. (83) describieron los resultados obtenidos al estudiar la composición química del polisacárido extracelular de diferentes cepas de R. meliloti, R. trifolii y R. japonicum. Estos autores no encontraron correlación entre composición química y especificidad de infección.
2) Footrakul y col. (78) analizaron el polisacárido soluble de cuarenta y tres cepas de Rhizobium que habían sido aisladas de diferentes plantas. No se observó una correlación clara entre la especificidad de huésped y los componentes de los polisacáridos extracelulares.
3) La unidad repetitiva del polisacárido de una cepa R. phaseoli consistió en un decasacárido, con un residuo de ácido pirúvico y uno o más grupos acetilo (7). Este polisacárido fue muy similar al polisacárido acídico excretado por dos cepas de R. leguminosarum y dos cepas de R. trifolii (187).

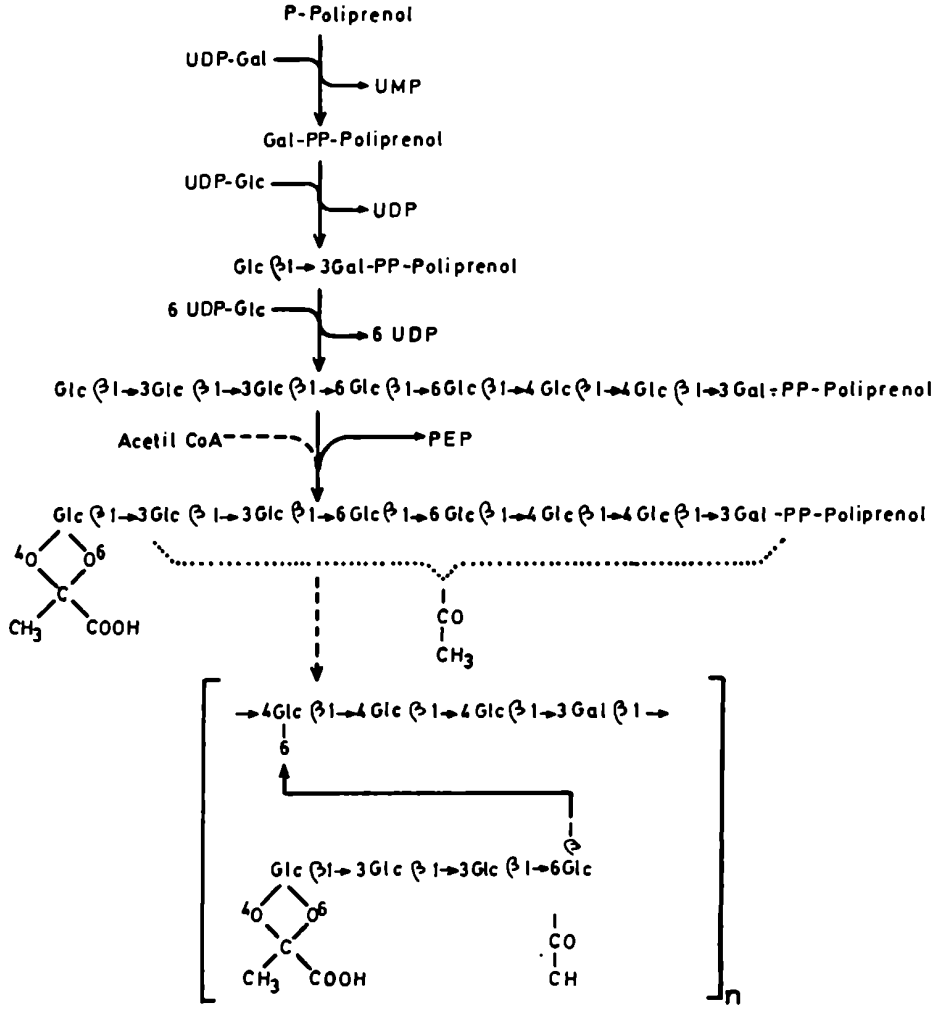

Fig. 5: Biosíntesis del exopolisacárido de R. meliloti R41 (227). Las reacciones indicadas en línea de puntos no fueron confirmadas experimentalmente.

4) Los polisacáridos solubles extracelulares de nueve cepas diferentes de Agrobacterium tuvieron una estructura muy similar al succino glucano producido por Alcaligenes feaecalis var, myxogenes (97).

5) Recientemente McNeil y col. demostraron que los polisacáridos acídicos de una cepa de R. trifolii, otra de R. leguminosarum y otra de R. phaseoli fueron idénticos con respecto a la secuencia glicosídica y a la estructura y localización de los substituyentes no glicosídicos. Por otro lado, el polisacárido excretado por una cepa diferente de R. trifolii (NA30) fue diferente a la estructura del polisacárido mencionado en el párrafo anterior (153).

Los resultados descriptos en los últimos párrafos son incompatibles con la hipótesis de que los polisacáridos acídicos excretados por diferentes especies de Rhizobium son determinantes de especificidad de huésped. Una cepa de R. trifolii que no es capaz de nodular y que fue preparada por remoción del plásmido Sym produce un polisacárido idéntico al de la cepa parental. Debido a que se ha descripto que el plásmido Sym controlaría la síntesis de los determinantes de especificidad (103) el hecho que el polisacárido excretado por la cepa curada del plásmido no haya sufrido ningún cambio estructural implicaría o confirmaría que los polisacáridos acídicos no son determinantes de especificidad. No se puede descartar la posibilidad de que algún componente minoritario difícil de detectar por los métodos convencionales sea el responsable de la especificidad bacteria-huésped.

Tolmasky y col. encontraron que luego de incubar "in vitro" una preparación enzimática particulada de R. meliloti con UDP-(^{14}C)glucosa, se formaban substancias radioactivas solubles en solventes orgánicos. Estos compuestos fueron identificados como poliprenil-difosfato sacáridos por

varios criterios (229). Posteriormente, se vio que la porción sacarídica de algunos de estos compuestos estaba constituida por un octasacárido que fue idéntico al de la unidad repetitiva del exopolisacárido de R. meliloti (Fig. 4). Por estudios de marcación de dichos compuestos se demostró la secuencia de incorporación de los restos glicosídicos y de los substituyentes acetilo y ácido pirúvico (228). En la Fig. 5 se muestra un esquema de la secuencia de reacciones que llevan a la formación del EPS en R. meliloti R41. Más recientemente los mismos autores (214) demostraron que la incubación de una preparación particulada de A. tumefaciens con UDP-(^{14}C)glucosa lleva a la formación de substancias radioactivas solubles en solventes orgánicos que fueron identificadas como poliprenil-difosfo azúcares. La porción sacarídica de estos compuestos se identificó como galactosa, Glc (β1-3) Gal, Glc (β1-4) Glc(β1-4) Glc(β1-3) Gal y el octasacárido piruvilado y acetilado. Este octasacárido fue idéntico de acuerdo a los criterios utilizados a la unidad repetitiva del exopolisacárido de A. tumefaciens.

Estos resultados junto con los obtenidos en R. meliloti sugieren fuertemente a los polipropenil-disfosfo azúcares como precursores de los exopolisacáridos.

Por otro lado, Rhizobium, Agrobacterium y Alcaligenes liberan al medio de cultivo un oligosacárido idéntico a la unidad repetitiva del polisacárido (14,259). Este oligosacárido podría de alguna forma estar relacionado a los intermediarios de la síntesis del EPS aunque aún no se conoce de qué manera.

I.3.b. Glucanos β1-2

La presencia de glucanos con uniones glicosídicas β1-2 en los medios de cultivo de A. tumefaciens fue descripta hace ya muchos años (111,85). Zevenhuizen y col. (258) describieron la presencia del glucano β1-2 como principal componente celular de R. leguminosarum, R. phaseoli, R. trifolii y R. meliloti (por encima del 10% del peso seco de células), cuando las células fueron cultivadas en medios ricos en carbohidratos. Estos autores extrajeron el material celular con fenol-agua a 70°C durante 20 min. La fase acuosa dializada se fraccionó con cetavlon (bromuro de cetiltrimetilamonio). De esta forma se separaron compuestos fuertemente acídicos (RNA, exopolisacáridos, los cuales precipitan como complejos con el cetavlon) de los compuestos neutros entre los que se encuentra el glucano β1-2. Los glucanos se disociaron completamente de las células por extracción con fenol-agua. Zevenhuizen y col. (258) no detectaron glucano en forma libre en el citoplasma y tampoco lo detectaron en forma libre en el medio de cultivo como se encuentra el exopolisacárido.

Estos resultados sugirieron que los glucanos β1-2 se encontrarían fuertemente unidos a las células como el lipopolisacárido y que formarían parte del material capsular.

York y col. (252) señalaron posteriormente que el hecho de no detectar el glucano en el medio de cultivo se debería fundamentalmente a la presencia de altas cantidades de exopolisacárido, el cual forma soluciones muy viscosas a concentraciones mayores de 1 mg/ml. Estos autores precipitaron diferencialmente con etanol los distintos componentes del medio de cultivo. Con 2

volúmenes de etanol precipitó la mayor parte del exopolisacárido acídico. El resto del polisacárido acídico se retuvo en una columna de DEAE. La fracción neutra eluida de la columna de DEAE que se encuentra libre de EPS tuvo cantidades apreciables de glucano β1-2, según se vio por cromatografía en Sephadex G-50. Por reducción con borodeuterio de sodio y posterior metilación no se detectó C-1-O metil derivado. Esto les sugirió la ausencia de extremo reductor libre. Para cuantificar el porcentaje de glucosas reducibles del glucano y de los productos de hidrólisis parcial, los oligosacáridos se redujeron, hidrolizaron y acetilaron, y se analizaron por cromatografía gaseosa. No se detectó en el glucano β1-2, la presencia de residuos de glucosa reducibles. Por lo tanto se propuso que el extremo reductor se encontraría bloqueado por un residuo aglicona o que estaría unido a través de una unión glicosídica β1-2 a otro residuo de la molécula, formando una molécula macrocíclica al unirse al otro extremo de la molécula (252).

Por otro lado, el glucano β1-2 se ha encontrado simultáneamente en el medio de cultivo y en las células de R. meliloti, R. leguminosarum, R. phaseoli y R. trifolii (256). El glucano presente en el medio se aisló precipitándolo con 10 volúmenes de etanol de una fracción del medio de cultivo, la cual se encontraba libre de EPS, al separarlo por sucesivas precipitaciones con concentraciones crecientes de etanol. El glucano celular fue liberado por simple extracción con etanol-agua 75% o por ultrasonicación. El hecho de encontrar glucano celular hizo que los autores sugirieran que éste sería de origen citoplasmático. La concentración del glucano celular en R. leguminosarum, R. phaseoli y R. trifolii fue mayor de 40-60 mg, y la de R. meliloti de 200 mg por gramo de peso seco de células. Por mediciones cuantitativas del glucano celular a diferentes tiempos de un cultivo en crecimiento se vio

que el glucano no es utilizado como fuente de carbono y energía aun cuando la fuente exógena de carbono ha disminuido considerablemente.

Abe y col. (1) describieron el efecto sobre la nodulación (formación de hilos de infección y cantidad de nódulos) de un factor aislado del espacio periplásmico de R. trifolii, obtenido luego de someter a las células a un shock osmótico. Este factor resultó ser un glucano con uniones glicosídicas β1-2 de menor peso molecular que los descriptos anteriormente. El glucano también pudo ser extraído de las células de A. tumefaciens por tratamiento de éstas con TCA 1%, lo que sería compatible con una localización periplásmica (155).

De lo descripto en los párrafos anteriores se puede deducir que no existe una uniformidad de criterios para concluir sobre el lugar de síntesis y el destino final de los glucanos β1-2. Sin embargo, analizando los métodos utilizados para aislar el glucano parece muy probable que el glucano se encuentre fundamentalmente en el espacio periplásmico y que sólo una parte se excrete al medio de cultivo.

La observación de que los glucanos β1-2 carezcan de una glucosa terminal reductora, llevó a sugerir que estos compuestos tendrían una estructura cíclica. Sin embargo, con los métodos que se han utilizado no se podría distinguir una estructura cíclica de moléculas lineales que contuvieran un grupo funcional no identificado en el extremo reductor. Por "fast-atom bombardment" espectrometría de masa y por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C se pudo demostrar sin ambigüedad que los glucanos β1-2 son moléculas cíclicas sin ramificaciones que contienen de 17 a 24 residuos de glucosa (64). Por otro lado se pudo demostrar que en las condiciones usadas para permetilar polisacáridos, los glucanos son parcialmente

degradados, lo que llevaba en trabajos anteriores a resultados confusos al analizar los productos de permetilación (64).

La presencia de glucanos β1-2 en los medios de cultivo se confirmó en diferentes cepas de A. radiobacter, A. rhizogenes, A. tumefaciens (95), R. meliloti, R. trifolii, R. leguminosarum, R. phaseoli, R. japonicum y R. lupini (14). En estos casos, el glucano fue aislado del sobrenadante obtenido luego de centrifugar las células por precipitación con 4 volúmenes de etanol. Junto con el glucano β1-2 precipita el octasacárido que es idéntico a la unidad respectiva del EPS y que, como ya se mencionó, podría estar relacionada a la biosíntesis de los polisacáridos acídicos. Las cepas de Agrobacterium productoras de glucano liberaron al medio de cultivo entre 100 y 300 mg / 100 ml del glucano β1-2 (95,14).

Koizumi y col. (124) encontraron las condiciones para separar los distintos componentes de un aislamiento de glucanos β1-2 cíclicos de Agrobacterium y Rhizobium por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Utilizaron una columna de sílica químicamente modificada con grupos amino y usando acetonitrilo-agua como eluyente o una columna de sílica en fase reversa con metanol-agua como eluyente. En el caso de la columna con grupos amino en la cual el tiempo de retención aumenta con el peso molecular del azúcar, se separaron ocho componentes. En el caso de la columna en fase reversa utilizada, en la cual el tiempo de retención aumenta cuanto menor es la solubilidad en agua, se separaron siete componentes. Esto demostró claramente la heterogeneidad en cuanto al tamaño del producto aislado de los medios de cultivo.

Se determinó el grado de polimerización de cada uno de los componentes separados en la forma descripta, por HPLC de los productos de hidrólisis par-

cial del componente. De esta forma se pudo determinar, por ejemplo, que en el caso de R. meliloti J7017 el grado de polimerización varía de 17 a 24, encontrándose como componentes mayoritarios los de 21 y 22 unidades de glucosa. En el caso de R. phaseoli AHU1133 varió de 17 a 20 y el componente mayoritario fue el de 17 unidades de glucosa (123).

Con la finalidad de obtener glucano β1-2 en mayor cantidad y con relativa facilidad, Higashiura y col. (93) obtuvieron una mutante (RA12) de R. phaseoli AHU1133 que no produce el exopolisacárido acídico y produce de 4 a 6 veces más glucano que la cepa parental. De esta forma se eliminaron los inconvenientes que trae la alta viscosidad producida por la presencia del exopolisacárido acídico y los pasos de purificación para eliminar el EPS y la unidad repetitiva. Estos mismos autores (93) aislaron una mutante (A1-5) de A. radiobacter IFO 12665 que produce 2-8 veces más cantidad de glucano y que, a diferencia de la cepa parental, no produce ni el polisacárido acídico ni el glucano β1-3. En los dos casos mencionados, el glucano se purificó del medio de cultivo luego de eliminar las células por centrifugación y por simple adsorción en una columna de carbón activado y desorbiéndolo con etanol 30%. Koizumi y col (124) utilizaron una de las mutantes superproductoras del glucano (R. phaseoli AHU 1133) para la preparación con un alto grado de eficiencia, de la especie de grado de polimerización 17 de la familia de glucanos β1-2 cíclicos. El sobrenadante del cultivo se cromatografió dos veces consecutivas en una columna de carbón activado y la especie de grado de polimerización 17 (CyS-A) se aisló por HPLC. Estos autores estudiaron el efecto de CyS-A sobre la solubilidad en agua de diversas moléculas que tienen una baja solubilidad en solventes acuosos, basándose en la propiedad de ocluir substancias o formar complejos, que otros homopolisacáridos cíclicos (las

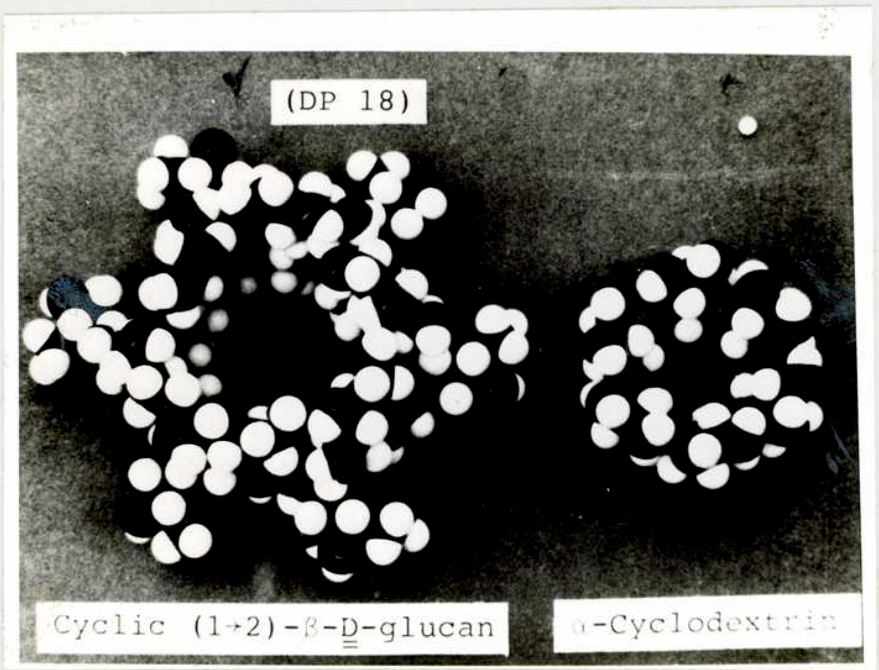

Fig. 6: Modelos de un glucano β1-2 cíclico y una α-ciclodextrina (10).

ciclodextrinas) poseen (198,15). En la Fig. 6 se presenta un esquema de la estructura tridimensional de una α-ciclodextrina de 6 unidades y un glucano β1-2 (o ciclosoforosa) de 18 unidades, cuya estructura cíclica sería capaz de ocluir substancias, formando complejos. La formación de estos complejos de inclusión sería al igual que los que forman las ciclodextrinas muy útiles en la investigación y en la industria.

La producción de glucanos β1-2 cíclicos parece ser una propiedad particular de las bacterias de la familia Rhizobiacea: Rhizobium y Agrobacterium. Se ha descripto que Acetobacter xylinum utiliza "in vitro" UDP-glucosa para la formación de un polímero de alto peso molecular, no celulósico. Este polímero dio por hidrólisis parcial soforosa (el disacárido: glucosa β1-2 glucosa). El trisacárido y oligosacáridos mayores obtenidos por hidrólisis parcial fueron resistentes a muy diversas enzimas, lo que es muy característico de uniones glicosídicas β1-2 (183). Pequeñas cantidades de un polímero con características similares se pudo aislar de las células de A. xylinum (63). Recientemente Amemura y col. (12) encontraron en once cepas de Acetobacter ensayadas, la presencia en el medio de cultivo de oligosacáridos β1-2 dentro de los productos de bajo peso molecular excretados. La cantidad producida fue de 2-25 mg / 100 ml, y el grado de polimerización fue de 6 a 42. A diferencia de los glucanos producidos por Rhizobium y Agrobacterium, los producidos por Acetobacter tuvieron una estructura lineal (12). Sorprendentemente se ha descripto la presencia en el medio de cultivo de glucanos con uniones glicosídicas β1-2 en Xanthomonas campestris, Xanthomonas phaseoli, Xanthomonas cryzae, E. coli y Klebsiella pneumoniae (11). Sin embargo, la forma molecular (cíclica, lineal o con ramificaciones) y la distribución de los perfiles de los componentes con distinto grado de poli-

merización fue característica para cada género. Xanthomonas produjo glucooligosacáridos β1-2 lineales con grados de polimerización de 8 a 20 y un glucano β1-2 cíclico de G.P.=16 y que contenía una unión 1→6 y una unión por molécula. E. coli y K. pneumoniae produjeron glucanos con ramificaciones 0-6 y G.P.=10 a 15 y una cepa de K. pneumoniae produjo glucanos β 1-2 lineales con G.P.=6 a 20.

En el espacio periplásmico de E. coli se han descripto compuestos denominados "oligosacáridos derivados de membrana", que están formados fundamentalmente por oligosacáridos de glucosa con uniones glicosídicas β1-2 y menores cantidades de β 1-6, las cuales están substituidas con Sn-1-fosfoglicerol, fosfoetanolamina y O-succinilo (201). El esqueleto sacarídico de estos compuestos periplásmicos parece ser similar a los glucooligosacáridos descriptos en E. coli y K. penummoniae presentes en los medios de cultivo, descriptos en el párrafo anterior. Una posibilidad es que sólo la porción sacarídica de los "oligosacáridos derivados de membrana" se libere al medio.

I.3.c. Glucanos β1-3

Algunas cepas de Agrobacterium y Rhizobium son capaces de producir glucanos β1-3, aunque la producción de este polisacárido es genéticamente inestable (96,83,13). Se lo encuentra firmemente adherido a las células y se lo puede extraer con NaOH 0,5 N (90). Estos glucanos son insolubles en agua. Una suspensión de glucanos β 1-3 en agua se aclara cuando se la calienta a 54°C y forma un firme gel a más altas temperaturas (142). Algunas cepas producen una pequeña cantidad del glucano β1-3 o mutan espontáneamente produciéndolo en altas cantidades (96,83). Estas mutantes pueden detectarse

fácilmente en cajas de Petri con azul de anilina, ya que los glucanos β1-3 forman un complejo de color azul con este compuesto, coloreando a la colonia (160,96). La capacidad de síntesis de estos glucanos parece estar relacionada a la presencia del exopolisacárido acídico. Las mutantes que producen el glucano insoluble en cantidades considerables, dejan de producir el exopolisacárido acídico soluble como lo hacía la cepa salvaje (89).

Aún no se conoce la función biológica de este glucano insoluble. Sin embargo, ha sido objeto de numerosos estudios físicos y químicos dado que se le han encontrado varios usos industriales de considerable importancia (89). Por otro lado, algunos resultados han demostrado que el glucano β1-3 posee una actividad antitumoral "in vivo", contra ciertos tumores alogénicos (89).

I.3.d. Glucanos α1-4 y glucanos β1-4

Matthysse y col. (151) mostraron por microscopía electrónica, la formación de fibrillas cuando las células de A. tumefaciens se unen a células de zanahoria en cultivo. Estas fibrillas, las cuales eran producidas por las bacterias, rodearon a las mismas y las anclaron a las paredes de las células en cultivo. Por tinción con calcoflúor, hidrólisis ácida, digestiones enzimáticas y espectroscopía de infrarrojo, se demostró que estas fibrillas estaban formadas por celulosa (glucano β1-4). La síntesis de celulosa fue acompañada por agregación de bacterias. Este fenómeno había sido observado previamente en varios géneros de bacterias Gram negativas (62). Por otro lado, también se ha descripto la síntesis de celulosa en R. trifolii (161). Como se mencionó en la sección dedicada a la unión de A. tumefaciens a la planta, se han publicado diversos trabajos referidos a la síntesis de celu-

losa en respuesta a la unión A. tumefaciens a células de zanahoria o tabaco en cultivo (60,148).

Las células de Rhizobium generalmente contienen en la fracción soluble glucógeno (glucano α1-4). Se lo ha encontrado en R. leguminosarum, R. phaseoli, R. trifolii y R. meliloti (256). Cuando la fuente de carbono y energía del medio se empieza a agotar, el glucógeno es utilizado por las células. Su degradación es aumentada por la adición de $SO_4(NH_4)_2$ permitiendo así la síntesis del material celular. Hay que tener en cuenta que la presencia de otro material de reserva en las células (polihidroxibutirato, PHB) favorece la supervivencia de las bacterias (256). La presencia de glucógeno ha sido detectada citoquímicamente por microscopía electrónica de las inclusiones presentes en los bacteroides de Rhizobium (50). El glucógeno aislado de diferentes especies de Rhizobium dio colores característicos con iodo y las cadenas tuvieron un largo de 10 a 12 (256). Este largo de cadena es comparable a los descriptos para glucógenos presentes en varias especies bacterianas, que tienen un activo metabolismo de este polisacárido (257).

I.3.e. Lipopolisacáridos

El lipopolisacárido (LPS) es parte de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, tiene actividad inmunogénica y existe una gran variación en su composición y estructura entre diferentes especies bacterianas (172). El lipopolisacárido consiste en el lípido A., el cual está unido a un pequeño núcleo de oligosacárido ("core"), el cual está unido a su vez a la cadena de polisacárido que constituye el antígeno O. La unidad repetitiva del antígeno O de Salmonella anatum está formada por el trisacárido

manosil-ramnosil-galactosa (175). La biosíntesis del lipopolisacárido ha sido extensivamente estudiada en Salmonella (172).

Zevenhuizen y Scholten-Koerselman (258) aislaron una fracción extraida con fenol-agua de alto peso molecular y no precipitable con cetavlon de las células de varias cepas de R. leguminosarum, R. meliloti, R. phaseoli y R. trifolii, que resultó ser el LPS. Esta fracción contuvo una cantidad similar (15-30%) de hexosas y una cantidad muy variable de 6-deoxihexosas (3-5% a 30%). Por otro lado, el porcentaje de 2-ceto-3-deoxioctonato (KDO) fue de 3-5% y 1-3% de aminoazúcares. Adicionalmente se encontraron cantidades apreciables de ácidos urónicos (5-10%).

En cuanto a la porción lipídica, los lípidos A analizados de varias cepas de R. leguminosarum, R. phaseoli, R. trifolii y R. meliloti resultaron tener similares contenidos de los ácidos grasos β-OH-$C_{14:0}$, β-OH-$C_{15:0}$, β-OH-$C_{16:0}$ y β-OH-$C_{18:0}$ (260). Otros autores encontraron que los principales ácidos grasos del LPS de R. trifolii fueron los ácidos β-OH mirístico y β-OH-palmítico y menores cantidades de $C_{16:0}$, $C_{16:1}$ y $C_{18:1}$ (193). Planqué y col. (175) encontraron que el mayor componente de bacterias y bacteroides de R. leguminosarum fue el ácido β-OH-mirístico y los componentes minoritarios, los ácidos β-OH-palmítico, β-OH-esteárico y dos ácidos grasos no identificados. Debido a que se encontró un bajo contenido en fosfato (0,5%) y en hexosaminas (1-2%) comparado con los valores para el LPS de bacterias de la familia Enterobacteriaceae y de acuerdo al perfil de ácidos grasos obtenidos, los LPS de Rhizobia y Enterobacteria serían diferentes.

El análisis de los carbohidratos de la porción sacarídica del LPS reveló que está formada por azúcares neutros, hexosaminas, 2-ceto-deoxioctonato y ácidos urónicos (260). Aunque en proporciones variables, la mayor

parte de las cepas analizadas contuvieron glucosa, galactosa, manosa, ramnosa, fucosa, y pequeñas cantidades de azúcares O-metilados. Sólo en algunas cepas se encontró heptosa. Los azúcares ramnosa, fucosa y manosa formarían parte del antígeno O, mientras que galactosa, glucosa, los ácidos urónicos y el KDO formarían parte del "core" (40).

Recientemente (194), se ha estudiado más en detalle el lípido A del LPS de varias cepas de R. trifolii que difieren en su capacidad de nodulación. Los resultados obtenidos revelaron similitudes entre el lípido A del LPS de Rhizobium y el de Enterobacteriaceae, pero ciertas peculiaridades respecto de los substituyentes. Por otro lado, se encontraron algunas diferencias estructurales entre el lípido A de cepas de R. trifolii que son capaces de nodular (nod^+) y cepas incapaces de nodular (nod^-) (194). Esta diferencia correspondió fundamentalmente a la naturaleza y al tipo de unión de los ácidos grasos unidos a grupos amida.

De lo descripto en el párrafo anterior se puede concluir que el lípido A del LPS de Rhizobium tendría un rol en la simbiosis. Por otro lado, la cadena del polisacárido del LPS tendría alguna función en la especificidad del proceso de infección. Esto último estaría de acuerdo con la observación de que antígenos O derivados de cepas nod^+ y nod^- difirieron en su composición de azúcares (145,144,195).

Dos mutantes de R. phaseoli aisladas por inserción del transposón Tn5 indujeron la formación de hilos de infección abortivos que presentaban una morfología alterada y de nódulos anormales. Este fenotipo estuvo relacionado a la ausencia de una fracción de LPS (164). Carlson (39) analizó el LPS aislado por hidrólisis ácida suave de varias cepas de R. leguminosarum, R. trifolii y R. phaseoli, por electroforesis en geles de poliacrilamida y

encontró una gran heterogeneidad en cuanto al tamaño y composición de las diferentes bandas.

El lípido A de A. tumefaciens es similar al de otras bacterias gram negativas (159,16) lo que coincide con la similitud encontrada entre los sitios antigénicos de los lípidos A de varias especies de bacterias gram negativas (159). No existe hasta el momento mucha información en cuanto a la estructura de la porción sacarídica del LPS de A. tumefaciens; los estudios sobre la misma se refirieron a un aspecto más biológico. El LPS cumpliría una función importante en la adherencia planta-bacteria (163,246,152,17). La unión en términos del LPS estaría determinada por el cromosoma bacteriano (25).

I.3.f. Polisacárido tipo ácido teicurónico

Recientemente Ugalde y col. (236), encontraron que dos cepas de R. meliloti, que difieren en la sensibilidad a dos fagos (F20 y 16B) y en la aglutinabilidad con una lectina aislada de semilla de alfalfa, diferían también en la síntesis "in vitro" de un polisacárido que tenía un alto contenido de galactosa. Este producto se formaba por transferencia de ^{14}C-galactosa desde el nucleótido UDP-(^{14}C)galactosa a un residuo de alto peso molecular precipitable por TCA presente en las membranas internas utilizadas como preparación enzimática (235). El producto se solubilizaba luego de una hidrólisis ácida suave (235). Un estudio más detallado de la estructura del polisacárido demostró que contenía la unidad repetitiva -galacturonosil (1-3)galactosil (1-4-) (Fig. 7) (47). Por otro lado, este producto fue capaz de funcionar como aceptor de grupos metilo provenientes del dador S-adenosil-

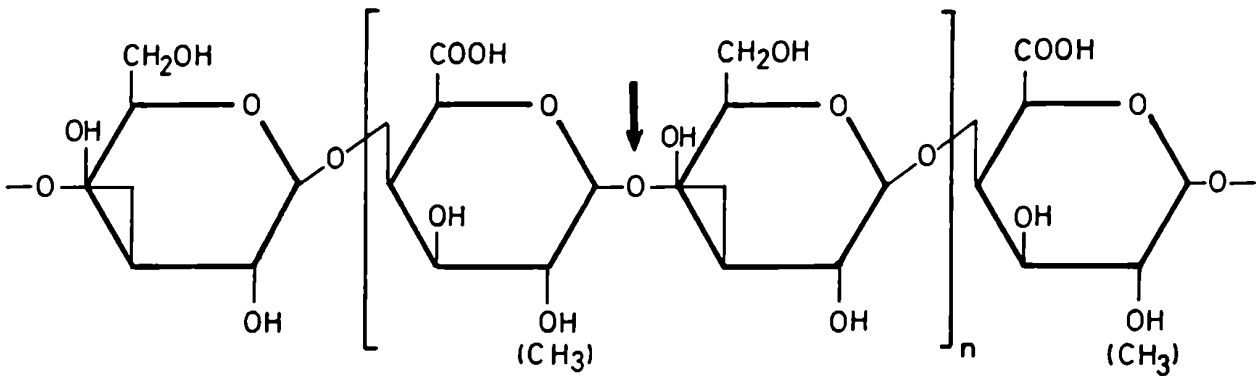

Fig. 7: Estructura del polisacárido tipo ácido teicurónico de R. meliloti. La unidad repetitiva se muestra en corchetes. La flecha indica que la unión es resistente al ácido (47).

metionina. Esta reacción fue catalizada por una actividad soluble de metiltransferasa (47), la cual fue muy específica para dicho sustrato y capaz de metilar la posición 2 del residuo galacturonosil.

El polisacárido sintetizado "in vitro" formado por la unidad repetitiva que muestra la Fig. 7 es del ácido tipo teicurónico. Este tipo de polisacárido había sido hasta entonces descripto solamente en bacterias Gram positivas (242). La presencia del polisacárido tipo ácido teicurónico en R. meliloti correlaciona con la interacción con una aglutinina aislada de alfalfa, la sensibilidad al fago 16B y con una mayor competitividad por los sitios de nodulación de la cepa que es capaz de sintetizarlo. Este polisacárido produciría cambios en la superficie celular, modificando sus propiedades. Una vez más se adjudica alguna función en la interacción planta-bacteria a una molécula con un alto contenido en carbohidratos.

I.3.g. Otros oligosacáridos

Watanabe y col. (243), describieron la presencia de kojihexaosa dentro de los carbohidratos sintetizados y liberados al medio de cultivo por R. japonicum, cepa 561. El hexasacárido estaba constituido únicamente por residuos de D-glucosa unidos en α-D-(1-2). Este, es uno de los pocos trabajos que describen a un glucooligosacárido o glucano con uniones glicosídicas α1-2 como producto natural. Sin embargo, la producción de este oligosacárido podría no ser una propiedad general de diferentes cepas de R. japonicum. Posteriormente Hisamatsu y col. (98) aislaron tres oligosacáridos no reductores de la fracción de compuestos neutros de bajo peso molecular del medio extracelular de R. meliloti J7017, dentro de los cuales se encontraba el glu-

cano β1-2 cíclico. Luego de separar a los oligosacáridos mencionados del glucano β1-2 cíclico por HPLC, en una columna de fase reversa, los mismos fueron analizados por metilación y Resonancia Magnética Nuclear de H^+. Este estudio indicó que se trataba de α-D-glucopiranosil α-kojitriósido, α-D-glucopiranosil α-kojitetraósido, y α-D-glucopiranosil α-kojipentaósido (residuos de glucosas unidas en α 1-2, un kojioligosacárido con una unión α 1-1 en el extremo reductor, o sea tipo trealosa). La producción de estos oligosacáridos no reductores parece ser una característica general de Rhizobium (98). Hasta ahora no han sido descriptos en Agrobacterium.

Recientemente, por estudios sobre cultivos de varias cepas de Rhizobium en diferentes medios definidos, se ha demostrado que el disacárido trealosa es uno de los carbohidratos mayoritarios en cepas de crecimiento lento de R. japonicum y probablemente en otras especies de Rhizobium (216). Los bacteroides de R. japonicum también acumularon trealosa en su citoplasma incrementándose el contenido de este disacárido con la edad de la planta (216). La trealosa podría tener un rol durante alguna del ciclo de vida de la bacteria fuera del nódulo.

I.4. Ciclodextrinas

En las últimas dos décadas ha habido un continuo interés sobre los mecanismos de reacción y la química de la ciclodextrina glicosiltransferasa, así como el estudio de la propiedades físicas y las aplicaciones como complejos de inclusión de las moléculas de ciclodextrinas (198,15). Estos oligosacáridos son otra clase de homopolisacáridos, que al igual que los glucanos β1-2 sintetizados por Rhizobiacea, poseen una estructura macrocíclica. La

enzima que sintetiza las ciclodextrinas fue aislada fundamentalmente de los medios de cultivo de Klebsiella pneumoniae. La misma enzima es capaz de catalizar reacciones de ciclización, acoplamiento y desproporcionalización (26,27). Las reacciones catalizadas por la ciclodextrina glicosiltransferasa pueden resumirse de la siguiente manera (29,28):

ciclización

1) $G_n \rightleftharpoons G_{(n-G_x)} + cG_x$

acoplamiento

desproporcionalización

2) $G_n + G_m \rightleftharpoons G_{(n-G_x)} + G_{(m+G_x)}$

donde G_n, G_m y G_x son cadenas (1-4)-α-D-glucopiranósicas con n, m y x unidades, respectivamente, y cG_x es una ciclomaltopoliosa (ciclodextrina que contiene x residuos). Los productos que se formaron con mayor velocidad son la ciclohexamilosa y la cicloheptaamilosa, después de una degradación inicial de la amilosa a cadenas con menos de 100 unidades a través de reacciones de acortamiento de cadenas.

Se propuso que la ciclodextrina glicosiltransferasa posee dos sitios activos, uno de ellos une al sustrato y otro al aceptor (26). La ciclización es un caso especial de desproporcionalización (ver reacción 2), en la cual el extremo no reductor de una cadena sirve como aceptor. De acuerdo a esto, el sustrato para la ciclización debe unirse a los dos sitios mencionados de la enzima (28). En la Fig. 6 se muestra la conformación que adoptaría una ciclo-

dextrina de 6 unidades (10). Se puede observar las diferencias entre este oligosacárido cíclico y un glucano β1-2 cíclico de 18 unidades.

La enzima responsable de la formación de las ciclodextrinas es soluble y extracelular. Esta es una primer diferencia con la(s) enzima(s) que sintetiza(n) el glucano β1-2 cíclico, como se verá en el presente trabajo de investigación. Por otro lado, el mecanismo de síntesis es sustancialmente diferente (ver sección III.11.).

I.5. Comentario sobre la biosíntesis de polisacáridos en otros sistemas

La biosíntesis del antígeno O del LPS de bacterias Gram negativas involucra la participación de intermediarios sacarídicos unidos a lípidos de membrana (249). El lípido fue identificado como el undecaprenol. Los monosacáridos son transferidos secuencial y específicamente desde los correspondientes nucleótido-azúcares al lípido, formándose la unidad repetitiva. En la cara externa de la membrana ocurre la polimerización de las unidades repetitivas (184). El polisacárido así formado se transfiere a un aceptor final que es el lípido A-núcleo. Mecanismos similares de síntesis se describieron para el péptidoglicano de Staphylococcus aureus y Micrococcus lysodeikticus (92) y para el xantano de Xanthomonas campestris (110).

En el caso del xantano, al ser un polisacárido que se libera al medio de cultivo no existe transferencia a un aceptor final. Como ya se mencionó en la sección I.3.a. el EPS de R. meliloti (216,229,228) y A. tumefaciens (214) se sintetizaría también a través de intermediarios lipídicos.

Un mecanismo muy diferente al anterior fue propuesto para la síntesis de los dextranos en Leuconostoc mesenteroides (189-191). Los dextranos son

homoglucanos que contienen fundamentalmente uniones glicosídicas α1-6 con ramas de distinta longitud unidas en α1-3. La síntesis "de novo" de los dextranos ocurre por transferencia de glucosa a partir de sacarosa al extremo reductor de una cadena creciente de dextrano, e involucra una unión covalente entre un resto glucosilo y otro dextranosilo y el sitio activo de la enzima (dextransucrasa). La liberación de la enzima se produce cuando la concentración de fructosa (producto de la polimerización) aumenta, ya que actúa como aceptor, dando leucrosa y un dextrano con fructosa en el extremo reductor.

Otro homopolisacárido formado por α-D-gucanos es el glucógeno. En este caso los restos glucosilo están conectados entre sí mediante uniones glicosídicas α1-4 con puntos de ramificación, en α1-6. El glucógeno está presente en una gran variedad de organismos eucariotes y procariotes.

La síntesis de este polisacárido utilizando aceptores involucra dos etapas:

1) Alargamiento de las cadenas α1-4 de estos aceptores mediado por la glucógeno sintetasa (134).

2) Ramificación de las cadenas alargadas mediada por la enzima ramificante (48,241).

La glucógeno sintetasa tiene una alta afinidad por el glucógeno y esta propiedad ha sido aprovechada para la purificación de la enzima de muchos sistemas.

En cuanto a la síntesis "de novo" del glucógeno, en base a resultados obtenidos en hígado de rata (127,128) y Escherichia coli (21,20), Krisman ha postulado que ocurriría por transferencia de glucosa a una proteína aceptora, cuya reacción sería catalizada por una glucógeno sintetasa iniciadora.

En una segunda etapa los glucanos α1-4 formados servirían como aceptores para la glucógeno sintetasa y la enzima ramificante. Sin embargo, la principal evidencia de la unión carbohidrato-proteína residía en la precipitabilidad por TCA y la sensibilidad al tratamiento con enzimas proteolíticas, lo cual no demuestra una unión covalente entre el polisacárido y la proteína sino más bien una fuerte asociación entre ellos. Posteriormente Blumenfeld y col. (32) estudiaron la síntesis "de novo" del glucógeno en músculo cardíaco de rata. Estos autores encontraron una actividad enzimática que incorporaba radioactividad a una fracción insoluble en TCA y a otra fracción soluble en TCA pero insoluble en etanol y otra actividad enzimática que incorporaba glucosa a un aceptor exógeno (glucógeno). Por estudios comparativos de ambas actividades se llegó a la conclusión que estaban localizadas en la misma enzima. Dado que se detectó actividad formadora de glucógeno en geles de poliacrilamida en condiciones nativas, en ausencia de aceptor exógeno se propuso que la enzima y el aceptor endógeno estarían fuertemente asociados.

También analizaron los productos de la reacción por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas y desnaturalizantes y demostraron la existencia de bandas de mayor movilidad que eran precursoras de otras de menos movilidad. Se trataba de glucanos α 1-4 de diferentes tamaños unidos a proteína endógena, lo cual coincidía con el modelo antes postulado por Krisman.

La síntesis de almidón en tubérculo de papa también involucraría en una primer etapa la formación de una glucoproteína que serviría en una etapa posterior como aceptora para el alargamiento de glucanos α 1-4 a partir de ADP-Glc, UDP-Glc ó Glc-1-P (130,222,221).

I.6. Objetivos de esta tesis

En el año 1963, Dedonder y Hassid (61) demostraron que por incubación de una preparación particulada de dos cepas de R. japonicum con UDP-(^{14}C)glucosa se sintetizaba un glucano radioactivo que estaba constituído fundamentalmente por uniones glicosídicas β1-2 (más del 80% de las uniones). También se encontraban presentes algunas uniones β1-3 y β1-6. Dichos autores propusieron que el glucano sintetizado "in vitro" estaría relacionado al glucano ya descripto anteriormente en A. tumefaciens (111,85), y al aislado del medio de cultivo de R. japonicum (61). La preparación enzimática que utilizaron consistió en una suspensión de un sedimento de 105.000 x g de un extracto crudo libre de células obtenido por ultrasonicación y centrifugación a 15.000 x g. El sistema enzimático requería Mg^{++} o Mn^{++}, tenía un pH óptimo de 7,5 y un Km para UDP-Glc de 3.10^{-4}M.

El objetivo de esta tesis consistió en dilucidar el mecanismo de biosíntesis de los glucanos β1-2 en Rhizobiaceae. Existia un antecedente obtenido en el laboratorio: la incubación con UDP-(^{14}C)glucosa de células permeabilizadas con EDTA de R. meliloti formaba un producto radioactivo acuosoluble que resultó ser el glucano β1-2. El trabajo de esta tesis comenzó por la extensión de estos estudios a A. tumefaciens y el análisis en forma comparativa de los productos formados "in vitro" por R. meliloti y A. tumefaciens. Después de esta primer etapa se buscaron los posibles compuestos intermediarios de la biosíntesis utilizando distintas preparaciones enzimáticas de A. tumefaciens.

II. MATERIALES Y METODOS

II.1. Organismos utilizados

Las cepas utilizadas de R. meliloti fueron las siguientes: R. meliloti R41 (121), y R. meliloti 102F51 obtenida de Nitragin Co., Milwaukee, Wis. Las cepas utilizadas de Agrobacterium tumefaciens fueron las siguientes: A. tumefaciens LBA 4011; A. tumefaciens LBA 4001 (122), obtenidas del laboratorio del Dr. P.J.J. Hooykaas, State University of Leiden, Leiden, The Netherlands; A. tumefaciens A723, A1011, A1020, A1038, A1045, ME2, ME116 descriptas anteriormente (82,67) y cedidas por el Dr. E. Nester (Department of Microbiology SC-42, University of Washington, Seattle, WA, 98195, USA).

II.2. Condiciones de cultivo

R. meliloti se cultivó en extracto de levadura-manitol (136), que contenía: K_2HPO_4 0,05%, $SO_4Mg.7H_2O$ 0,02%, ClNa 0,02%, manitol 1% y extracto de levadura 0.1%. Por cada litro de medio de cultivo se agregó 1 ml de una solución 0,67% p/v de Cl_3Fe y 0,42% v/v de ClH (c). El cultivo se realizó a 28°C con buena aereación (agitación rotatoria: 200 rpm) y las bacterias se cosecharon cuando la absorvancia a 660 nm fue de aproximadamente 0,7 (24 a 48 hs de cultivo).

A. tumefaciens se cultivó en un medio que contenía triptona 0,5% y extracto de levadura 0,3%. En el caso de las bacterias que presentan resistencia a kanamicina (A1011, A1020, A1038 y A1045) o carbenicilina (ME2, ME116) el medio se adicionó de 100 µg/ml del antibiótico correspondiente. El cultivo se realizó a 28°C con agitación rotatoria (200 rpm) y las bacterias

se cosecharon cuando la absorbancia a 660 nm se encontraba entre 1,1 y 1,4 nm (16 a 20 horas de cultivo).

II.3. Preparaciones enzimáticas

II.3.a. Células permeabilizadas: Las células obtenidas por centrifugación a 4°C se resuspendieron en EDTA-Tris 10 mM, pH 8 y se congelaron y descongelaron 8 veces (80).

II.3.b. Membranas internas: Para la purificación de las membranas internas se siguió el método previamente descripto (171,200) con algunas modificaciones. Las células cosechadas por centrifugación a 4°C provenientes de 2 lt de cultivo se lavaron con 150 ml de buffer Tris-ClH 30 mM, pH 8,2. Después de centrifugar a 16.000 x g durante 10 min, las células se resuspendieron en 100 ml de sacarosa 20% (p/p) en buffer Tris-ClH 30 mM, pH 8,2 y EDTA 3 mM, pH 7,2. Esta suspensión de células se trató con 100 µg/ml de lisozima (grado I, Sigma) durante 30 min, a la temperatura del baño de hielo, con tapa cerrada y con agitaciones suaves y periódicas. Posteriormente, las células tratadas con la lisozima se centrifugaron a 16.000 x g durante 30 min y el precipitado obtenido se resuspendió en 25 ml de sacarosa 20% (p/p) en agua, Cl_2Mg.6 mM y una punta de espátula de deoxirribonucleasa I (Wortington o Sigma). La preparación obtenida se pasó 2 ó 3 veces por la celda de una French Press para romper las células. Las células que no se rompieron se descartaron por centrifugación a 3.000 x g durante 15 min. El sobrenadante que contenía el citosol y las membranas externa e interna se centrifugó a 100.000 x g durante 15 horas. El sobrenadante (fracción citosólica) se descartó y el precipitado resuspendido en 15 ml (volumen final) de sacarosa

20% (p/p) en buffer Tris-ClH 30 mM, pH 8.2 se colocó en la parte superior de un tubo de ultracentrífuga correspondiente al rotor SW-25 que contenía 2 colchones de sacarosa de diferente densidad: 10 ml de sacarosa 55% (p/p) y 35 ml de sacarosa 44% (p/p) preparados en el mismo buffer. Después de centrifugar a 68.000 x g durante 16 hs, las membranas internas se recuperaron de la interfase superior (interfase 44%-20%). La interfase inferior contiene las membranas externas. La solución de sacarosa que contiene las membranas internas se centrifugó a 100.000 x g durante 4 horas. El precipitado se resuspendió en Tris-ClH 30 mM, pH 8,2 hasta una concentración de proteínas de 40 mg/ml.

II.4. Aislamiento del glucano β1-2 de las células

Las células provenientes de 1 lt de cultivo en fase estacionaria ($Abs._{660}$=1,1-1,4 nm) se resuspendieron en 15 ml de TCA 1% (concentración final). Luego de 10 min a temperatura ambiente se centrifugó a 3.000 x g. El precipitado se trató por segunda vez con TCA 1% siguiendo el mismo procedimiento. Los sobrenadantes se juntaron y después de neutralizar con NH_4OH se concentraron en un rotavapor con vacío a 37°C (155).

Para separar el glucano β1-2 de otros componentes celulares, el material extraido se pasó por una columna de Bio-Gel P4 (78x1,8 cm) junto con ferritina como marcador del volumen de exclusión, Cl_2Co, como marcador del volumen de inclusión y 5.000 cpm de un estándar de ^{14}C glucano β1-2. La columna se eluyó con acetato de piridina 0,1 M, pH 5,5. Se colectaron fracciones de 1 ml (flujo: 0,2 ml/min).

El contenido de carbohidratos de alícuotas de 50 μl de cada fracción se

midió por el método de fenol-sulfúrico (70), y la radioactividad se determinó midiendo alícuotas de 300 µl de cada fracción con Bray en un contador de centelleo.

II.5. Medición de la actividad enzimática

II.5.a. Células permeabilizadas: La mezcla de incubación contenía Tris-ClH 50 mM, pH 8,2, Cl_2Mg 12 mM, 2-mercaptoetanol 20 mM, $2.5.10^5$ cpm de UDP-(^{14}C)glucosa (270 Ci/mol) y aproximadamente 0,7 mg de la preparación enzimática en un volumen total de 50 µl. Las incubaciones se realizaron a 30°C durante 30 min. La reacción se detuvo por calentamiento a 100°C durante 2 min y las células se eliminaron por centrifugación en centrífuga clínica.

II.5.b. Membranas internas: La mezcla de incubación contenía Tris ClH 50 mM, pH 8,2, Cl_2Mg.10 mM, 60 a 90 kcpm de UDP-(^{14}C)glucosa (320 Ci/mol) y 100 a 200 µg de proteínas de las membranas internas en un volumen total de 50 µl. La incubación se realizó a 10°C a diferentes tiempos y la reacción se detuvo por calentamiento a 100°C durante 1 min. Se agregaron 300 µl de agua y después de centrifugar a 1.500 x g durante 10 min, el sobrenadante y el precipitado se procesaron separadamente. El sobrenadante se pasó por una columna pequeña de 0,6 x 4 cm de DEAE-Sephadex G-25. La columna se lavó con 1,5 ml de agua. El percolado contiene la fracción neutra y soluble. La radioactividad se determinó contando una alícuota del percolado con solución de Bray en un contador de centelleo líquido. En la columna queda retenido el UDP-(^{14}C)glucosa remanente.

El precipitado obtenido como se explicó, se resuspendió en TCA 5% y se filtró a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C). Después de

varios lavados con TCA 5%, seguidos de metanol, los filtros se secaron y la radioactividad retenida en los mismos se midió en un contador de centelleo líquido con tolueno PPO-dimetil POPOP. En algunos casos, el precipitado se lavó varias veces con agua y se lo sometió a diversos tratamientos como se verá en las secciones siguientes.

Alternativamente, la reacción se detuvo por la adición de 1 ml de TCA 10% como se describirá en la sección II.9.b. para electroforesis en geles de poliacrilamida.

II.6. Tratamientos químicos

II.6.a. Hidrólisis ácida total: Los compuestos radioactivos se suspendieron en una solución de ClH 1 N en un volumen final de 200 µl y se los mantuvo a 100°C en un baño de agua en ebullición durante 4 hs. El ClH se eliminó en un rotavapor con bomba de vacío con tres agregados sucesivos de 200 µl de agua. Finalmente los productos de hidrólisis total se resuspendieron en un volumen mínimo de agua.

II.6.b. Hidrólisis ácida parcial: La muestra se suspendió en 200 µl de ClH 0,5 N y se calentó a 100°C durante 20-25 min. El ClH se eliminó con una bomba de vacío con agregados sucesivos de agua. La muestra seca se resuspendió en un mínimo volumen de agua.

II.6.c. Reducción con borohidruro de sodio: Los oligosacáridos se solubilizaron en 100 µl de agua y se agregaron 8 mg de borohidruro de sodio. Luego de 12 hs a temperatura ambiente y en la oscuridad, la solución se neutralizó con una resina de intercambio catiónico (DOWEX 50W-X8, mesh 20-50, forma H^+). Después de eliminar la resina se llevó a seco y el borato se eli-

minó por agregado y secado de metanol repetidas veces (80). Los compuestos reducidos se sometieron posteriormente a hidrólisis ácida total.

II.6.d. Permetilación de sacáridos: La permetilación de los oligosacáridos se realizó por el método de Hakomori (87). La muestra seca se trató durante 2 hs, con 300 µl del reactivo de Hakomori, el cual se obtiene por reacción del dimetilsulfóxido con HNa (87). La reacción se realizó en atmósfera de N_2 y con agitación. Se agregaron 200 µl de ioduro de metilo y se siguió en las mismas condiciones durante 90 min. La reacción se detuvo por el agregado de 1,5 ml de agua y 1,5 ml de cloroformo. En la fase orgánica se encuentran los productos permetilados. La fase acuosa se lavó 2 veces con 1,5 ml de cloroformo. Las fases orgánicas se juntaron y se lavaron 3 veces con 1 volumen de agua. Las muestras se secaron con una corriente de aire caliente y se sometieron a hidrólisis ácida total. Los monosacáridos permetilados se analizaron por cromatografía en capa delgada de sílica gel.

II.7. Tratamientos enzimáticos

II.7.a. Glicosidasas: Las incubaciones con las diferentes glicosidasas se realizaron en dos buffers diferentes: buffer acetato 10 mM, pH 5 y buffer fosfato 10 mM, pH 7 en un volumen total de 50 µl. La temperatura de incubación fue 30°C, el tiempo de 16 a 20 horas y la reacción se detuvo por agregado de 30 µl de metanol. Las proteínas que precipitaron en estas condiciones se eliminaron por centrifugación. El sobrenadante se sembró en un papel de cromatografía Schleicher & Schüll Nr.2043 a de 12x2,5 cm junto con un estándar de glucosa (0,2 µmoles). Las tiras de papel se cromatografiaron en forma ascendente con isopropanol, ácido acético, agua (27:4:9), como solvente según

lo describieron Ugalde y col. (237). La glucosa se reveló por calentamiento del papel a 150°C con una plancha eléctrica (5). La zona de la glucosa y el resto se contó separadamente en un contador de centelleo líquido con tolueno PPO-dimetil POPOP.

Se utilizaron las siguientes enzimas: α amilasa de Bacillus (Sigma), α-glucosidasa tipo III (Sigma), amiloglucosidasa (Sigma), quitinasa (Sigma) y β glucosidasa (Miles o Calbiochem-Behring). Se utilizó jugo de intestino del caracol Helix Pomatia (glusulasa) de Endo Laboratories y preparado en el laboratorio según lo describió De Stevens (59).

II.7.b. Proteasa: El precipitado obtenido después de centrifugar la mezcla de reacción según se explicó en la sección II.5.b., se lavó varias veces con agua y se lo incubó en presencia de buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7.5 y Cl_2Ca 10 mM, con 2 mg de proteasa tipo XIV de Streptomyces griseus (Pronasa-Sigma) durante 16 horas a 30°C. La reacción se detuvo por agregado de 1 ml de TCA 5%. Por centrifugación se obtuvo un precipitado (fracción insoluble) y un sobrenadante que contiene los productos de proteólisis solubles. Este sobrenadante se lavó varias veces con éter etílico para eliminar el TCA, y se concentró en un rotavapor con bomba de vacío.

II.8. Cromatografía

II.8.a. Filtración por geles.

i) Bio Gel P4. Se utilizó una columna de 30x2,5 cm rellenna con Bio Gel P4 (Mesh 220-400) y equilibrada con acetato de piridina 0,1 M, pH 5. La elución se realizó con el mismo solvente. Se colectaron fracciones de 1 ml y alícuotas de 0,5 ml se contaron en un contador de centelleo líquido con solu-

ción de Bray.

Como ya se explicó en la sección II.4., una columna rellena con Bio Gel P4 de 78x1,8 cm se utilizó para separar los componentes del material extraido con TCA% de las células. La columna se eluyó con el mismo solvente mencionado en el párrafo anterior con un flujo de 0,2 ml/min.

Una columna de (200x2 cm) rellena con la misma resina se utiizó para separar los componentes de la fracción soluble obtenida como se describe en la sección II.5.a. y parcialmente purificada en una columna de Bio Gel P4 de 30x2 cm como se menciona en esta misma sección. La columna se eluyó a 50°C con acetato de piridina 0,1 M, pH 5. Se colectaron fracciones de 1 ml y el flujo fue de 0,1 ml/min.

ii)Bio Gel P2. Se utilizó una columna de 30x2,5 cm rellena con Bio Gel P2 (mesh 200-400). La columna se equilibró y se eluyó con acetato de piridina 0,1 M, pH 5. Se colectaron fracciones de 1 ml y una alícuota de cada fracción se contó con solución de Bray en un contador de centelleo líquido.

iii) Sephadex G-100. Se utilizó una columna de 30x1,5 cm rellena con con Sephadex G-100 y equilibrado con Tris-ClH 50 mM, pH 8,2. La elución se realizó con el mismo solvente, a 5°C y 0,23 ml/min. Se colectaron fracciones de 1 ml y una alícuota de 200 μl de cada fracción se contó con solución de Bray en un contador de centelleo. A otra alícuota de 200 μl de las fracciones se le midió la radioactividad asociada a compuestos insolubles en TCA según el método de Krisman y Barengo (129). Los papeles embebidos en TCA en donde se encuentran retenidos los compuestos insolubles en TCA se contaron con tolueno-PPO-dimetil POPOP en el centelleador.

iv) Sephadex G-150. Se utilizó una columna de 30 x 1.5 cm rellena con Sephadex G-150 equilibrada y eluida a 5°C con Tris-ClH 10 mM, pH 8,2, Nonidet

P-40 0,2%. El flujo fue de 0,15 ml/min y se colectaron fracciones de 0,5 ml. Una alícuota de 50 µl de las fracciones se contó con solución de Bray en un centelleador. A otra alícuota de 50 µl se le midió la radioactividad asociada a compuestos insolubles en TCA por el método de Krisman y Barengo (129).

II.8.b Cromatografía en papel. Las cromatografías fueron descendentes con papeles Schleicher and Schüll 2043a de 60 cm de largo y anchos variables. Los tiempos de desarrollo cromatográfico se indican en cada caso. En el caso del análisis de los productos formados por las diferentes glicosidasas la cromatografía fue ascendente y las dimensiones de los papeles fueron de 12x2,5 cm como ya se explicó en la sección II.7.a. Los solventes utilizados fueron:

(A) butanol, piridina, agua (4:3:4) (133);

(B) butanol, piridina, agua (6:4:3) (109);

(C) isopropanol, ácido acético, agua (27:4:9) (233);

(D) propanol, nitrometano, agua (5:2:4) (215);

(E) nitrometano, ácido acético, etanol, agua saturado con ácido bórico (8:1:1:1) (188).

II.8.c. Cromatografía en capa delgada. Se utilizaron placas de sílica gel de 0,25 mm (DC-Fertigplatten Kiesegel 60; Merck). La cromatografía se desarrolló en forma ascendente hasta el frente tres veces consecutivas dejando secar la placa entre cada una de ellas. El solvente utilizado fue benceno, acetona, amoníaco, agua (50:200:1,35:1) (43).

II.8.d.) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los productos neutros recuperados en el percolado de la DEAE-Sephadex se sometieron a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una columnna Lichrosorb-NH_2 104 (250x4,6 mm) (Merck & Co., Inc., Rahway, N.J.) y elución

en forma isocrática con acetonitrilo, agua (70:30). La velocidad de flujo fue de 1 ml/min a 600 lb/in^2. Se colectaron fracciones de 0,5 ml y el total del contenido de las fracciones se contó con Bray en el centelleador.

II.9. Electroforesis

II.9.a. Electroforesis en papel. Se utilizaron tiras de papel Schleicher and Schüll 2043a de 60 cm de largo y de no más de 17 cm de ancho. Los papeles se embebieron en el buffer de corrida y se sumergieron en el líquido refrigerante (Varsol o tetracloruro de carbono). Los buffers de corrida que se utilizaron y las condiciones empleadas fueron las siguientes:

(F) borato de sodio 50 mM, pH 9,2. Tiempo de corrida: 3-4 hs a 20 v/cm (203,79);

(G) carbonato de sodio/bicarbonado de sodio 0,2 M, pH 10, 4 hs a 25 v/cm;

(H) ácido fórmico 5% (pH 2). Tiempo de corrida: 4 hs a 25 v/cm;

(I) acetato de piridina 1,2 M, pH 6,5.

II.9.b. Electroforesis en geles de poliacrilamida. Se utilizaron condiciones y sistemas previamente descriptos (81,217). Se realizó una electroforesis vertical en una dimensión en condiciones desnaturalizantes rellenando las placas de vidrio separadas por un espacio de 1,2 mm, con un gradiente contínuo de poliacrilamida de 5 a 15% de 200 mm, como gel separador o de poro fino. El gel de poro grueso fue de 3.5% de poliacrilamida y el buffer superior e inferior de corrida fue Tris-glicina 25 mM, pH 8,8. El buffer superior tenía SDS 0,2%. La corrida se efectuó a voltaje constante (2 watts) durante el recorrido de las proteínas a través del gel de poro grueso y a 4

watts durante el resto de la corrida.

Las muestras de membranas internas (200-300 µg de proteínas) se precipitaron con TCA 10% a 5°C durante toda la noche. Después de descartar el sobrenadante obtenido por centrifugación, se eliminó cuidadosamente el líquido remanente por inversión de los tubos y secado con papel Kimwipe. Los precipitados se resuspendieron en 30 µl de una solución que contenía: Tris-ClH 50 mM, pH 6,8, SDS 2%, mercaptoetanol 2%, urea 8 M y bromofenol azul. Las muestras que se encontraban en un pH ácido por la presencia de restos de TCA se llevaron al pH de viraje del indicador (bromofenol azul) con hidróxido de sodio y la solubilización se completó por calentamiento de las muestras a 100°C durante 1,5-3 min.

II.10. Dosaje de proteínas y carbohidratos

Las proteínas se midieron por el método de Lowry y col. (141). Tanto las muestras como el estándar de albúmina bovina utilizado para realizar las curvas de calibración se trataron con hidróxido de sodio 0,5 N a 100°C durante 1 min previo a la determinación.

El contenido en carbohidratos de las muestras se midió por el método de fenol-sulfúrico (70). A una alícuota de cada una de las muestras (50 µl) se le agregaron 350 µl de agua en tubos de 14 x 1,5 cm. Se agregaron 50 µl de fenol 80% y se agitó. Se agregaron 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado y se agitó rápida y vigorosamente. Luego de 10 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 490 nm. Las curvas de calibración se realizaron con glucosa.

II.11. Métodos de detección en cromatografías y electroforesis

II.11.a. Detección de proteínas en los geles de poliacrilamida.

i) Las proteínas en los geles se detectaron por coloración con Coomassie blue R-250 1,5% (p/v) en metanol, ácido acético, agua (45,5:45,5:9) durante 12-14 horas y se decoloraron con metanol, ácido acético, agua (20:7:73).

ii) Ocasionalmente las proteínas se detectaron por tincion con plata en medio alcalino (169).

II.11.b. Detección de carbohidratos en cromatografías y electroforesis. Los azúcares reductores en el papel de cromatografía o electroforesis se detectaron por tinción con nitrato de plata en medio alcalino (230).

II.11.c. Detección de la radioactividad en las cromatografías y electroforesis.

i) La radioactividad en las cromatografías y electroforesis en papel se detectó con un radiocromatógrafo (Packard - Modelo 7200).

ii) La radioactividad en los geles de poliacrilamida se detectó por fluorografía de acuerdo a los métodos descriptos por Bonner and Laskey (33). Los geles se lavaron 2 veces consecutivas con dimetilsulfóxido, durante 30 min con agitación. Posteriormente se trataron con 4 volúmenes de una solución que contenía 22,2% (p/v) de 2,5-difenil oxazol (PPO) en dimetilsulfóxido y 3 hs con agitación en 20 volúmenes de agua. Los geles se secaron al vacío sobre un papel Whatman 3 MM previamente humedecido en agua y se expusieron sobre una película Kodak XO Mat durante 15 a 25 días a -70°C.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

III.1. Antecedentes obtenidos en el laboratorio

En el laboratorio, Tolmasky y col. han estudiado la biosíntesis de los exopolisacáridos (EPS) que R. meliloti y A. tumefaciens excretan al medio de cultivo (229,228,214). La preparación enzimática utilizada para su estudio consistía en células permeabilizadas con EDTA, las cuales eran incubadas con UDP-(^{14}C)glucosa en presenca de Cl_2Mg, mercaptoetanol a un pH 8,2. En estas condiciones se formaban los lípidofosfoazúcares que intervienen en la biosíntesis de los EPS, los cuales son insolubles en la fase acuosa y solubles en solventes orgánicos. Cuando Tolmasky y col. analizaron por filtración por geles la fracción soluble obtenida después de centrifugar la mezcla de reacción, encontraron que R. meliloti formaba -en dichas condiciones de incubación- oligosacáridos neutros de bajo peso molecular.

Los estudios estructurales realizados por Tolmasky y col. llevaron a la conclusión que los oligosacáridos sintetizados "in vitro" por R. meliloti son los glucanos β1-2 cíclicos previamente descriptos por otros autores.

El presente trabajo de investigación comenzó por el estudio de los compuestos acuosolubles formados "in vitro" por distintas preparaciones enzimáticas de A. tumefaciens en presencia del nucleótido-azúcar UDP-(^{14}C)glucosa y su comparación con aquellos formados por R. meliloti.

III.2. Caracterización de los productos de reacción formados "in vitro" por A. tumefaciens. Comparación con los formados por R. meliloti

III.2.a. Filtración por geles. Cuando se incubaron las células permeabilizadas de A. tumefaciens con UDP-(^{14}C)glucosa y en presencia de Mg^{++} se formaron substancias radioactivas que se incluyeron en una columna de Bio-Gel P4 (Fig. 8-A, fracciones 10-30). La radioactividad que se encontró en las fracciones posteriores corresponde a UDP-(^{14}C)glucosa que no reaccionó y posiblemente a otros azúcares neutros y/o cargados formados durante la incubación. No se detectaron polisacáridos de alto peso molecular como son los exopolisacáridos (EPS). Los productos de la reacción se excluyeron en una columna de Bio-gel P2 (Fig. 8-B). Esto implica que el peso molecular de estos compuestos se encuentra entre 2.000 y 4.000 aproximadamente. Se obtuvieron resultados similares con enzimas provenientes de A. tumefaciens y de R. meliloti.

III.2.b. Hidrólisis ácida. Por hidrólisis ácida total y cromatografía en papel con el solvente B de los compuestos presentes en las fracciones 10-30 de la Fig. 8-A sólo se detectó la presencia de (^{14}C)-glucosa.

La hidrólisis ácida parcial del glucano de A. tumefaciens dio compuestos que se comportaron como una serie homóloga en cromatografía en papel con el solvente B. Uno de estos compuestos migró como la glucosa estandar y el compuesto que correspondería al disacárido migró como la soforosa (glucosa β1-2 glucosa) estandar (Fig. 9-A). El mismo perfil se obtuvo cuando se cromatografiaron los productos de hidrólisis parcial del glucano de R. meliloti

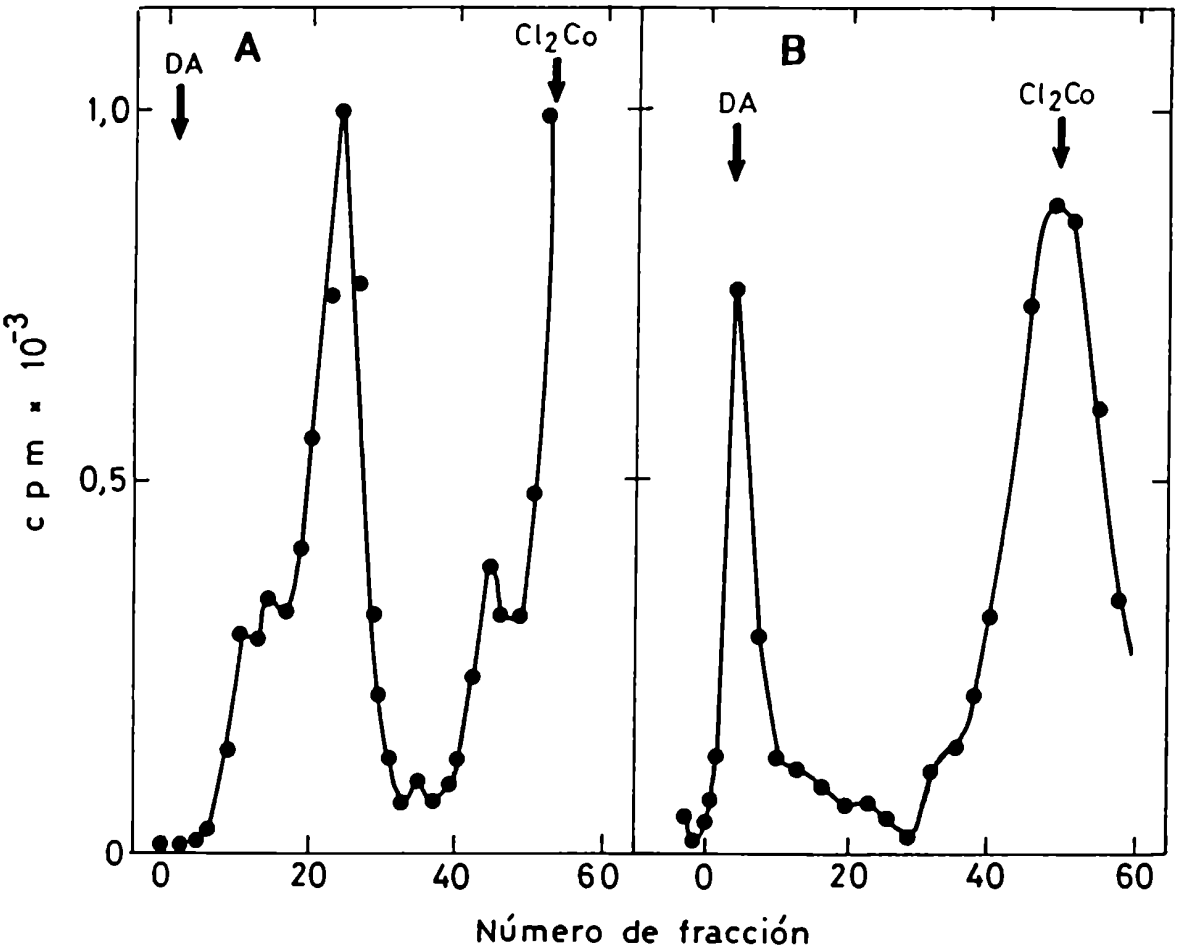

Figura 8: Filtración por geles de los productos de reacción. La mezcla estandar de reacción se incubó con las células permeabilizadas de A. tumefaciens LBA 4011, durante 30 min, como se explicó en la sección II.5.a. Después de la centrifugación, la fracción soluble se cromatografió en una columna de Bio Gel P4 (220-400 mesh, 30 x 2,5 cm) en las condiciones descriptas en la sección II.8.a.i. (A), y en una columna de Bio Gel P2 (200-400 mesh) (sección II.8.a.ii) (B). D.A., dextrano azul; Cl_2Co, cloruro de cobalto.

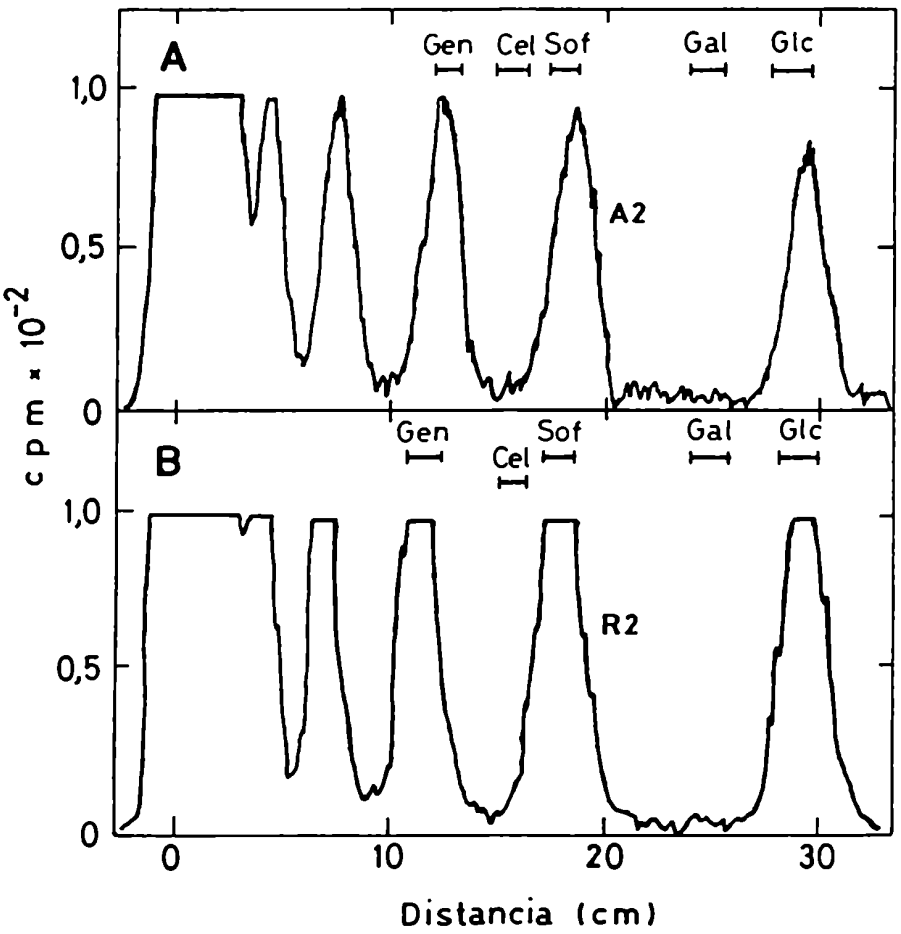

Figura 9: Hidrólisis ácida parcial de los productos de reacción. Los productos obtenidos por incubación de las células permeabilizadas de A. tumefaciens LBA4011 (A) y R. meliloti R41 (B) con UDP-(^{14}C)glucosa (sección II.5.a.) fueron separados de los compuestos de bajo peso molecular por filtración por geles (fracciones 10-30, fig. 8-A) y sometidos a hidrólisis ácida parcial (ver sección II.6.b.). Los productos de la hidrólisis fueron analizados por cromatografía en papel con el solvente B, durante 63 horas. Los estándares utilizados fueron: Cel, celobiosa; Glc, glucosa; Gal, galactosa; Gen, gentiobiosa y Sof, soforosa. A2 y R2 corresponden a los disacáridos obtenidos por hidrólisis ácida parcial de los productos de A. tumefaciens y R. meliloti respectivamente.

(Fig. 9-B).

Para confirmar la identidad del disacárido obtenido por hidrólisis parcial, el compuesto que migró como soforosa se eluyó del papel con agua y se sometió a electroforesis en papel con el solvente F. Los disacáridos correspondientes a A. tumefaciens y a R. meliloti migraron como la soforosa estandar (Fig. 10).

III.2.c. Reducción con borohidruro de sodio. Los glucanos obtenidos luego de incubar las células permeabilizadas de A. tumefaciens con UDP-(^{14}C)glucosa y separados de los compuestos de bajo peso molecular por filtración por geles (sección III.2.a.) fueron sometidos a reducción con borohidruro de sodio e hidrólisis total. Por cromatografía en papel con el solvente E de los productos de la hidrólisis se obtuvo solamente (^{14}C)glucosa. No se detectó la presencia de (^{14}C)sorbitol (Fig. 11). Este resultado sugiere que los glucanos no tienen (^{14}C)glucosa con el grupo reductor libre.

III.2.d. Permetilación. Los glucanos radioactivos de A. tumefaciens se sometieron a permetilación por el método de Hakomori y se hidrolizaron totalmente. Los monosacáridos permetilados obtenidos después de dicho tratamiento se analizaron por cromatografía en capa delgada (ver sección II.8.c.). Por autoradiografía sólo se detectó una banda que migró a la misma posición que un estándar de 3,4,6-tri-O-metilglucosa y no se detectó la presencia de tetra-O-metilglucosa.

Este resultado confirma la existencia unicamente de uniones 1-2 en los oligosacáridos. Por otro lado, la ausencia del derivado tetrametilado indicaría que los glucanos carecen de una glucosa terminal no substituída.

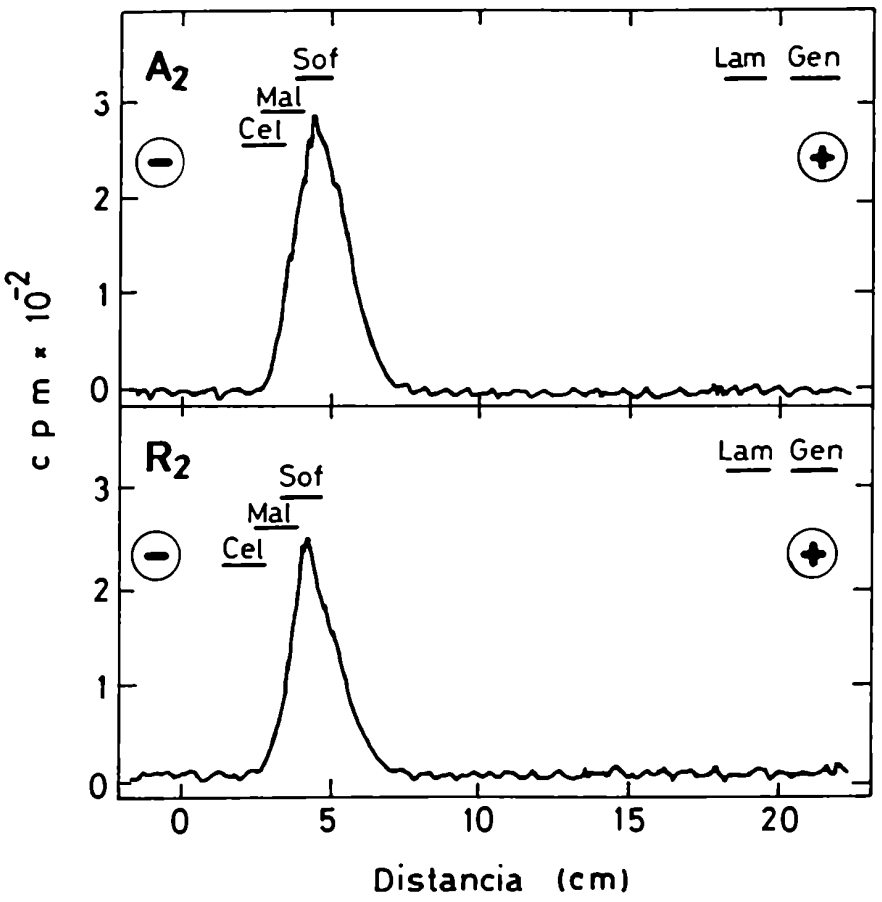

Figura 10: Electroforesis en papel de los "disacáridos" obtenidos por hidrólisis ácida parcial.
Los compuestos A2 y R2 de la Fig. 9 fueron eluidos del papel con agua y sometidos a electroforesis en papel con el solvente F en las condiciones descriptas en la sección II.9.a. Los estándares utilizados son Cel, celobiosa; Mal, maltosa; Sof, soforosa; Lam, laminaribiosa y Gen, genciobiosa. (+) Cátodo; (-) ánodo.

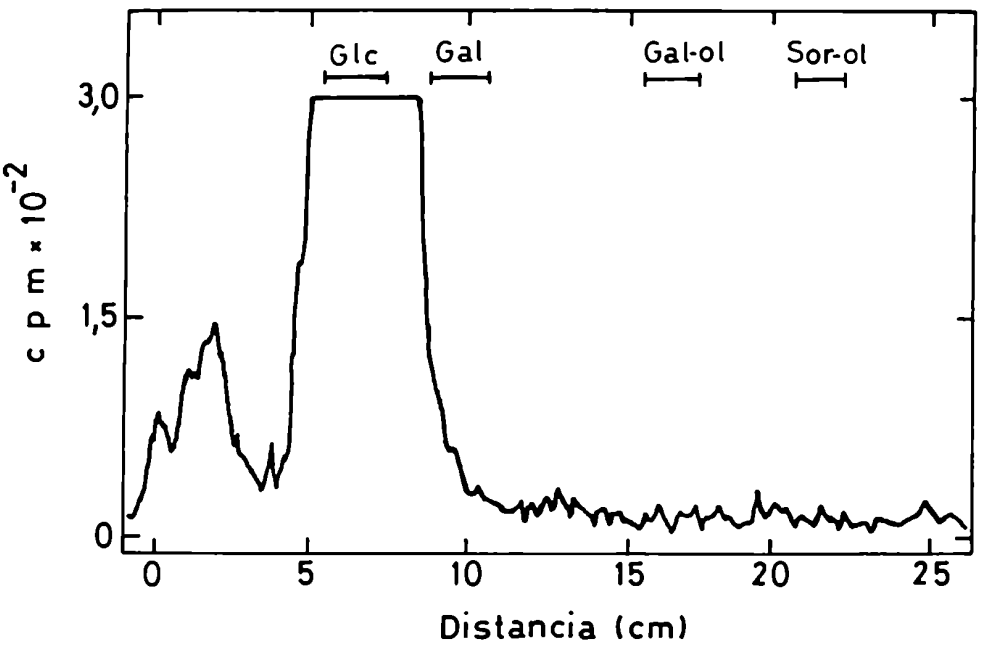

Figura 11: Reducción con borohidruro de sodio e hidrólisis total. Los glucanos (fracciones 10-30, fig. 8A) de A. tumefaciens LBA 4011 fueron reducidos con borohidruro de sodio y sometidos a hidrólisis total (sección II.6.c.). Los productos de hidrólisis se cromatografiaron en papel con el solvente E durante 48 hs. Glc, glucosa; Gal, galactosa; Gal-ol, galactitol; Sor-ol, sorbitol.

La ausencia de una glucosa con el extremo reductor libre y de una glucosa terminal no substituída indica una analogía estructural entre los glucanos β1-2 sintetizados por Rhizobium y Agrobacterium y liberados al medio (252,64) y los glucanos β1-2 sintetizados "in vitro" por A. tumefaciens. Estos oligosacáridos tendrían una estructura macrocíclica.

III.2.e. Separación de los distintos componentes presentes en el producto de la reacción

Los glucanos β1-2 sintetizados "in vitro" y separados de compuestos de bajo peso molecular por filtración por geles se cromatografiaron en diferentes sistemas con la finalidad de aumentar la resolución y separar el producto en sus componentes.

i) Cromatografía en papel: El producto cromatografiado en papel con el solvente D mostró la presencia de varios componentes tanto en la preparación de glucanos β1-2 de A. tumefaciens como en la de R. meliloti (Fig. 12). Sin embargo, se puede observar que los perfiles cromatográficos de ambas familias de glucanos fueron diferentes.

ii) Filtración por geles: El producto se cromatografió en una columna de Bio-Gel P4 de 2 m longitud y 2 cm de diámetro en las condiciones descriptas en Materiales y Métodos. En esta cromatografía se pudo determinar la heterogeneidad de los pesos moleculares de los glucanos β1-2 de A. tumefaciens y compararlos con los glucanos sintetizados por R. meliloti. La cromatografía de los glucanos β1-2 marcados con (^{14}C) se realizó con un estándar interno de un hidrolizado parcial de glucanos β1-2 marcados con ^{3}H (tritio) de R.

meliloti (Fig. 13, A-1 y B-1). Graficando el grado de polimerización (G.P.) vs. el log del volumen de elución (VE) de los productos de hidrólisis se obtuvo una recta (Fig. 13, A-2 y B-2). Asumiendo que el volumen de elución de un oligosacárido lineal es equivalente a uno del mismo grado de polimerización (G.P.) pero cíclico, por extrapolación se pudo estimar el grado de polimerización de los glucanos β1-2. Los compuestos más abundantes formados por Rhizobium y Agrobacterium correspondieron para A. tumefaciens a grados de polimerización 14, 15 y 16 y otros menos abundantes de hasta 24, y para R. meliloti de 14.5, 17, 19 y otros menos abundantes de hasta 25.

Como se explicó en el párrafo anterior la determinación de los pesos moleculares se realizó asumiendo que un oligosacárido cíclico tiene un comportamiento análogo en filtración por geles a uno lineal. Esto no se debe cumplir en forma estricta ya que ambos glucanos pueden poseer conformaciones espaciales diferentes. Por consiguiente, los grados de polimerización son sólo aproximados.

Los valores de grados de polimerización obtenidos para los glucanos β1-2 sintetizados "in vitro" fueron muy similares a aquellos correspondientes a los glucanos que R. meliloti y A. tumefaciens sintetizan "in vivo" y liberan al medio de cultivo según lo describieron otros autores (64,123).

iii) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): Como se describirá en la sección III.5., las membranas internas purificadas de A. tumefaciens sintetizan el glucano β1-2 cíclico utilizando UDP-(^{14}C)glucosa como sustrato en las condiciones descriptas en la sección II.5.b. Para la separación por HPLC de los componentes de los glucanos β1-2 sintetizados por A. tumefaciens y su comparación con los de R. meliloti, se utilizó el producto sintetizado por la

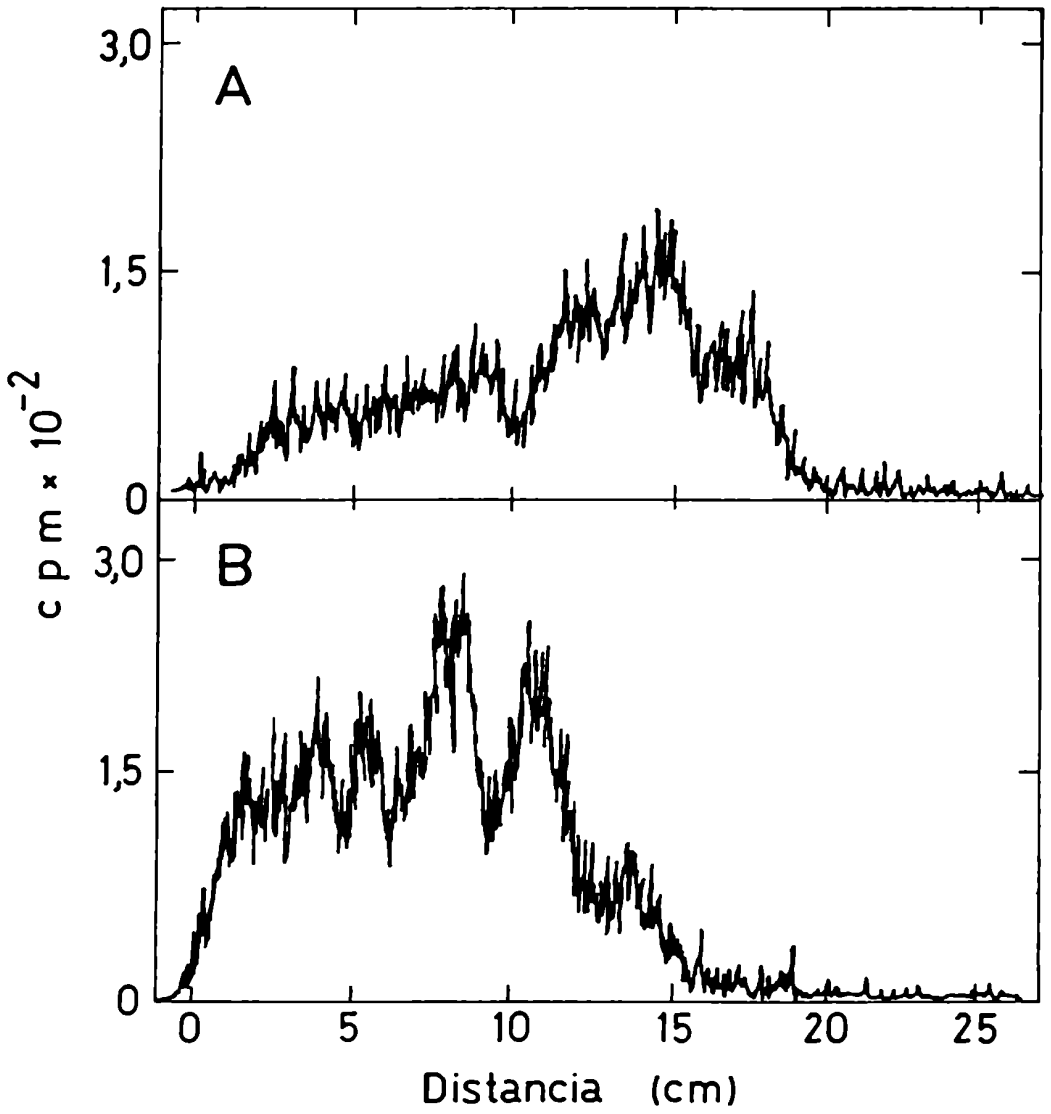

Figura 12: Cromatografía en papel de los productos de reacción. Los glucanos β1-2 de A. tumefaciens LBA4011 (fracciones 10-30, Fig. 8A) se cromatografiaron en papel con el solvente D durante 4 1/2 días (A). Paralelamente se cromatografiaron los glucanos β1-2 de R. meliloti R41 (B).

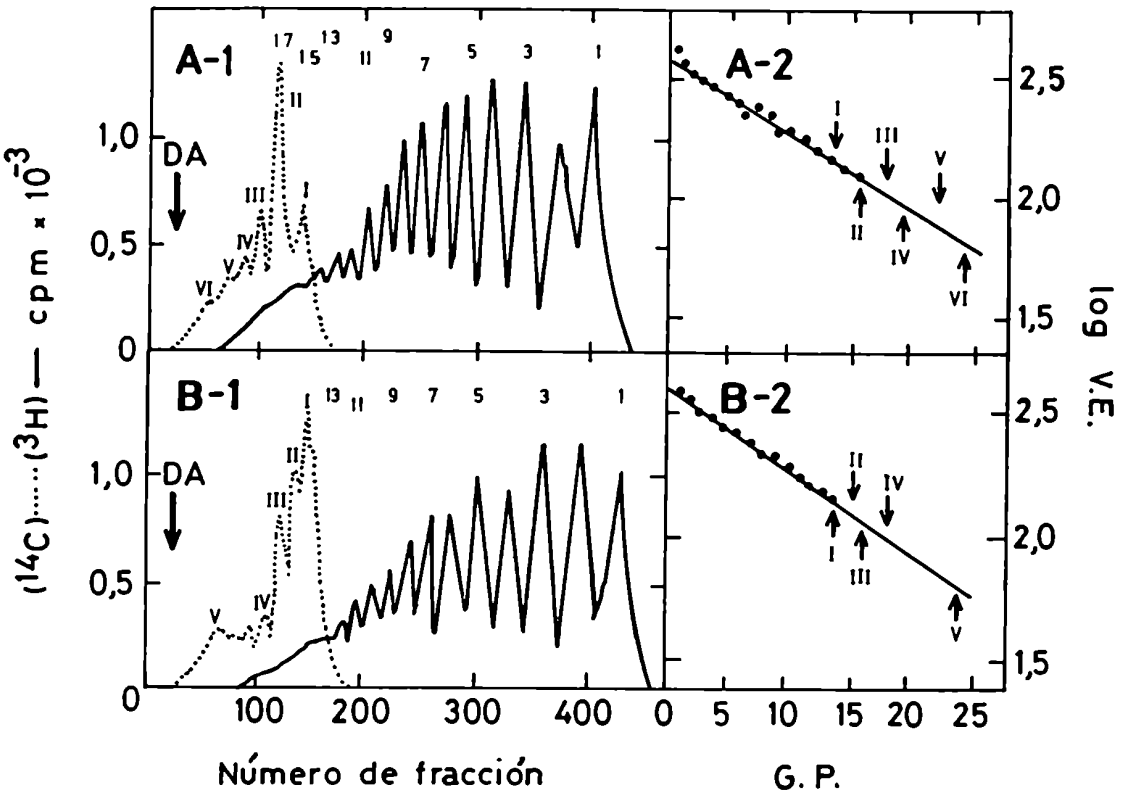

Figura 13: Cromatografía de los glucanos de R. meliloti y A. tumefaciens y sus productos de hidrólisis.
Los ^{14}C-glucanos β 1-2 de R. meliloti (líneas punteadas, A-1) y de A. tumefaciens (líneas punteadas B-1) se cocromatografiaron con los productos de hidrólisis parcial de los glucanos de R. meliloti marcados con tritio (^{3}H) (línea llena, A-1 y B-1) en una columna de Bio Gel P4 (200 x 2 cm). Las condiciones están descriptas en la sección II.8.a.i. Los números en la parte superior indican los grados de polimerización de los productos de hidrólisis parcial. La flecha que indica DA muestra la posición donde eluye el dextrano azul. Los números romanos corresponden a los distintos componentes de las preparaciones de glucanos β 1-2. Los paneles A-2 y B-2 muestran los gráficos de grado de polimerización (G.P) vs. log. volumen de elución (V.E.).

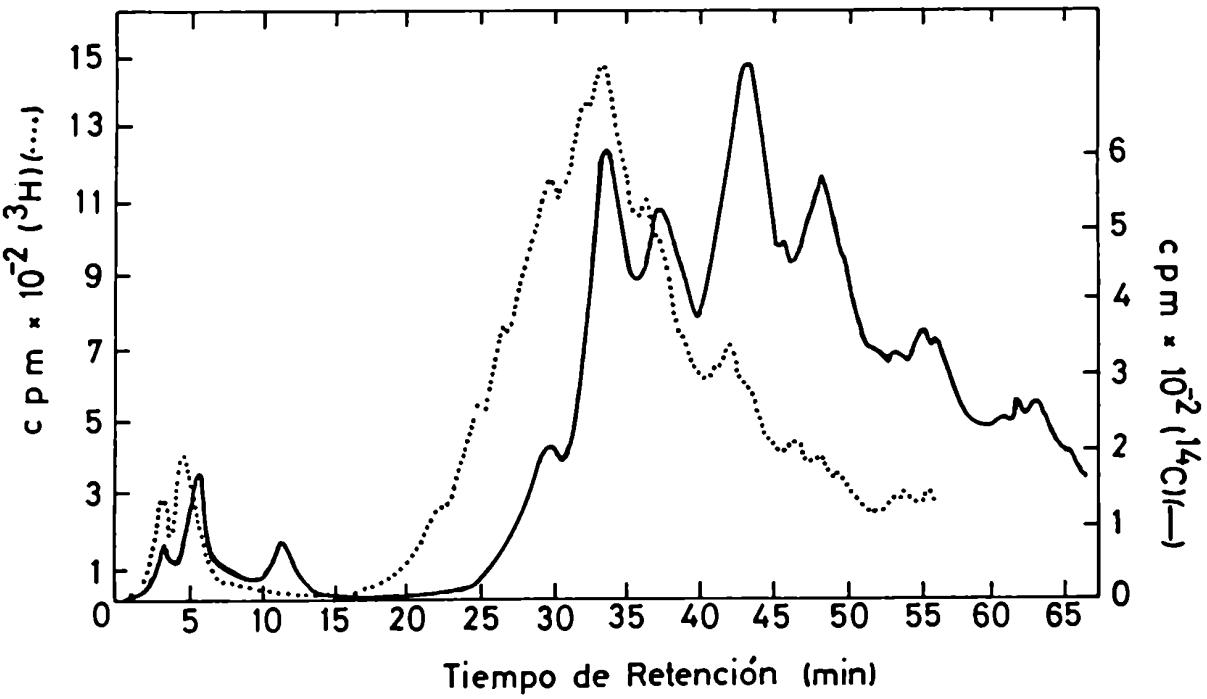

Figura 14: HPLC de los glucanos de R. meliloti y de A. tumefaciens. Los glucanos β1-2 de A. tumefaciens (línea punteada) obtenidos como se describe en la sección II.5.b. se sometieron a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en las condiciones descriptas en la sección II.8.d. En línea llena se muestra el perfil de elución de un estándar tritiado del glucano β1-2 de R. meliloti.

preparación enzimática de membranas internas y parcialmente purificado por DEAE-Sephadex como se explicó en la sección II.5.b. Debido a la reproducibilidad de este tipo de cromatografía los productos sintetizados por ambas bacterias se cromatografiaron separadamente pero los perfiles obtenidos se graficaron conjuntamente para fines comparativos. Fue posible observar por HPLC, diferencias en los tiempos de retención de ambas familias de glucanos. La especie más abundante del glucano de Rhizobium (línea llena, Fig. 14) tuvo un tiempo de retención de 43 min, lo que implicaría en el tipo de columna de HPLC usada, un peso molecular mayor que el correspondiente a la especie más abundante del glucano de A. tumefaciens (línea punteada, Fig. 14) cuyo tiempo de retención fue de 33 min.

III.2.f. Acción de las glicosidasas. Se ensayaron varias enzimas (glicosidasas) para la liberación de glucosa a partir del glucano obtenido "in vitro" con células permeabilizadas (sección II.5.a.). Las condiciones de incubación y la forma de medir la actividad de cada enzima se describen en la sección II.7.a.

No se observó ningún efecto sobre el glucano, a ninguno de los dos diferentes pH (5 y 7), con: α-amilasa, α-glicosidasa, amiloglucosidasa, quitinasa y β-glucosidasa. Un extracto de intestino del caracol Helix pomatia tuvo un pequeño efecto sobre el glucano. Reaislando el glucano que no se degradó y tratándolo nuevamente con el jugo de caracol se obtuvo un resultado similar (Tabla I). Esto descartó que la enzima haya actuado sobre algún contaminante y no sobre el glucano nativo. Por preincubación de la enzima de caracol a 30°C, durante 1,3 y 5 horas la actividad medida en idénticas condiciones se mantuvo constante, lo cual descarta inactivación de la enzima

durante la incubación. Por lo tanto, la enzima ejerce una acción lenta sobre el glucano.

También se ensayó la capacidad de las enzimas de degradar un hidrolizado parcial del glucano β1-2, luego de eliminar la glucosa presente en el hidrolizado por cromatografía en papel. Se encontró que el jugo de caracol comercial fue muy activo en degradar los oligosacáridos (Tabla I). Un extracto de intestino de caracol preparado en el laboratorio dio resultados similares. Una β-glucosidasa de almendras actuó parcialmente sobre el hidrolizado. La cromatografía en papel con el solvente C de los productos de hidrólisis antes y después del tratamiento con la β-glucosidasa mostró que sólo el disacárido soforosa (glucosa β1-2 glucosa) fue degradado (Fig. 15).

Las enzimas mencionadas fueron ensayadas sobre soforosa (glucosa β1-2 glucosa) no radioactiva. La formación de glucosa se observó por cromatografía en papel con el solvente C. El jugo de caracol y la β-glucosidasa fueron claramente activos en degradar la soforosa. Mucha menos actividad se encontró en la amiloglucosidasa y la quitinasa y no se encontró actividad en las enzimas restantes.

Como se describió en los párrafos anteriores para la enzima de jugo de caracol, la formación de glucosa a partir de un hidrolizado parcial del glucano fue mucho más rápida que a partir del glucano nativo. Esto puede deberse a la naturaleza cíclica del glucano β1-2; el jugo de caracol tendría una actividad considerable de exo-glucanasa y una baja actividad de endo-glucanasa, necesaria esta última para comenzar la degradación de estructuras cíclicas.

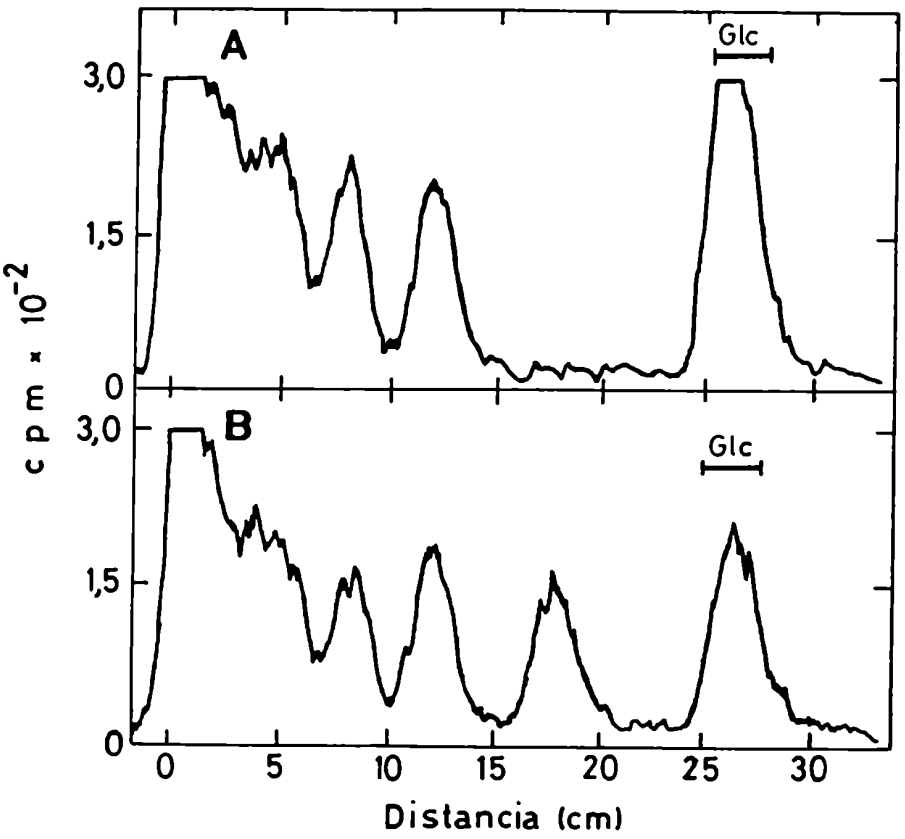

Figura 15: Tratamiento de los productos de hidrólisis ácida parcial del glucano β1-2 con β-glucosidasa.
Una muestra de glucano β1-2 parcialmente hidrolizada (aproximadamente 10 x 10^3 cpm) se trató con β-glucosidasa a pH 5 (sección II.7.a.). Después de precipitar las proteínas con metanol, el sobrenadante se cromatografió en papel (60 cm de largo) con el solvente C, 2 1/2 días (A). Otras muestra del hidrolizado sin incubar con la enzima se cromatografió como control (B). Glc, glucosa.

Los resultados descriptos en la sección III.2. demuestran que las células permeabilizadas de A. tumefaciens sintetizan "in vitro" glucanos β1-2 con grados de polimerización que varían entre 14 y 24. Debido a que no se detectó una glucosa terminal no substituida y radioactiva y una glucosa reductora, los glucanos β1-2 podrían tener una estructura cíclica. Los glucanos β1-2 cíclicos han sido encontrados en los medios de cultivo de Rhizobium y Agrobacterium. La naturaleza cíclica de dichos glucanos ha sido demostrada por Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masa (64).

TABLA I

Acción de las glicosidasas

Enzima	Sustrato	Porcentaje de glucosa liberada
Jugo intestinal de caracol (comercial)	Glucano β1-2 nativo	20
	El mismo, 2da. incubación	35
	Hidrolizado parcial del glucano	70
β-glucosidasa (Miles)	Glucano β1-2 nativo	0
	Hidrolizado parcial del glucano	20

El sustrato (aproximadamente 2.000 cpm) se incubó con la enzima (0,8 mg), buffer acetato 10 mM, pH 5 durante 20 horas, bajo atmósfera de tolueno y a 30°C.

III.3. Síntesis "in vivo" del glucano β1-2

Como se describió en la sección I.3.b., el glucano β1-2 se encuentra en las células muy probablemente en el espacio periplásmico. También es posible aislarlo del medio de cultivo luego de separar los otros componentes como el EPS y el octasacárido. Recientemente, Miller y col. (155) aislaron el glucano β1-2 celular por tratamiento de las células con TCA 1%. Siguiendo el mismo procedimiento y cromatografiando el material extraido con TCA en una columna de Bio-Gel P4 (ver sección II.4.) se obtuvo un perfil similar al obtenido por dichos autores. El pico máximo correspondiente al glucano β1-2 se encontró levemente desplazado (menor volumen de elución) del correspondiente a un estandar de (^{14}C)-glucano β1-2 sintetizado "in vitro" (Fig. 16). Este desplazamiento puede deberse a mayores grados de polimerización, o a la presencia en el glucano sintetizado "in vivo" de sustituyentes que modifiquen el comportamiento de los glucanos en la resina. Esta diferencia en los pesos moleculares del glucano sintetizado "in vivo" con el sintetizado "in vitro" ya había sido previamente observada por otros autores (9). Por otro lado, se ha descripto muy recientemente la producción de ciclosoforanos sustituidos con grupos O-acilo (94) así como con sn-1-fosfoglicerol (156,22) por diferentes especies de Agrobacterium y Rhizobium.

III.4. Otro producto formado durante la reacción "in vitro"

Luego de incubar las células permeabilizadas de A. tumefaciens LBA 4001 con UDP-(^{14}C)glucosa en las condiciones descriptas en la sección II.5.a., el sobrenadante obtenido después de centrifugar se pasó por una

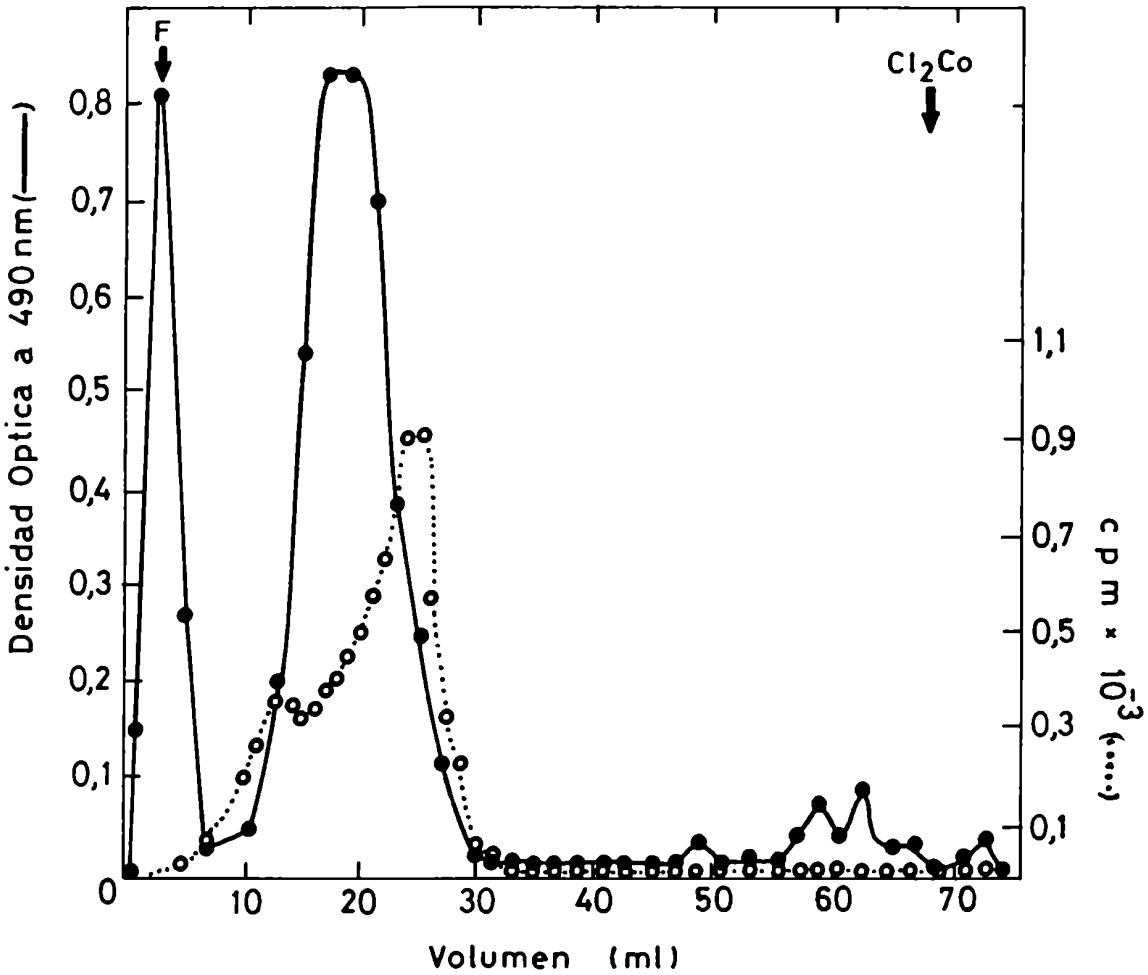

Figura 16: Comparación del del glucano β1-2 sintetizado "in vitro" con el celular formado "in vivo".
Para el aislamiento del glucano celular se siguió el procedimiento descripto en la sección II.4. El material extraido con TCA se cromatografió en una columna de Bio Gel P4 (sección II.4.). La línea llena corresponde al contenido en carbohidratos de las fracciones medido por el método de fenol-sulfúrico (sección II.10.) (glucano β1-2 sintetizado "in vivo"). La línea punteada corresponde al ^{14}C-glucano β1-2 sintetizado "in vitro". F, ferritina; Cl_2Co, cloruro de cobalto.

pequeña columna de resina mixta MB3 (forma acetato) (volumen del relleno, 1,5 ml). El UDP-(^{14}C)glucosa remanente quedó totalmente retenido. El eluido de la columna se cromatografió en papel con el solvente A. El glucano β1-2 se movió muy levemente del origen (Fig. 17). En las condiciones mencionadas se detectó la formación de un compuesto cuya movilidad fue mayor que la de la glucosa estandar (compuesto X) (distancia de origen: 37 cm, Fig. 17).

El compuesto X (Fig. 17) se eluyó del papel con agua y cromatografió en papel con el solvente B. En este sistema cromatografió en la misma posición que la fucosa estandar (Rg=1,3), cercano a la xilosa y muy alejado de los otros estándares utilizados (sorbitol, manosa, ribosa y ramnosa) (Fig. 18-A). El estándar de ramnosa que no está indicado en la figura 18-A tuvo mayor movilidad que la ribosa (Rib).

La electroforesis en papel con el solvente F y la cromatografía en papel con el solvente E del compuesto X descartaron que dicho compuesto fuera fucosa, xilosa, arabinosa o N-acetilglucosamina (Fig. 18-B y C).

Por hidrólisis ácida suave de dicho compuesto y cromatografía en papel con el solvente B se formaron dos compuestos de menor movilidad (Fig. 18-D y E). El compuesto X que no se modificó con dicho tratamiento se eluyó del papel y fue hidrolizado en las mismas condiciones. Este segundo tratamiento llevó a la formación de los dos mismos compuestos antes mencionados, lo que indicaría que en el pico X, se encuentra presente una sola especie y no dos poblaciones diferentes sensibles y no sensibles a la hidrólisis. La formación de los compuestos de menor movilidad por hidrólisis ácida podría indicar la presencia de substituyentes en el compuesto X que se liberan en la hidrólisis. El tratamiento alcalino (NaOH 60 mM) temperatura ambiente, 10 min) no modificó su movilidad en cromatografía en papel con el solvente A, lo cual

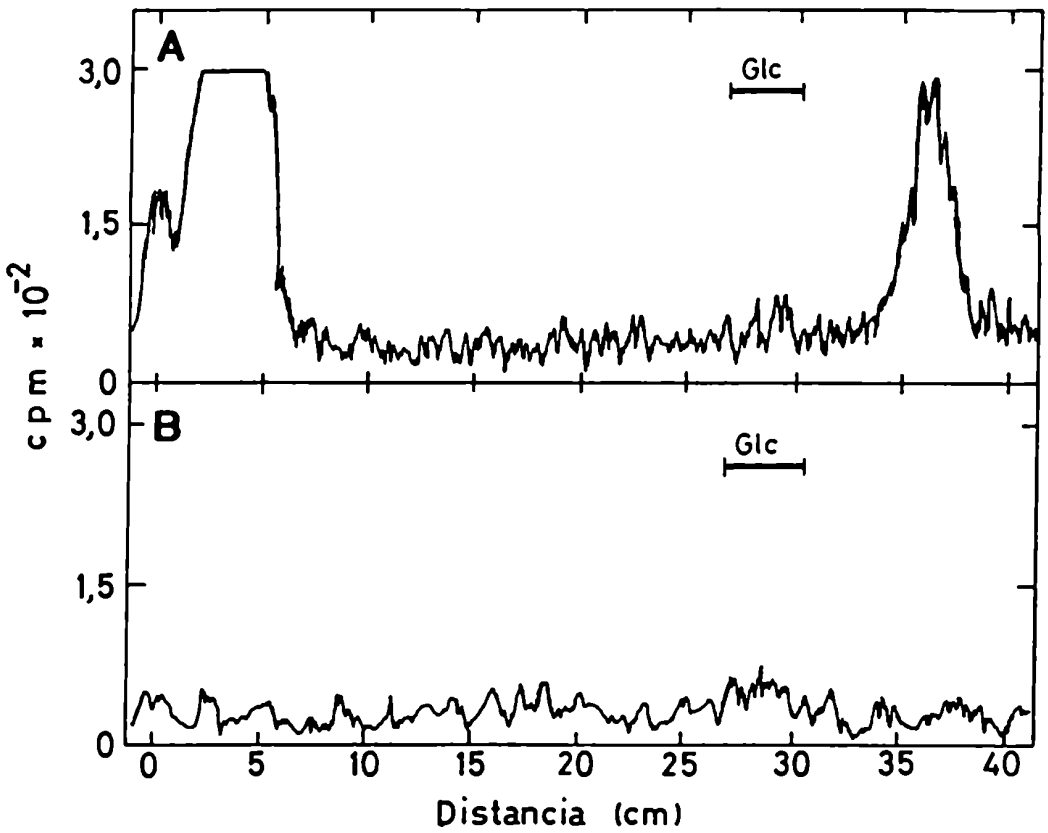

Figura 17: Cromatografía en papel de los productos neutros. El sobrenadante obtenido después de centrifugar la mezcla de reacción (sección II.5.a.) se pasó por una columna de Amberlite MB-3 (resina mixta) (10 x 1 cm) (forma acetato). El eluido de la columna aproximadamente 9 x 10^3 cpm) se cromatografió en papel con el solvente A durante 48 hs (A). Paralelamente se cromatografió un control realizado en la misma forma descripta pero con la enzima inactivada por calor (B). Glc, glucosa; X, compuesto X.

descartaría la presencia de sustituyentes acilo (223). Por cromatografía en papel con el solvente B y con el solvente E se descartó a la glucosa entre los productos de hidrólisis ácida.

El compuesto X fue sensible a una oxidación con bromo (50 μl de Br_2 a temperatura ambiente durante 5 horas, y en presencia de carbonato de sodio), ya que su movilidad se modificó considerablemente en cromatografía en papel con el solvente A. Este resultado indicaría que el compuesto X tiene un grupo aldehido sensible a la oxidación.

Por incubación de las células permeabilizadas con UDP-glucosa 20 mM no radioactivo y en condiciones similares a las descriptas se pudo observar la formación del compuesto X por tinción con el método de nitrato de plata de una cromatografía en papel con el solvente A.

La información obtenida sobre este compuesto, parecería indicar que se trata de un azúcar con por lo menos dos grupos oxidrilos en cis (debido a su movilidad en electroforesis con el solvente F) (203,79) y un grupo aldehido libre. Sin embargo no sería ninguno de los azúcares que se usaron como estándares. Por otro lado, presenta un comportamiento especial frente a tratamientos ácidos, lo que indicaría la presencia en X de sustituyentes o que los productos de hidrólisis son productos de degradación.

El compuesto X se forma a partir de UDP-(^{14}C)glucosa o UDP-glucosa no radioactiva y la preparación enzimática de células permeabilizadas. Como se verá más adelante en la sección III.5.b. este compuesto no se formó utilizando membranas internas purificadas como enzima. Sería interesante determinar si el compuesto X está o no relacionado a la biosíntesis del glucano β1-2. Sin embargo, debido a que las membranas internas incubadas con

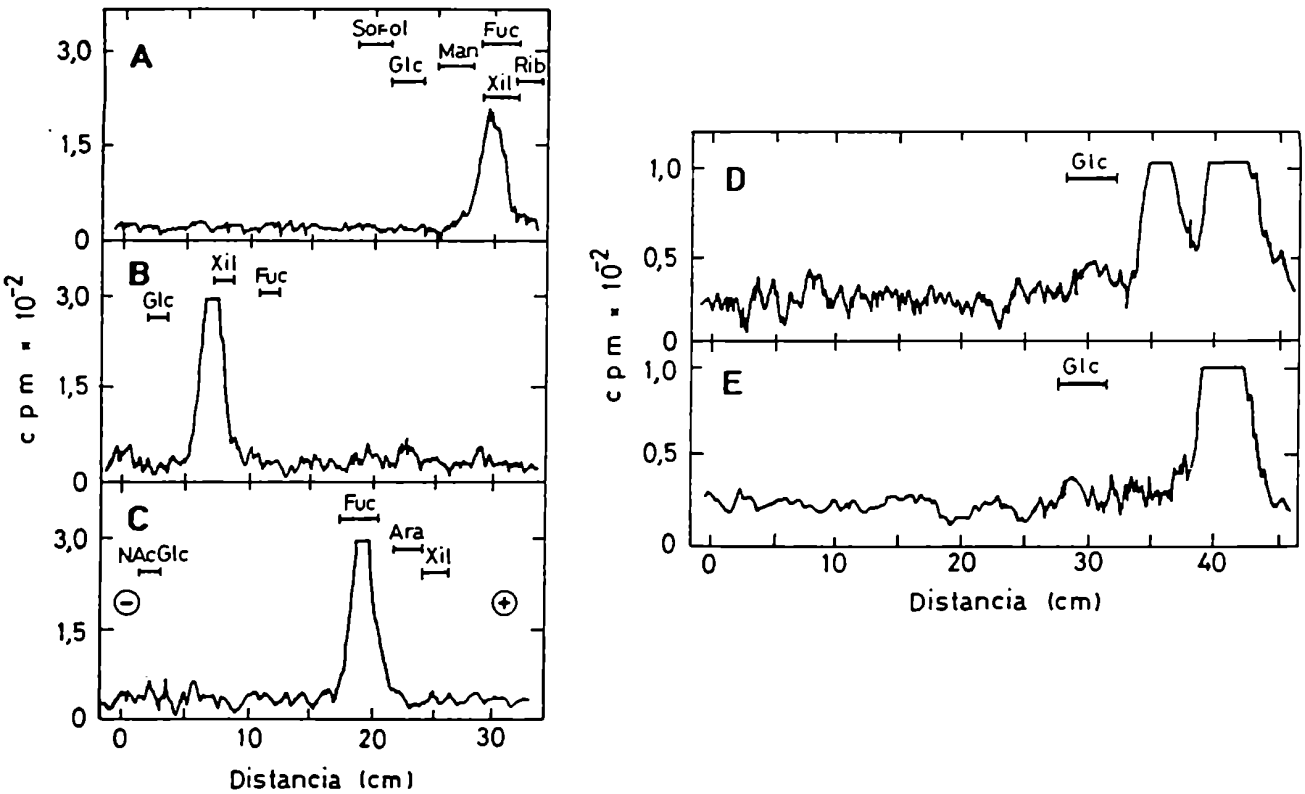

Figura 18: Propiedades del compuesto X.
El compuesto X (Fig. 17) se eluyó del papel y se cromatografió en papel con el solvente B durante 62 hs (A) y con el solvente E, durante 62 hs (B). Otra alícuota del compuesto X se sometió a electroforesis en papel con el solvente F, durante 3 hs a 20 V/cm (C). El compuesto X (8.300 cpm) se calentó a 100°C durante 90 minutos en ClH 10 mM. Luego de eliminar el ClH por evaporaciones repetidas se realizó una cromatografía en papel con el solvente B durante 62 hs (D). Otra alícuota de X sin tratar se cromatografió simultáneamente (E). Los estándares utilizados fueron: Fuc, fucosa; Xil, xilosa; Sor, sorbitol; Man, manosa; Rib, ribosa; Ara, arabinosa; Glc, glucosa; NAGlc, N-acetilglucosamina.

UDP-(^{14}C)glucosa en experimentos preliminares no formaron el compuesto X no se prosiguió con su caracterización.

III.5. Localización de la actividad enzimática en las membranas internas de A. tumefaciens

III.5.a. Caracterización del producto. Se purificaron las membranas internas y las externas de A. tumefaciens como se explicó en Materiales y Métodos y se midió la formación del glucano β1-2, utilizándose una columna de Biogel P2 para la separación de los productos de la reacción. La actividad formadora de β1-2 glucano se recuperó principalmente en las membranas internas. Se prosiguió con la caracterización del producto formado por la preparación enzimática de membranas internas. El excluido de la columna de Bio-Gel P2 se juntó en un pool y se sometió a cromatografía en papel con el solvente D. Simultaneamente se cromatografió glucano β1-2 preparado utilizando la preparación cruda de células permeabilizadas de A. tumefaciens, el cual ya fue caracterizado (sección III.2.). Los perfiles obtenidos fueron muy similares (Fig. 19). Los productos de hidrólisis parcial del glucano formado por las membranas internas y por las células permeabilizadas tuvieron las mismas movilidades en cromatografía en papel con el solvente C (Fig. 20). El tratamiento con la glusulasa de caracol del producto de las membranas internas en las condiciones descriptas en la sección II.7.a., liberó un 20% de (^{14}C)-glucosa, lo que indica que el glucano tiene en su mayor parte una estructura cíclica (ver sección III.2.f. para la discusión de este punto).

Es importante destacar que las membranas internas fueron capaces en diferentes experimentos de incorporar del 50 al 80% de la radioactividad

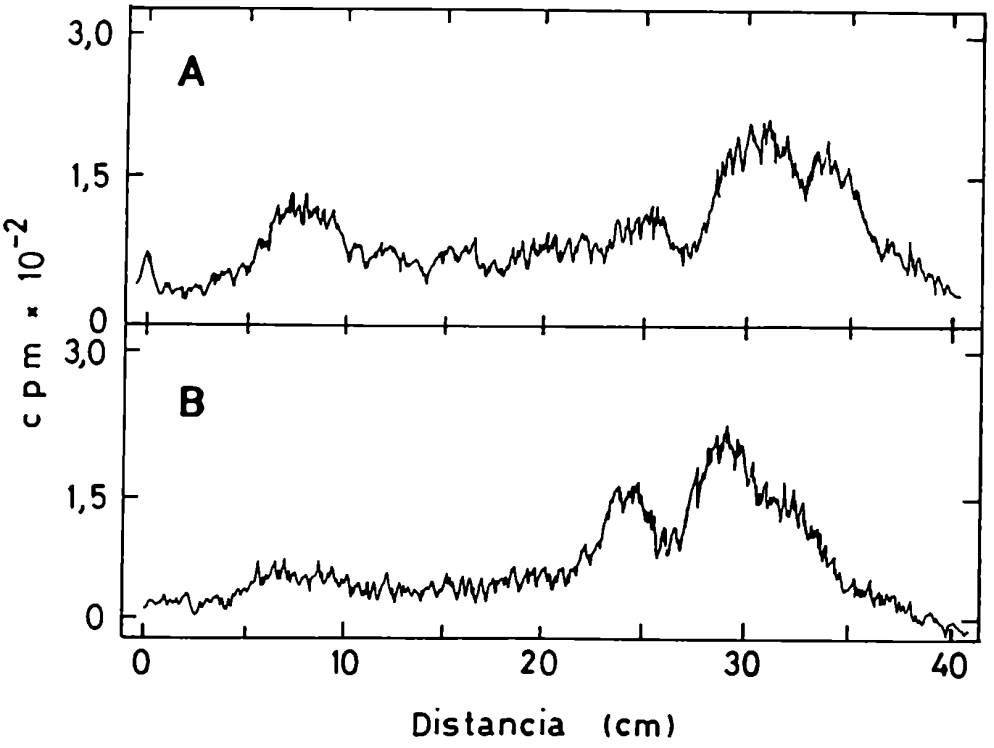

Figura 19: Cromatografía en papel del producto formado por las membranas internas.
Las membranas internas de A. tumefaciens se incubaron con UDP-(^{14}C)glucosa en las condiciones estandar (sección II.5.b.). Luego de detener la reacción por calor y eliminar las proteínas por centrifugación, la fracción soluble se cromatografió en una columna de Bio Gel P2. Las fracciones que eluyeron junto con el dextrano azul se juntaron en un "pool", se concentraron y una alícuota (aproximadamente 1,5 x 10^4 cpm) se cromatografió en papel con el solvente D durante 5 días (A). Simultáneamente se cromatografió el glucano sintetizado por las células permeabilizadas de A. tumefaciens (B).

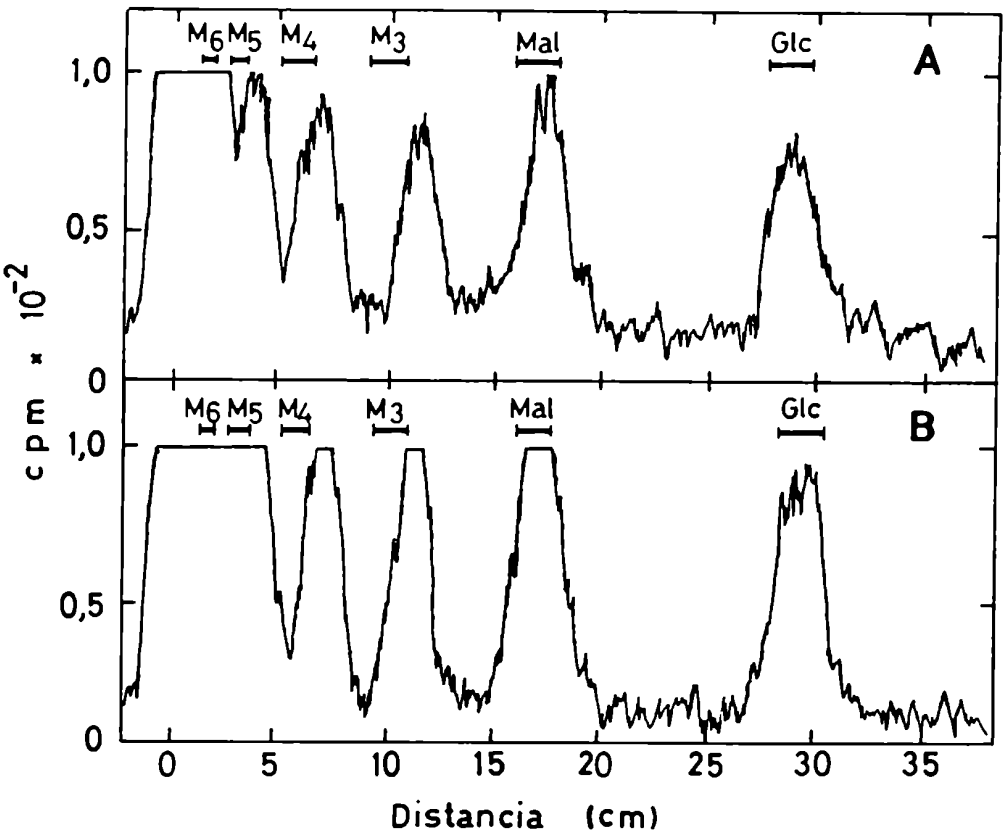

Figura 20: Hidrólisis parcial del glucano sintetizado por las membranas internas de A. tumefaciens.
Los productos presentes en el "pool" de la columna de Bio-Gel P2 obtenidos como se explica en la leyenda de la fig. 19 se hidrolizaron parcialmente (ClH 0,5 N, 20 min, 100°C). Luego de eliminar el ClH con vacío en un rotavapor, los productos de la hidrólisis ácida se cromatografiaron en papel con el solvente C, durante 3 días (A). Un estandar de glucano β1-2 formado por las células permeabilizadas de A. tumefaciens se hidrolizó y cromatografió en las mismas condiciones (B). Glc, glucosa; M_2, maltosa; M_3, maltotriosa; M_4, maltotetraosa; M_5 y M_6, maltooligosacáridos de 5 y 6 residuos de glucosa respectivamente.

agregada como UDP-(^{14}C)glucosa al glucano β1-2 cuando se utilizaron tiempos de incubación de 15 a 30 min.

La caracterización del producto formado por las membranas internas llevó a la conclusión que dicho producto es idéntico a la familia de glucanos β1-2 cíclicos sintetizados por la preparación cruda de células permeabilizadas.

III.5.b. Método rápido para el dosaje de la actividad. Para el dosaje de la actividad utilizando membranas internas como preparación enzimática se buscó un método rápido y reproducible. El método consistió en la utilización de pequeñas columnas de DEAE-Sephadex como se explicó en la sección II.5.b.

Se verificó por electroforesis en papel del eluido de la columna que en las condiciones utilizadas el UDP-(^{14}C)glucosa remanente quedaba totalmente retenido. Por otro lado el eluido de la columna, el cual contiene los compuestos neutros se cromatografió en papel con el solvente B. No se observó la formación de compuestos neutros de mayor movilidad que la glucosa, como el compuesto X descripto en la sección III.4. Solamente se obtuvieron compuestos que cromatografiaron cercanos al origen correspondiente al glucano β1-2.

III.6. Búsqueda de los compuestos intermediarios de la síntesis del glucano β1-2 en A. tumefaciens

Cada componente de distinto grado de polimerización de la familia de glucanos β1-2 cíclicos solubles que se forma durante la incubación es un producto final de la reacción ya que el perfil heterogéneo obtenido del pro-

ducto de A. tumefaciens o de R. meliloti no se modificó variando las condiciones de incubación (temperatura, tiempo, etc.), o luego de un "chase" con UDP-glucosa. Los perfiles en cromatografía fueron muy reproducibles utilizando distintas preparaciones enzimáticas de células permeabilizadas o membranas internas.

En la fracción soluble obtenida después de centrifugar la mezcla de reacción no se detectaron glucanos β1-2 precursores de grados de polimerización menores de 14. Por otro lado, los glucanos sintetizados "in vitro" a diferentes tiempos (desde 50 segundos a 30 min de incubación) tuvieron una sensibilidad muy similar a la glusulasa (menos del 20% de liberación de glucosa), lo que indicaría que los productos liberados a la fracción soluble, aún a tiempos cortos, poseen una estructura cíclica. Los glucanos precursores estarían asociados a la fracción insoluble (membranas internas) y se liberarían a la fracción soluble, una vez ciclados.

Se midió la radioactividad asociada a la fracción insoluble (membranas internas), según se explicó en la sección II.5.b., encontrándose un 7% de la radioactividad agregada como del UDP-(^{14}C)glucosa en dicha fracción. En la Tabla II se muestra el efecto de varios cambios en la composición de la mezcla de reacción. La formación del glucano y de los productos insolubles en TCA, fueron aproximadamente paralelas. Ambas fueron inhibidas por la ausencia de Mg^{++}, por la presencia de UDP y por calentamiento de la preparación enzimática. La adición de UMP, soforosa, glucosa o la ausencia de 2-mercaptoetanol tuvo muy poco efecto (Tabla II). La temperatura de incubación elegida fue de 10°C para disminuir la velocidad de reacción y favorecer la acumulación de compuestos intermediarios.

TABLA II

Efecto de varias substancias sobre la formación del glucano β1-2 y los compuestos insolubles en TCA

Variaciones	Radioactividad (cpm)	
	Insoluble en TCA	Glucano β1-2
Ninguna	4.500	24.000
- 2-mercaptoetanol	5.400	26.000
- Mg^{++}	160	1.300
- Mg^{++} + EDTA 5 mM	140	780
+ UMP 1 mM	4.400	17.000
+ UDP 1 mM	1.200	2.100
+ Soforosa 1 mM	5.900	26.000
+ Glucosa 1 mM	5.600	27.000
Enzima calentada	280	840

El sistema completo está descripto en Materiales y Métodos. La incubación se realizó durante 4 minutos.

III.7. Cinética de la reacción

Se midió la formación del glucano β1-2 y de los compuestos insolubles en TCA a diferentes tiempos, utilizando la preparación enzimática de membranas internas. La radioactividad asociada a compuestos insolubles en TCA representó un 25% a los 3 min y un 10% a los 20 min de reacción de la radioactividad asociada al glucano (Fig. 21). Se puede observar una lenta disminución de los productos insolubles en TCA después de los 5 min. Con la finalidad de impulsar la radioactividad a los productos finales de la reacción se realizó un experimento de pulso y "chase". El efecto del agregado de un exceso de UDP-glucosa no radioactivo, a los 5 min del pulso con UDP-(^{14}C)glucosa se muestra en la Fig. 22. Se puede observar que después del agregado de UDP-glucosa fría la radioactividad asociada a compuestos precipitables con TCA disminuyó rapidamente al principio y lentamente después (Fig. 22-B). La incorporación de radioactividad al glucano fue muy lenta después del "chase" (Fig. 22-A). La radioactividad que desapareció en el precipitado, apareció en el glucano, si bien esto no es claramente visible en la Fig. 22 debido a que las escalas difieren en un factor de 10.

Estas curvas tienen el aspecto de intermediario y producto de una reacción.

III.8. Caracterización de los compuestos insolubles en TCA

Como se explicó en la sección II.5.b., alternativamente el precipitado obtenido después de centrifugar la mezcla de reacción, la cual fue incubada durante 5 min, se lavó varias veces con agua y se lo sometió a diversos tratamientos.

TABLA III

Propiedades de los compuestos insolubles en TCA

Tratamiento	Radioactividad asociada a compuestos resistentes al tratamiento (cpm TCA insoluble)
1. TCA 5%, 100°C, 2 min	4.200
2. ClH 0,1 N, 100°C, 1 min	4.900
3. ClH 0,1 N, 100°C, 5 min	4.000
4. Cloroformo, metanol, agua 1:1:0,3	4.100
5. Proteasa 5 hs, 30°C, pH 7	200
6. NaOH, 0,1 N, 2 min, 100°C	5.300
7. NaOH, 0,1 N, 20 min, 100°C	1.200
8. NaOH, 0,1 N, 48 hs, 37°C	1.900
9. Control sin tratar	4.800

La incubación de las membranas internas de A. tumefaciens con UDP-(^{14}C)glucosa se realizó en las condiciones estándar (sección II.5.b.), durante 5 min. La reacción se detuvo por calentamiento a 100°C, durante 1 min; el precipitado se lavó con agua y se lo sometió a los tratamientos indicados. Luego de agregar 1 ml de TCA se filtró por fibra de vidrio (la muestra correspondiente al tratamiento 1 se filtró directamente) y se determinó la radioactividad que permaneció asociada a compuestos insolubles en TCA (sección II.5.b.). En el tratamiento 4, el precipitado se resuspendió en cloroformo, metanol, agua (1:1:0,3) y se lo dejó unos minutos a temperatura ambiente. Luego de centrifugar, se determinó la radioactividad insoluble en TCA, asociada al precipitado.

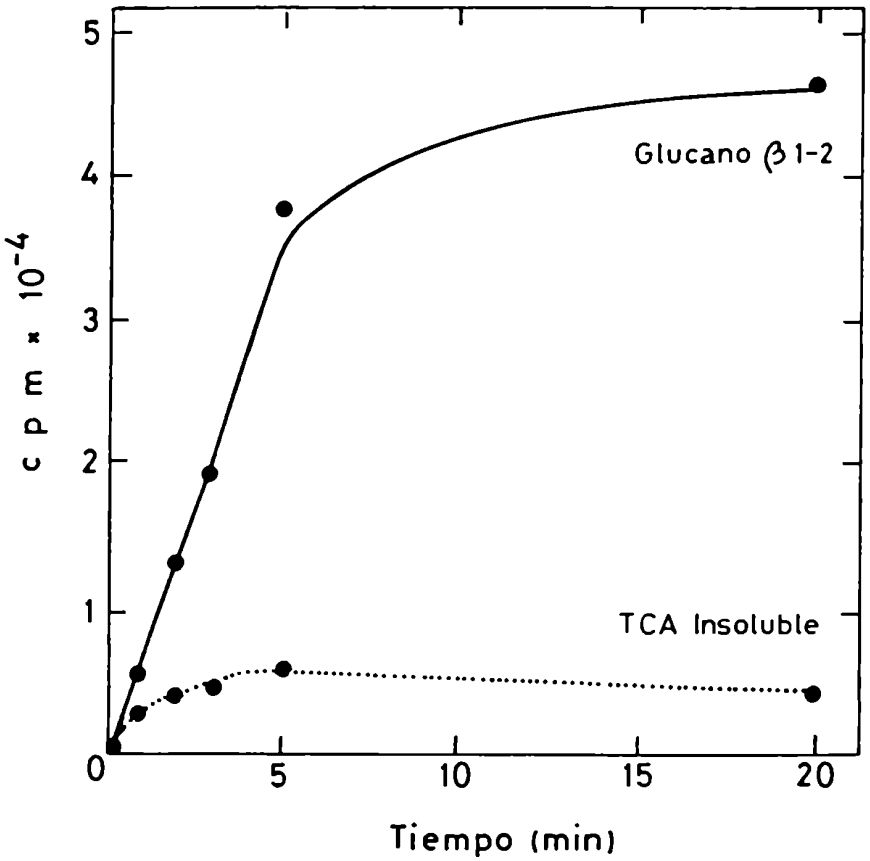

Figura 21: Curva de tiempo de la formación "in vitro" del glucano β 1-2 y de los compuestos insolubles en TCA.
Se midió la formación de los compuestos insolubles en TCA (línea punteada) y del glucano β 1-2 (línea llena) a diferentes tiempos según se describió en la sección II.5.b., utilizando la preparación enzimática de membranas internas de A. tumefaciens LBA 4001.

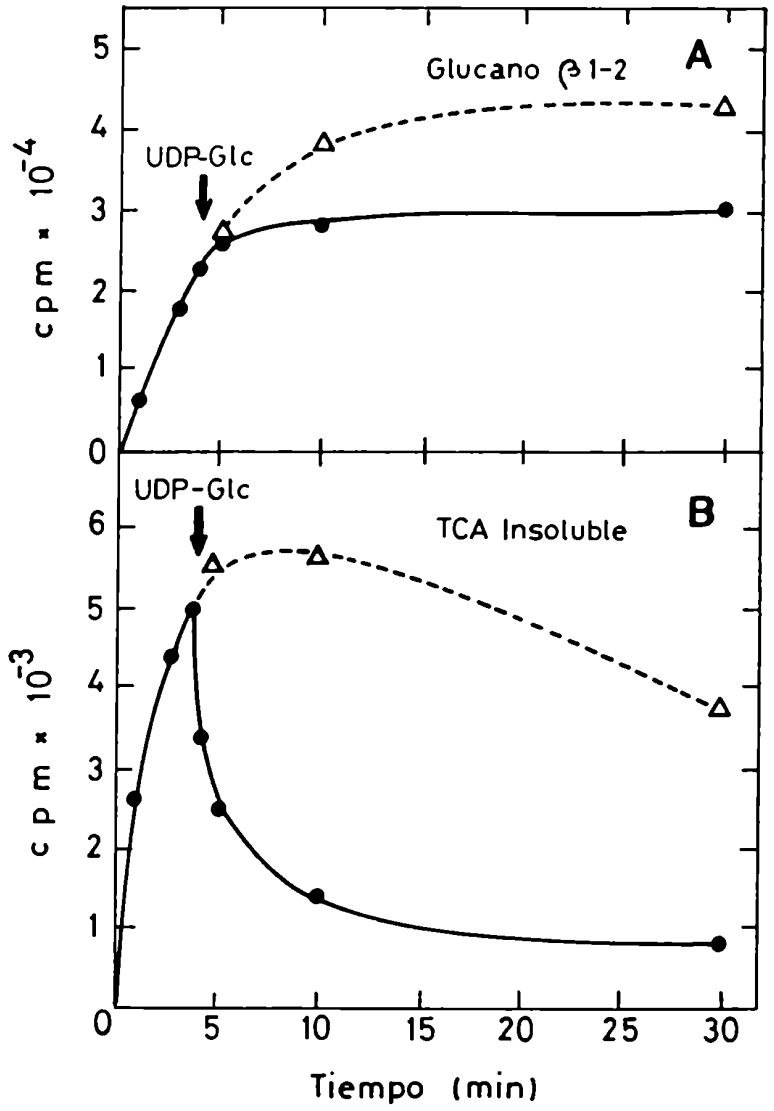

Figura 22: Experimento de pulso y "chase".
Se midió la formación del glucano β1-2 (A) y de los compuestos insolubles en TCA (B) (sección II.5.b.) antes y después del agregado de un exceso de UDP-glucosa no radioactivo (1 mM), indicado por la flecha, a los 5 min de la reacción. Las líneas punteadas indican los respectivos controles sin el agregado de UDP-glucosa no radioactivo.

III.8.a. Sensibilidad a tratamientos ácidos. El precipitado lavado (fracción insoluble de membranas internas) se resuspendió en TCA 5% y se lo calentó a 100°C durante 2 min. Luego, se midió la radioactividad que permaneció asociada a compuestos insolubles en TCA, filtrando el precipitado por filtro de fibra de vidrio (ver sección II.5.b.). La mayor parte de la radioactividad fue resistente a este tratamiento (Tabla III). También fue resistente al tratamiento con ClH 0,1 N, a 100°C durante 1 min y sólo un 20% se solubilizó después de 5 min (Tabla III). La radioactividad insoluble en TCA no estaría unida a lípidos de membrana a través de una unión fosfato o pirofosfato, ya que los lípido-fosfo-azúcares intermediarios en la biosíntesis de polisacáridos en varios sistemas, son compuestos lábiles a estos tratamientos (49,229,214).

III.8.b. Solubilidad en solventes orgánicos. El precipitado se resuspendió en cloroformo, metanol, agua (1:1:0,3), se agitó vigorosamente dejándolo unos minutos a temperatura ambiente. Luego de centrifugar al precipitado se lo resuspendió en TCA 5% y se filtró por fibra de vidrio. La mayor parte de la radioactividad permaneció asociada a la fracción insoluble (Tabla III). Este resultado indica que la radioactividad asociada a los compuestos insolubles en TCA no se encontraría unida a lípidos de membrana.

III.8.c. Proteólisis

i) Sensibilidad a la proteólisis. El tratamiento con proteasa del precipitado obtenido después de centrifugar la mezcla de reacción (sección II.7.b.), solubilizó la mayor parte de la radioactividad (Tabla III). Esta sensibilidad a la proteólisis sugiere que la radioactividad TCA insoluble se encuentra asociada a proteínas de membrana.

ii) Caracterización de los productos de proteólisis. Los productos de proteólisis obtenidos como se explicó en la sección II.7.b. se sometieron a electroforesis en papel con el buffer G (pH alcalino) y con el buffer H (pH ácido). Los productos de proteólisis migraron hacia el polo positivo en el medio alcalino (pH 10) y hacia el polo negativo en el medio ácido (pH 2) (Fig. 23). Este resultado muestra el comportamiento anfótero de los productos de proteólisis. Solamente una pequeña proporción de la radioactividad estuvo asociada a compuestos neutros que tuvieron la misma movilidad que la glucosa estandar (Fig. 23).

Durante la reacción de síntesis del glucano β1-2 hubo transferencia de (^{14}C)-glucosa proveniente del UDP-(^{14}C) glucosa a proteínas de membranas, las cuales por tratamiento con pronasa se transformaron en glicopéptidos solubles marcados con (^{14}C).

Con la finalidad de obtener información sobre la identidad de la porción sacarídica de los productos de proteólisis, estos fueron parcialmente hidrolizados y cromatografiados en papel con el solvente C. Como ya se describió en la sección III.2.b. los productos de hidrólisis parcial del glucano β1-2

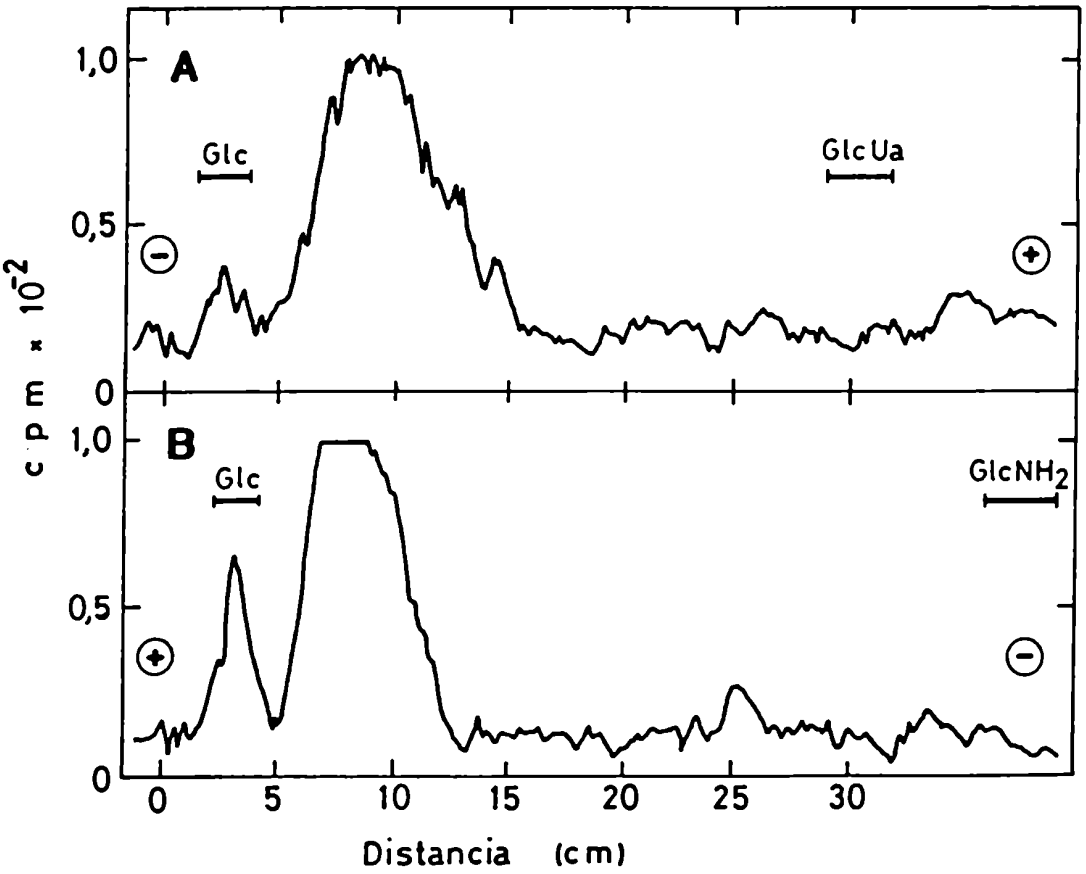

Figura 23: Electroforesis en papel de los productos de proteólisis. Se realizo la incubación de las membranas internas con UDP-(^{14}C)glucosa en las condiciones estandar (sección II.5.b.) en escala preparativa. Se detuvo la reacción por calentamiento a 100°C durante 1 min y luego de eliminar el sobrenadante por centrifugación, el precipitado (el cual fue lavado sucesivas veces con agua), se trató con proteasa según se explicó en la sección II.7.b. Los productos de proteólisis (aproximadamente 1 x 10^4 cpm) se sometieron a electroforesis en papel, 4 hs a 25 v/cm en: A) carbonato de sodio/bicarbonato de sodio 0,2 M, pH 10 (buffer G) y B) ácido fórmico 5% (pH 2) (buffer H). Glc, glucosa; GlcUa, ácido glucurónico y $GlcNH_2$; glucosamina; (+) cátodo; (-) ánodo.

se comportaron como una serie homóloga de oligosacáridos. Los perfiles de los productos de hidrólisis de los glicopéptidos y del glucano β1-2 estandar fueron idénticos. El disacárido tuvo la misma movilidad que la soforosa estándar (glucosa β1-2 glucosa); el trisacárido, la misma que la soforotriosa, etc.(Fig. 24). Por lo tanto, los glicopéptidos contienen cadenas de glucosa unidas en β1-2.

Los glicopéptidos marcados con (^{14}C) se cromatografiaron en Bio-Gel P4 junto con un estandar tritiado del glucano β1-2 de R. meliloti. Ambas familias de compuestos eluyeron en posiciones muy similares (Fig. 25). Estimativamente, el rango de pesos moleculares de los glicopéptidos se encuentra entonces entre 2.000 y 4.000. Asumiendo una proteólisis exhaustiva la mayor contribución al peso molecular correspondería a las cadenas de oligosacáridos β1-2. Estos, por lo tanto, tendrían grados de polimerización similares a los distintos componentes de la familia de glucanos β1-2 cíclicos. Una posible interpretación es que en las condiciones de reacción utilizadas, se produce una acumulación de glucanos β1-2-proteína intermediaria con tamaños de oligosacáridos similares a los productos finales (ver sección III.2.e.). Sin embargo, esto no sería cierto en el caso que los productos de proteólisis contengan oligopéptidos de diferente tamaño o que el comportamiento en filtración por geles de los glucanos β1-2 fuera muy diferente al de los glicopéptidos.

Los glicopéptidos fueron apreciablemente sensibles a la glusulasa, lo que indica una estructura lineal de los oligosacáridos que se encuentran unidos a la proteína intermediaria (ver sección III.2.f.).

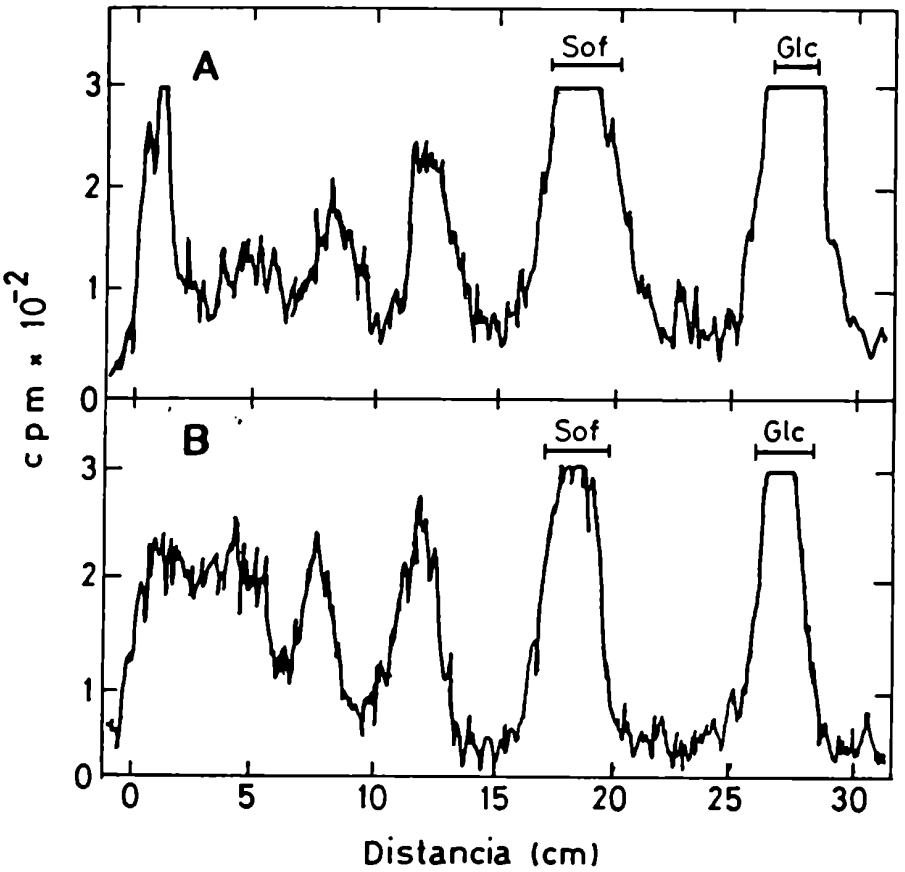

Figura 24: Cromatografía en papel de los productos obtenidos por hidrólisis ácida parcial de los glicopéptidos.
Los productos de la proteólisis cargados se eluyeron con agua del papel de electroforesis en ácido fórmico (ver Fig. 23, B) e hidrolizaron parcialmente con ClH 0,5 N durante 25 min a 100°C. Luego de eliminar el ClH con una bomba de vacío, los productos de hidrólisis se cromatografiaron en papel con el solvente C, durante 3 días (A). Un estandar del glucano β1-2 cíclico se hidrolizó en las mismas condiciones y se cromatografió simultáneamente (B). Los estándares fueron: Glc, glucosa; Sof, soforosa.

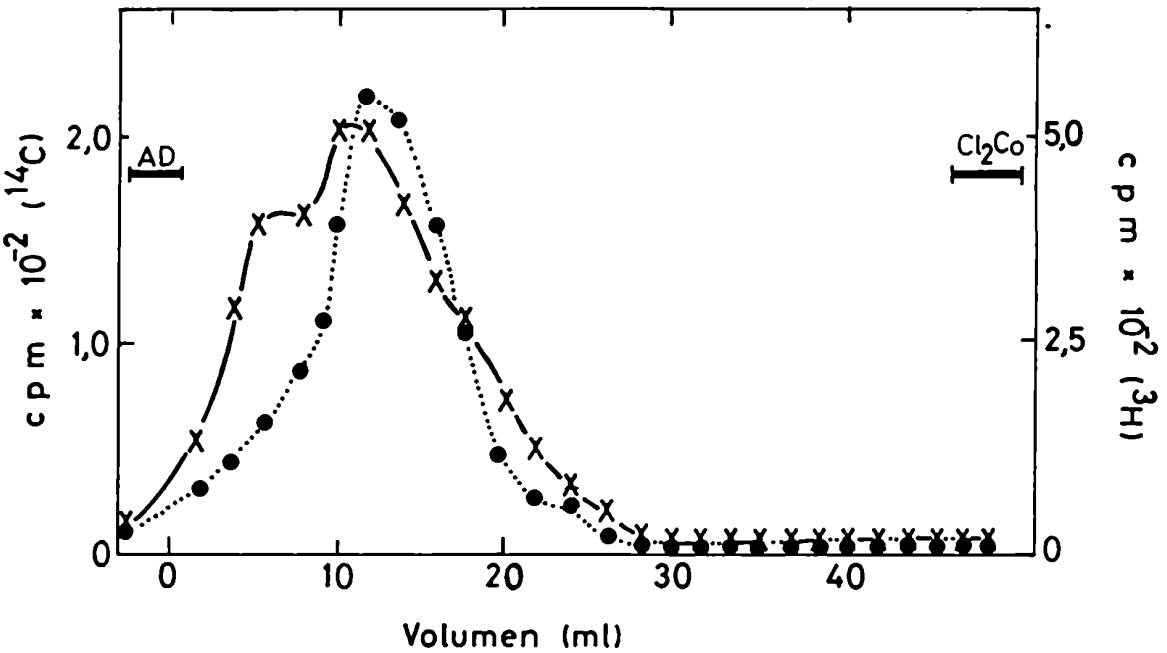

Figura 25: Filtración por geles de los glicopéptidos.
Los productos de proteólisis (aproximadamente 6 x 10^3 cpm) (sección II.7.b.) marcados con ^{14}C se cromatografiaron en una columna de Bio-Gel P4 (220-400 mesh), 30 x 2,5 cm con acetato de piridina 0,1 M a pH 5 (línea llena) junto con un estandar de glucano β1-2 cíclico tritiado (línea punteada). Se colectaron fracciones de 1 ml y alícuotas de 300 μl se contaron con Bray en un contador de centelleo. DA, dextrano azul; Cl_2Co, cloruro de cobalto.

III.8.d. Tratamientos alcalinos. Con la finalidad de conocer la identidad del aminoácido involucrado en la unión de la porción sacarídica a la proteína, la fracción insoluble se sometió a diversos tratamientos alcalinos. La unión hidroxiaminoácido-azúcar (serina o treonina) es lábil a tratamientos alcalinos suaves, ya que sufre una reacción denominada β-eliminación (162,205). En presencia de borohidruro de sodio (condiciones reductoras) se estabiliza el azúcar liberado y se evita el efecto "peeling" (205). Sin embargo si el grupo carboxilo del hidroxiaminoácido se encuentra libre o queda libre por hidrólisis, la porción sacarídica no puede ser liberada tan facilmente por β-eliminación (157). La unión asparagina-N-acetilglucosamina se rompe con tratamientos alcalinos más drásticos (NaOH 1 N, BH_4Na 1 M a 100°C, 4-6 hs (154,131) o NaOH 2 N, BH_4Na 2 M, a 80°C, 16 hs). Por otro lado, la unión galactosa-hidroxilisina es muy estable a tratamientos alcalinos. Es capaz de resistir un calentamiento a 90°C, durante 10 hs con NaOH 2 N (208).

Cuando la fracción insoluble se trató con NaOH 0,1 N 2 min a 100°C, la mayor parte de la radioactividad permaneció asociada al precipitado de TCA (Tabla III). A los 20 min de calentamiento se solubilizó un 75% de la radioactividad. Un tratamiento alcalino suave (NaOH 0,1 N, 37°C, 48 hs) que rompe uniones hidroxiaminoácido-azúcar solubilizó un 50% de la radioactividad (Tabla III).

La solubilización de la radioactividad asociada al precipitado de TCA se puede originar por labilidad de la unión aminoácido-azúcar pero también por hidrólisis alcalina de la porción proteica. En este último caso los productos solubilizados serían glicopéptidos. Por tal motivo y para obtener alguna conclusión respecto del aminoácido involucrado fue necesario analizar los productos obtenidos después de diversos tratamientos alcalinos.

Cuando la fracción insoluble se trató con NaOH 0,2 N, BH_4Na 0,5 M a

37°C, durante 72 hs (condiciones de β-eliminación) un 40% de la radioactividad permaneció insoluble, un 24% se solubilizó y cargó positivamente (electroforesis en ácido fórmico 5%) y un 36% se solubilizó y fue neutra. Esto implica que sólo el 36% pudo provenir de una β-eliminación.

En condiciones alcalinas en las cuales se rompe la unión asparagina-azúcar (NaOH 2 N, BH_4Na 2 N, 80°C durante 16 hs), el 100% de la radioactividad se solubilizó después del tratamiento. Cuando se analizaron los productos que se liberaron a la fracción soluble por electroforesis en ácido fórmico 5%, se observó una cantidad variable (en diferentes experimentos) de compuestos neutros, siendo el máximo obtenido de 80%. Este máximo se obtuvo cuando el tratamiento alcalino se realizó sobre los compuestos intermediarios (proteína-oligosacáridos) purificados por Sephadex G-100 como se verá en la sección III.8.e.

Estos resultados no permiten concluir sobre la naturaleza del aminoácido involucrado en la unión con la porción sacarídica. Sin embargo, parecen excluir una unión del tipo hidroxilisina-azúcar, la cual es muy estable alcali. Por otro lado, la mayor parte de los compuestos parecen no ser β-eliminables, lo que sugeriría de acuerdo a los resultados descriptos una unión del tipo asparagina-azúcar. Recientemente se ha descripto por primera vez una unión asparagina-glucosa, en una glicoproteína de la superficie celular de Halobacterium halobium (248).

III.8.e. Filtración por geles. Se realizó la incubación de las membranas internas con UDP-(^{14}C)glucosa como se explicó en Materiales y Métodos. Luego de 15 min se agregaron a la temperatura de un baño de hielo para disminuir la velocidad de la reacción, Nonidet P-40 (conc. final, 1,4%), dextrano azul y Cl_2Co, como marcadores del Vo y del Vi, respectivamente. Rapidamente, esta mezcla se sembró en una columna de Sephadex G-100. Como se puede ver en la Fig. 26 (línea llena), la mayor parte de la radioactividad cromatografió cercana al Vi (Cl_2Co). Este pico corresponde fundamentalmente a UDP-(^{14}C)glucosa que no reaccionó y al producto final, el glucano β1-2. Los compuestos radioactivos que eluyeron de la columna en el Vo fueron insolubles en TCA (Fig. 26, línea punteada) y fueron degradables por proteólisis, identificándose los productos como glicopéptidos.

Este experimento confirma que luego de la incubación, parte de la radioactividad se encuentra asociada a compuestos de alto peso molecular, los cuales según se describió en las secciones anteriores, son los glucanos β1-2 intermediarios unidos a una proteína de membrana (glucano β1-2-proteína intermediaria) de A. tumefaciens.

En un experimento muy similar los compuestos intermediarios se excluyeron en una columna de Sephadex G-150.

III.9. Componentes del sistema enzimático

III.9.a. Concentración del ion divalente. Se midió la incorporación de (^{14}C)glucosa a la fracción soluble y neutra (glucano β1-2) y a la fracción insoluble en TCA (compuestos intermediarios) utilizando las membranas inter-

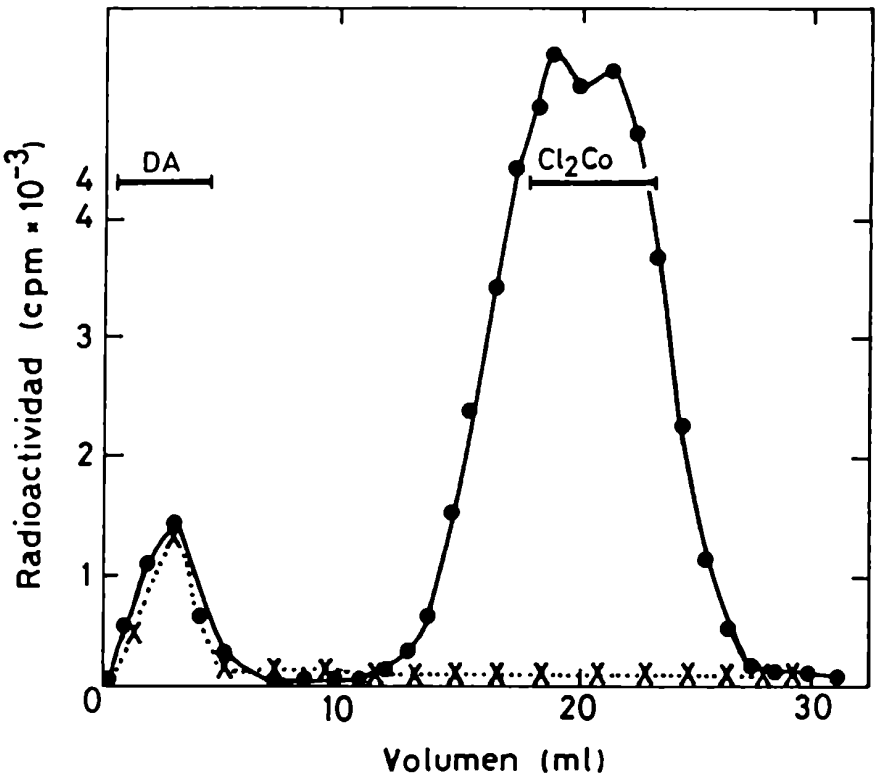

Figura 26: Filtración por geles de los compuestos intermediarios. Se realizó la incubación de las membranas internas de A. tumefaciens LBA 4001 con UDP(^{14}C)glucosa en escala preparativa, en las condiciones estandar. La reacción se detuvo llevando la mezcla a la temperatura de un baño de hielo y por dilución con Nonidet P-40 (conc. final: 1,4%), dextrano azul y Cl_2Co. La mezcla clarificada por la presencia del detergente se sembró en una columna de Sephadex G-100 (35 x 1,5 cm) utilizando Tris-ClH, 50 mM, pH 8,2 como eluyente. Las fracciones fueron de 1 ml y el flujo 0,23 ml/min. Se contaron alícuotas de 200 μl de cada fracción con Bray en un contador de centelleo (línea llena) y se determinó la radioactividad insoluble en TCA por el método de Krisman y Barengo (129) (línea punteada).

nas de A. tumefaciens a diferentes concentraciones de Cl_2Mg o Cl_2Mn. La concentración óptima del Cl_2Mg para la formación del glucano β1-2 estuvo cerca de 10 mM. Concentraciones mayores de Cl_2Mg inhibieron sólo en una baja proporción la síntesis del glucano β1-2 (Fig. 27-A). A estas concentraciones se produjo una mayor acumulación de compuestos intermediarios (TCA insoluble) (Fig. 27-B). Esto podría interpretarse como un efecto inhibitorio del Cl_2Mg en exceso sobre la reacción de terminación (o ciclación), si se considera que la acumulación de radioactividad en los compuestos intermediarios es el resultado de las velocidades relativas de elongación y terminación (ciclación).

La concentración de Cl_2Mn óptima para la síntesis del glucano β1-2 se encontró aproximadamente en 5 mM. A concentraciones mayores de Mn^{++}, se observó una fuerte inhibición de la síntesis del glucano (Fig. 27-A). Por otro lado, estas concentraciones inhibieron levemente la acumulación de los compuestos intermediarios (Fig. 27-B). Este efecto, sumado a la inhibición de la síntesis del glucano, se puede interpretar como una inhibición global sobre las reacciones de elongación y ciclación de un exceso de Mn^{++}.

III.9.b. Efecto del pH. Se midió el efecto del pH sobre la formación del glucano β1-2 y de los compuestos intermediarios utilizando buffers Tris-maleato (pH: 5,2-9,1) y Tris-ClH (pH 7,8-9,2). Se observaron más altas incorporaciones de radioactividad, cuando se utilizaron buffers de Tris-ClH (Fig. 28, A y B). A pH muy ácidos se inhibió tanto la formación de los compuestos intermediarios como la de los glucanos β1-2. El pH óptimo para la síntesis del glucano fue de aproximadamente 8. A pH más alcalinos se produjo inhibición de la formación del glucano y una mayor acumulación de compuestos

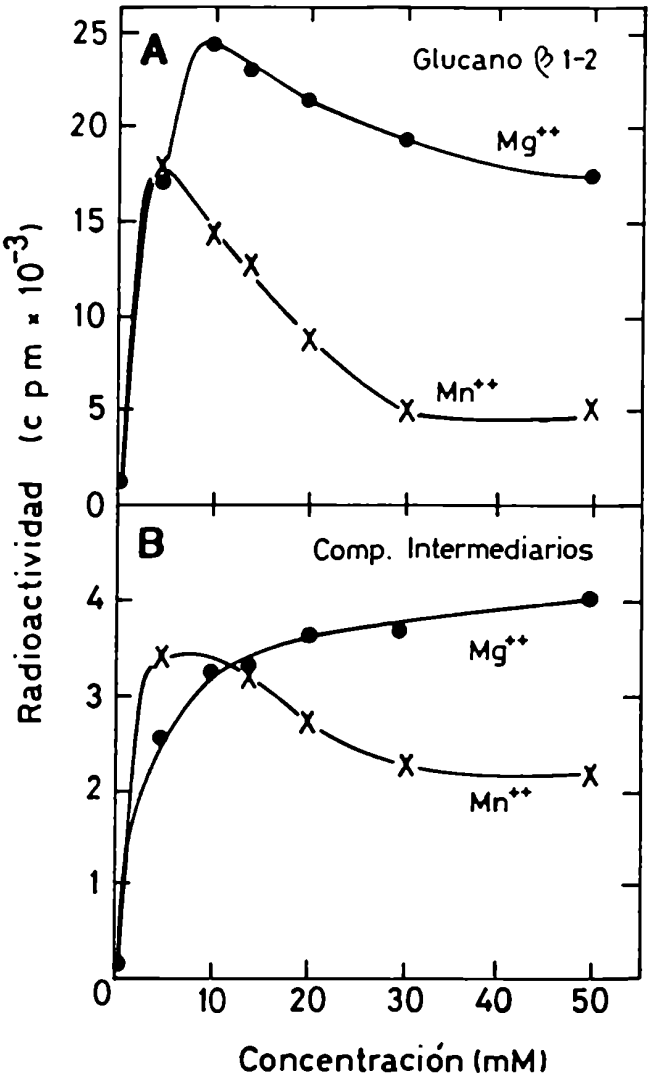

Figura 27: Curva de concentración de ión divalente.
Se midió en las condiciones estandar (sección II.5.b.) y a diferentes concentraciones de Cl_2Mg (●) o Cl_2Mn (x) la formación del glucano β 1-2 (A) y la acumulación de los compuestos intermediarios (B) utilizando la prparación enzimática de membranas internas de A. tumefaciens LBA 4001.

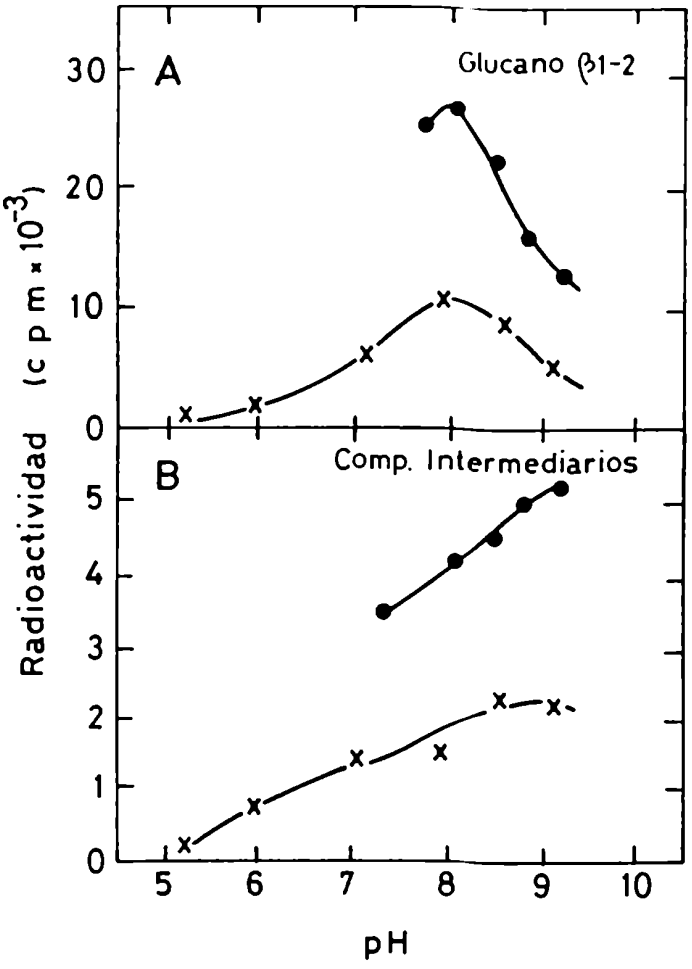

Figura 28: Curva de pH.
Se midió la formación del glucano β1-2 (A) y de los compuestos intermediarios (B) a diferentes pH utilizando Tris-ClH 50 mM (pH 7,8-9,2) (●) o Tris-maleato 40 mM (pH 5,2-9,1) (x) como buffers de pH y en las condiciones descriptas (sección II.5.b.) utilizando membranas internas de A. tumefaciens LBA 4001.

intermediarios. La baja concentración de protones por lo tanto afectaría la reacción global (formación del glucano β1-2) fundamentalmente a través de una inhibición de la terminación (o ciclación).

III.9.c. NAD y ATP. Otros autores (61) con una preparación enzimática de R. japonicum, usaron NAD y ATP además de Mn^{2+}, UDP-(^{14}C) glucosa para la síntesis de un glucano que contenía uniones β1-2. Con A. tumefaciens se midió el efecto sobre la formación del glucano β1-2 y sobre los compuestos intermediarios de concentraciones diferentes (0,2 y 1 mM) de NAD y ATP, y no se observaron marcados cambios en la actividad. Debido a que la preparación enzimática utilizada (membranas internas) no tiene factores solubles, el NAD y el ATP no serían componentes necesarios del sistema enzimático de A. tumefaciens.

III.10. Identificación de la proteína-intermediaria por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

Con la finalidad de identificar a la proteína intermediaria, los productos insolubles en TCA marcados con (^{14}C) se sometieron a electroforesis en gradiente de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS. Por fluorografía se detectó una banda radioactiva con un peso molecular aparente mayor de 200 kDalton y otras bandas de mucha menor intensidad entre 120 y 200 kDa (Fig. 29). En otro experimento similar, las membranas internas de A. tumefaciens se incubaron durante 10 min con UDP-(^{14}C)glucosa (Fig. 30, carril 1). Pasado este tiempo, se agregó UDP-glucosa 2 mM ("chase") y se prosiguió la incubación por diferentes tiempos (Fig. 30, carriles 2, 3 y 4). En este

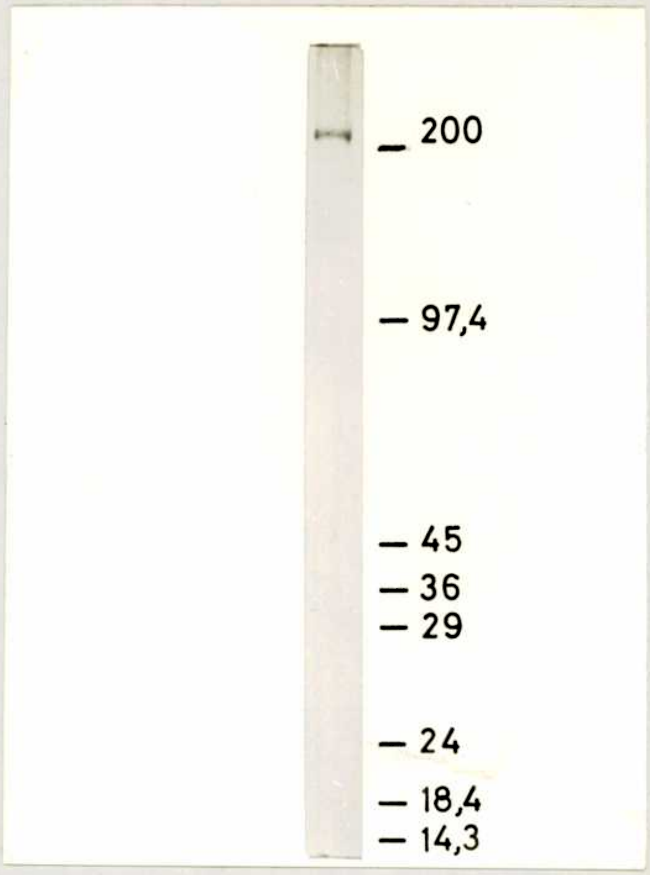

Figura 29: Electroforesis en gradiente de poliacrilamida con SDS de los compuestos insolubles en TCA.
Las membranas internas de A. tumefaciens LBA 4001 (200 - 300 µg) se incubaron con UDP-(^{14}C)glucosa en presencia de Mg^{++} durante 10 min, a 10°C. La reacción se detuvo con TCA 10% y el precipitado obtenido después de centrifugar se solubilizó con una solución que contenía SDS, mercaptoetanol y urea (ver sección II.9.b.) y se lo sometió a electroforesis en gradiente de poliacrilamida (5-15%) con SDS. La radioactividad se detectó por fluorografía. Los detalles se explicaron en la sección II.9.b. Los números corresponden a las masas moleculares (en kilodaltons) de los estándares proteicos utilizados.

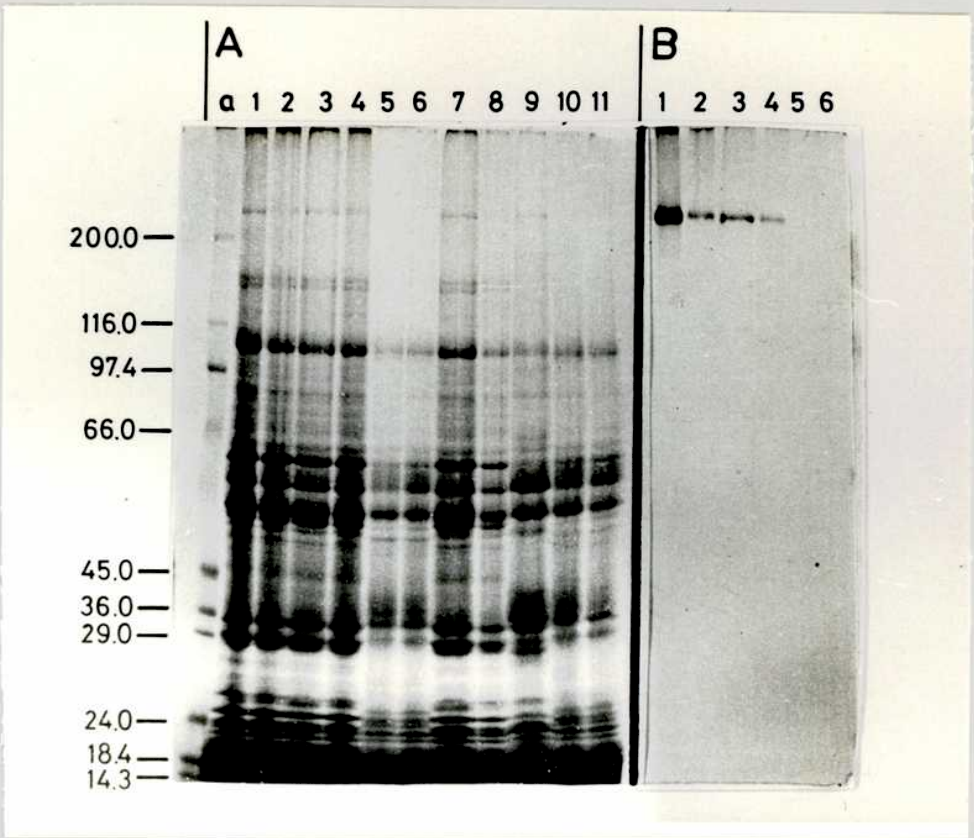

Figura 30: Electroforesis en gradiente de poliacrilamida de las membranas internas de diferentes cepas de A. tumefaciens. Experimento de pulso y "chase".
Las membranas internas de A. tumefaciens LBA 4001 (200 µg de proteínas) se incubaron con UDP-(^{14}C)glucosa en las condiciones estandar. La reacción se detuvo con TCA 10% y el precipitado se sometió a electroforesis en gradiente de poliacrilamida (5-15%), como se describió en la sección II.9.b. Las proteínas se revelaron por coloración con Coomassie blue (A) y la radioactividad se detectó por fluorografía (B). Los carriles 1 a 4 corresponden a un experimento de pulso y "chase". Después de 10 min de incubación de las membranas internas de A. tumefaciens LBA 4001 con UDP-(^{14}C)glucosa (carril 1), la radioactividad se diluyó por agregado de UDP-glucosa 2 mM no radioactivo y la reacción se detuvo con TCA 10% a los 5 min (carril 2), 15 min (carril 3) y 35 min (carril 4) del "chase" con UDP-glucosa. Los carriles 5 y 6 corresponden a las membranas internas de A. tumefaciens A 1011 y A 1045 respectivamente, incubadas con UDP-(^{14}C)glucosa durante 20 min. Los carriles 7, 8 y 9 corresponden a tres preparaciones diferentes de membranas internas de A. tumefaciens LBA 4001 sin incubar con UDP-(^{14}C)glucosa. Los carriles 10 y 11 corresponden a las membranas internas de A. tumefaciens A 1011 y A 1045 respectivamente sin incubar con UDP-(^{14}C)glucosa. Los números indican las masas moleculares (en kilodaltons) de estándares de proteínas.

experimento la banda radioactiva (Fig. 30-B) coincidió con una proteína revelada por coloración con Coomassie blue (Fig. 30-A). Por extrapolación de una curva de calibración se obtuvo un peso molecular aparente de 235.000 para la proteína radioactiva más abundante. Después del agregado de UDP-glucosa 2 mM, la radioactividad en la proteína glucosilada de 235 kDalton disminuyó rapidamente (Fig. 30-B, carriles, 2, 3 y 4). Como previamente se describió para los compuestos insolubles en TCA (sección III.7.), la proteína de 235 kDalton se comportó como un intermediario oligosacárido-proteína, de la síntesis del glucano β1-2. Las bandas de menor intensidad fueron apenas detectables en todos los tiempos.

El peso molecular del intermediario oligosacárido-proteína que se determinó es sólo aparente ya que la porción sacarídica puede modificar el comportamiento de la proteína en la formación del complejo con el SDS. Por otro lado, para obtener una mejor aproximación del peso molecular, la curva de calibración debería incluir estandars de pesos moleculares mayores. El estándar de mayor peso molecular utilizado fue la miosina de 205.000 .

Con este resultado, se demuestra sin ambigüedad que los compuestos radioactivos insolubles en TCA son (^{14}C)oligosacáridos β1-2 precursores de la síntesis del glucano β1-2 cíclico, unidos a una proteína de 235 kDalton de la membrana interna de A. tumefaciens.

III.11. Efecto del EDTA sobre la acumulación de los compuestos intermediarios

La formación del glucano β1-2 cíclico "in vitro" necesita la presencia de Mg^{++} o Mn^{++}, siendo 10 mM la concentración óptima de Mg^{++} y 5 mM, la de Mn^{++} aproximadamente (sección III.9.a.). Dado que la biosíntesis

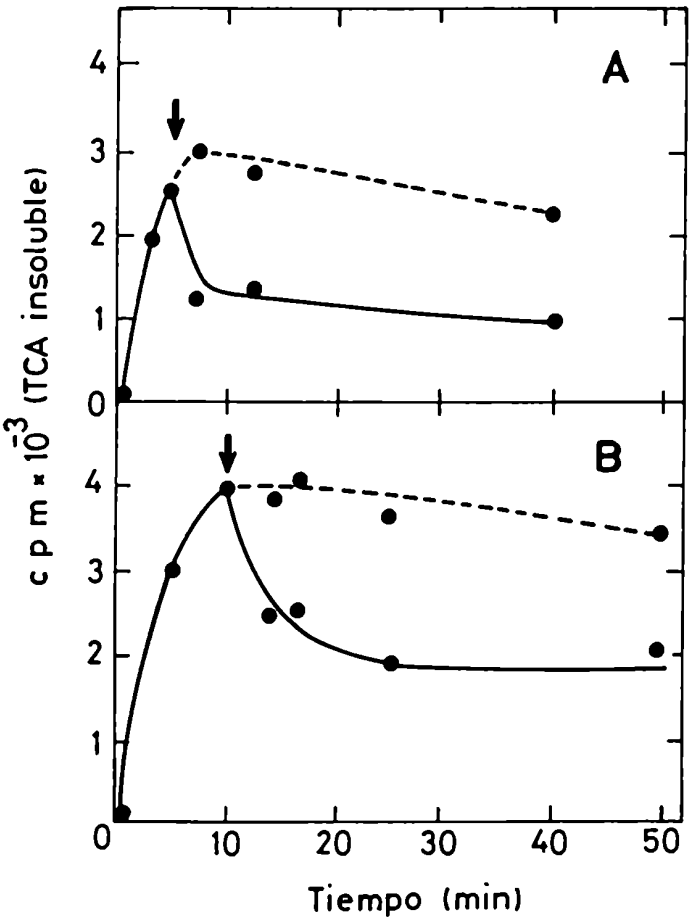

Figura 31: Efecto del EDTA sobre la acumulación de los compuestos intermediarios.
Se realizó la incubación de las membranas internas de A. tumefaciens LBA 4001 en las condiciones estandar (sección II.5.b.) en presencia de Cl_2Mg 10 mM (A) o Cl_2Mn 10 mM (B). Al tiempo indicado por la flecha en la figura, se agregó EDTA 50 mM y se midió a varios tiempos la radioactividad asociado a la fracción insoluble (compuestos intermediarios) (línea llena). La línea punteada corresponde a una curva control sin el agregado de EDTA.

requeriría de más de una etapa (elongación y terminación), se estudió el efecto del EDTA sobre la formación de los productos insolubles en TCA. Luego de incubar durante 5 minutos en presencia de Mg^{++} y durante 10 minutos en presencia de Mn^{++}, se agregó EDTA 50 mM, pH 8,2. A distintos tiempos se midió la radioactividad asociada a la fracción insoluble en TCA 5% (Fig. 31). Luego del agregado de EDTA, parte de los oligosacáridos precursores se liberaron de la proteína, pasando a la fracción soluble, como se puede ver por la rápida caída de la radioactividad asociada a compuestos insolubles en TCA. Esto se puede interpretar por la existencia de dos etapas: la elongación que requeriría la presencia del ion divalente, y la terminación, la cual incluiría una reacción de ciclización que no necesitaría la presencia del ion divalente:

$$\text{Etapa 1 - Prot + nUDP-Glc} \xrightarrow{Mg^{++} \text{ o } Mn^{++}} \text{Prot-(Glc}\beta\text{1-2)}_n + \text{nUDP (elongación)}$$

$$\text{Etapa 2 - Prot-(Glc}\beta\text{1-2)}_n \text{ ----- Prot +(Glc}\beta\text{1-2)}_n \text{ cíclico (terminación, ciclación)}$$

La terminación o ciclación en ausencia de reacción de elongación originaría la rápida caída de la radioactividad de la Fig. 31.

No se puede descartar que en condiciones en las que la elongación es imposible de llevar a cabo, esto es, ausencia de ion divalente libre, los glucanos β1-2 liberados posean grados de polimerización diferentes, probablemente menores, a los descriptos en la sección III.2.e. Esto ocurriría fundamentalmente en el caso que los pesos moleculares de los glucanos β1-2 cíclicos (productos finales) fueran el resultado de un compromiso entre las velocidades de elongación y terminación (ciclación). Por otro lado, además de las dos etapas mencionadas, existiría una reacción de iniciación de la sínte-

sis que influiría en la velocidad global.

III.12. Efecto del detergente Nonidet P-40 sobre la biosíntesis del glucano β1-2

La síntesis "in vitro" del glucano β1-2 cíclico se realizó utilizando una fracción particulada como preparación enzimática, las membranas internas de la bacteria. Las características de las vesículas de membranas internas dependen fundamentalmente del método de ruptura de las células. La presencia de detergente en la mezcla de reacción puede provocar ciertas alteraciones en estas estructuras que desfavorezcan o no la(s) actividad(es) enzimática(s) de síntesis del glucano. Se incubaron las membranas internas de A. tumefaciens con UDP-(^{14}C)glucosa en presencia de diferentes concentraciones de Nonidet P-40. A concentraciones bajas (de 0,02 a 0,2%) se observó muy poco efecto sobre la(s) actividad(es) enzimática(s) de síntesis del glucano (solo un 10% de inhibición a 0,2%). Por otro lado, los productos formados en presencia de las diferentes concentraciones del detergente fueron todos en igual grado muy poco sensibles a la glusulasa (jugo de caracol). Los glucanos sintetizados tuvieron entonces una estructura cíclica (ver sección III.2.f.). A concentraciones mayores de detergente (0,4-2%) se observó una inhibición apreciable de la síntesis del glucano medida a los 10 minutos de incubación (un 50% de inhibición en presencia de 2% de Nonidet P-40) (Fig. 32-A). El Nonidet P-40 afectó la velocidad de reacción ya que la incorporación de (^{14}C)-glucosa al glucano β1-2, a los 30 min fue muy similar a las diferentes concentraciones del detergente. Los niveles de oligosacárido-proteína intermediaria a los 10 min fueron idénticos en presencia de 0,4-2% de Nonidet

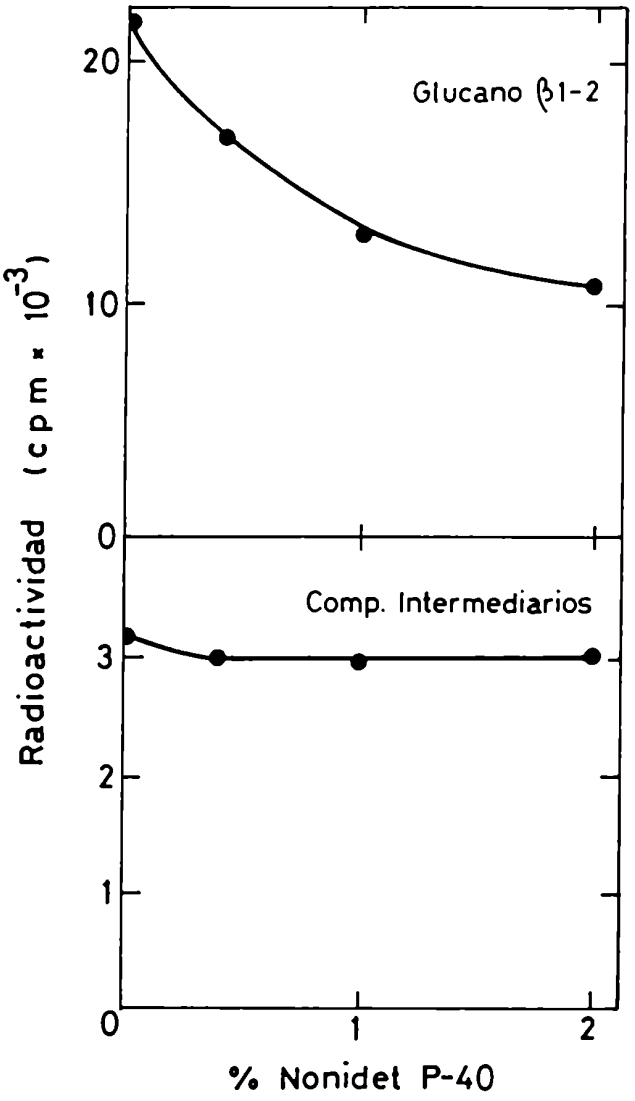

Figura 32: Efecto del detergente Nonidet P-40.
Las membranas internas de A. tumefaciens LBA 4001 se incubaron con UDP-(^{14}C)glucosa en las condiciones estandar (sección II.5.b.) y en presencia de 0; 0,4; 1 y 2% de Nonidet P-40. Luego de 10 min la reacción se detuvo por calentamiento a 100°C durante 1 min y se midió la formación del glucano β1-2 (A) y de los compuestos intermediarios (B), como se describe en la sección II.5.b.

P-40 (Fig. 32-B). Esto puede interpretarse como la acción de un efecto inhibitorio muy similar sobre la velocidad de las reacciones de elongación y terminación (ciclación). Los glucanos β1-2 sintetizados en presencia de 0,4-2% de Nonidet P-40 fueron insensibles al tratamiento con la glusulasa. Por lo tanto, aún a altas concentraciones de detergente no se producen alteraciones en las conformaciones del oligosacárido y/o de la proteína intermediaria así como en las estructuras de las vesículas de membranas que impidan la ciclación.

III.13. Efecto de osmolitos iónicos y no iónicos sobre la síntesis "in vitro" del glucano β1-2

Se midió el efecto de distintas concentraciones de ClNa y ClK (0-0,3 M) sobre la incorporación de (^{14}C)glucosa al glucano β1-2 y a la proteína intermediaria. Se observó un fuerte efecto inhibitorio sobre ambas incorporaciones medidas a los 10 minutos de incubación (Fig. 33). Una concentración de 120 mM de ClK y de 80 mM de ClNa inhibieron un 50% de la incorporación de (^{14}C)glucosa al glucano (Fig. 33-A). Las inhibiciones no fueron tan pronunciadas sobre la incorporación de (^{14}C)-glucosa a la proteína intermediaria (Fig. 33-B).

La inhibición observada se debió a un efecto de la fuerza iónica sobre la(s) actividad(es) enzimática(s) más que a un efecto osmótico ya que osmolitos no iónicos como la sacarosa y el manitol no ejercieron ningún efecto (Fig. 33).

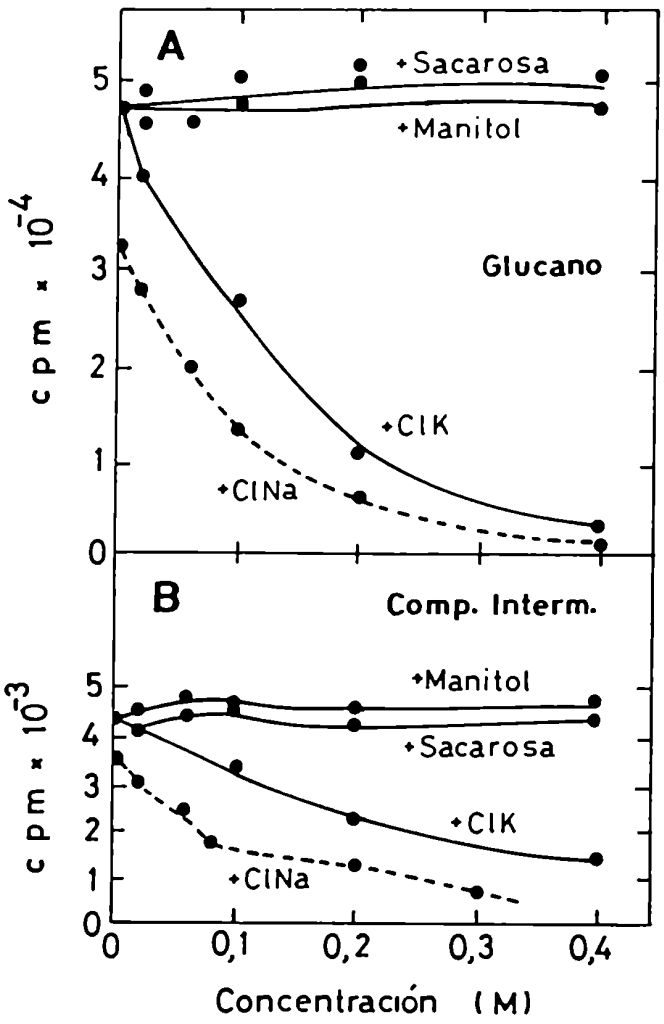

Fig. 33: Efecto de osmolitos iónicos y no iónicos.
Las membranas internas de A. tumefaciens LBA 4001 se incubaron con UDP(^{14}C)glucosa en las condiciones descriptas (sección II.5.b.) y en presencia de diferentes concentraciones de ClNa, ClK, manitol o sacarosa. Luego de 10 min se detuvo la reacción por calentamiento a 100° C y se midió la formación del glucano β1-2 (A) y de los compuestos intermediarios (B), como se explica en la sección II.5.b. La línea punteada indica que el experimento en presencia de distintas concentraciones de ClNa se realizó con una preparación enzimática diferente de membranas internas.

III.14. Síntesis "in vitro" del glucano β1-2 por diferentes cepas de A. tumefaciens virulentas y no virulentas

Garfinkel y Nester (82) obtuvieron por inserción cromosomal del transposon Tn5 mutantes avirulentas de A. tumefaciens. Como se mencionó en la sección I.1.b., dichas mutantes eran incapaces de unirse a la planta en las condiciones ensayadas. En un trabajo posterior la región cromosomal (de aproximadamente 11 kbases) que contenía las inserciones de Tn5 estas mutantes se analizó por mutagénesis con los transposones Tn3 y Tn3::HoHo 1 (67). Este estudio dividió a la región en dos locus chvA y chvB de 1,5 y 5 kilobases respectivamente (Fig. 2). Debido a la relación que existe entre los polisacáridos producidos por Rhizobium y Agrobacterium y el proceso de infección y más específicamente la adherencia (o unión) planta-bacteria, Puvenasarajah y col (180) midieron la síntesis "in vivo" del glucano β1-2 de las mutantes A2505 del locus chvA y A1011, A1020, A1038 y A1045 del locus chvB (Fig. 2). La mutante del locus chvA fue capaz de sintetizar "in vivo" el glucano β1-2, mientras que las mutantes chvB perdieron dicha habilidad. No se detectó la presencia del glucano en las mutantes chvB, ni en las células (luego de una extracción con fenol) ni en el medio de cultivo.

Se prepararon células permeabilizadas y/o membranas internas de las mutantes chvB de A. tumefaciens, así como de la cepa parental A723 y de otras dos cepas (ME2 y ME116) que contienen inserciones del Tn3 y del Tn3-HoHol respectivamente pero que no afectan la virulencia (67), y se midió la síntesis "in vitro" del glucano β1-2.

III.14.a. Síntesis "in vitro" del glucano β1-2 utilizando células permeabilizadas de las diferentes cepas

Se prepararon células permeabilizadas de las cepas mutantes mencionadas A. tumefaciens A1011 y A1045 y de la cepa salvaje LBA 4001 y se midió, a diferentes tiempos, la incorporación de radioactividad a la fracción neutra y soluble y a la fracción insoluble, como se describe en la sección II.5.b. La incorporación de radioactividad a la fracción neutra (Fig. 34-A) y a la fracción insoluble (Fig. 34-B) de las mutantes A1011 y A1045 fue 10 veces menor a los 15 min de incubación y la cinética de incorporación de la radioactividad fue claramente diferente (Fig. 34).

Dentro de los productos neutros y solubles formados por las células permeabilizadas se encuentra además del glucano β1-2, otro no identificado (ver sección III.4.). Por este motivo, fue necesario analizar los productos por cromatografía y determinar si las diferencias en las incorporaciones se debían al (^{14}C)-glucano β1-2. El análisis de la fracción neutra y soluble por HPLC mostró sin ambigüedad que en las condiciones ensayadas las preparaciones crudas de células permeabilizadas de las mutantes no sintetizan el glucano β1-2. En la Fig. 35 se muestra el perfil correspondiente a la mutante A1011. Los productos de las mutantes A1045, A1020 y A1038 dieron perfiles idénticos. La radioactividad incorporada se debió a la formación de compuestos de muy bajo peso molecular no identificados (tiempo de retención $<$ 10 min).

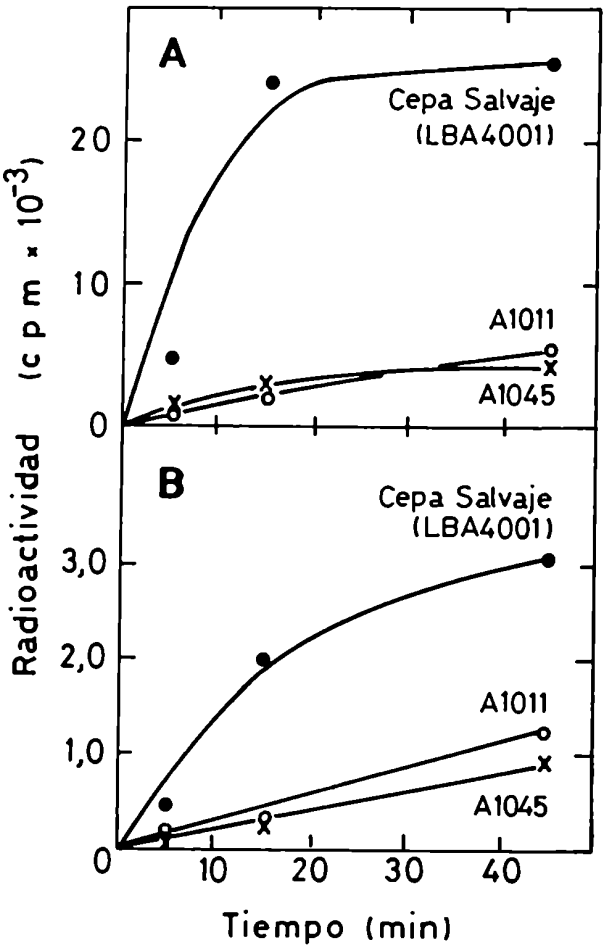

Fig. 34: Incorporación de (^{14}C)glucosa a la fracción neutra y soluble y a la fracción insoluble por las células permeabilizadas de diferentes cepas de A. tumefaciens

Las células permeabilizadas de A. tumefaciens LBA 4001 (●) y de las mutantes A1011 (○) y A1045 (x) se incubaron a diferentes tiempos con UDP-(^{14}C)glucosa en las condiciones descriptas en la sección II.5.a. Luego de detener la reacción por calor se midió la incorporación de (^{14}C)glucosa a la fracción neutra y soluble (A) y a la fracción insoluble en TCA (B) utilizando el método de las columnas pequeñas de DEAE-Sephadex (ver sección II.5.b.). Las cantidades de enzima (mg de proteínas) utilizadas de cada cepa fueron muy similares (aproximadamente 0,7 mg).

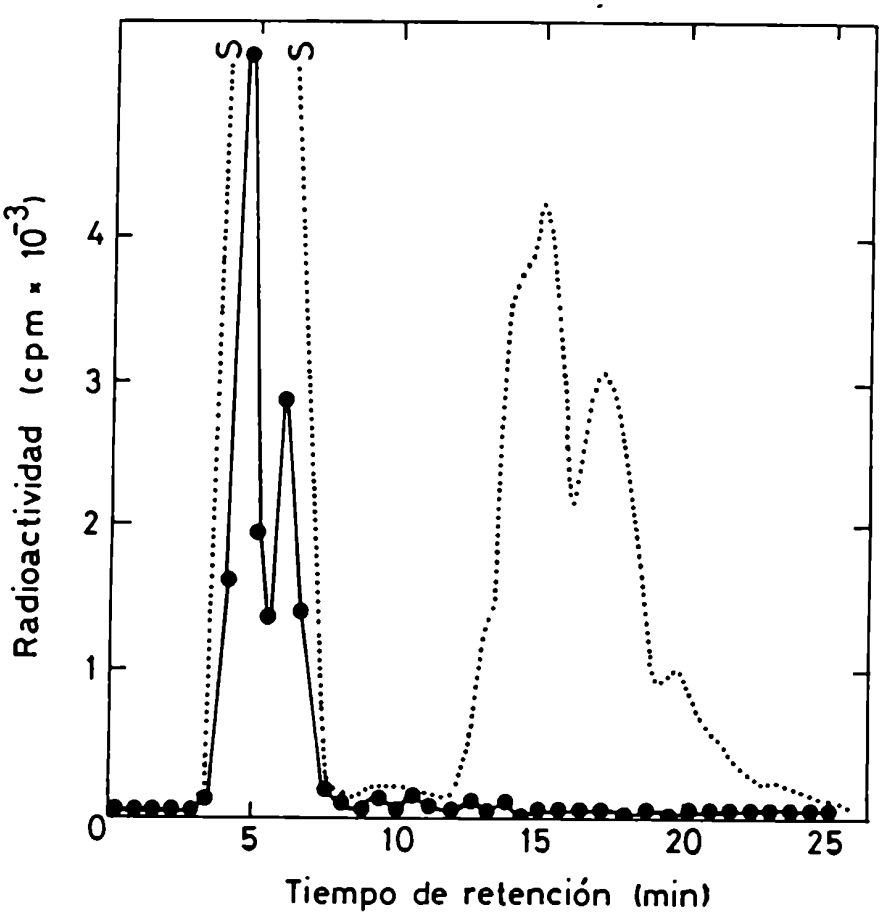

Fig. 35: HPLC de los productos neutros y solubles formados por las células permeabilizadas de A. tumefaciens A 1011 y LBA 4001
Los productos neutros y solubles formados por las células permeabilizadas de A1011 y LBA 4001 y obtenidos como se explica en la leyenda de la Fig. 34 se analizaron por HPLC en las condiciones descriptas en la sección II.8.d. El contenido total de las fracciones se contó con Bray en un contador de centelleo. Mutante A1011, línea llena; cepa salvaje LBA 4001, línea punteada.

III.14.b. Síntesis "in vitro" del glucano β1-2 utilizando membranas internas de las diferentes cepas

Se prepararon membranas internas de las cepas no virulentas A1011, A1020, A1038 y A1045 y de las cepas virulentas ME2 y ME116, así como de la cepa parental A723 y se midió la incorporación de (^{14}C)-glucosa a la fracción neutra y soluble como se explicó en la sección II.5.b. (Tabla IV).

Las membranas internas de las mutantes en el locus chvB incorporaron cantidades muy bajas de (^{14}C)-glucosa a la fracción neutra (glucano β1-2) ($<$10%) comparadas con la cepa parental A723 o la cepa salvaje LBA4001 (Tabla IV). Por otro lado las cepas ME2 y ME116, que poseen inserciones cromosomales de Tn3 y Tn3::HoHo1, respectivamente, que no afectan la virulencia (fenotipo idéntico a la cepa salvaje), incorporaron a la fracción neutra y soluble cantidades muy similares a las cepas salvajes (Tabla IV). En la Fig. 36 se muestra la cinética de incorporación de radioactividad a la fracción neutra y soluble (glucano β1-2) y a la fracción insoluble (proteína intermediaria) de las membranas internas de una de las mutantes (A1011). La incorporación a la fracción neutra (glucano β1-2) de la mutante fue despreciable con respecto al control (Fig. 36-A). Se observó una apreciable incorporación de radioactividad a la fracción insoluble (proteína intermediaria) pero que a diferencia del control fue lineal hasta los 30 min (Fig. 36-B). Los productos asociados a la fracción insoluble de las mutantes A1011 y A1045 se caracterizarán parcialmente en la sección siguiente (III.14.c.).

TABLA IV

Incorporación de glucosa a la fracción soluble y neutra por las membranas internas de las diferentes cepas de A. tumefaciens

Cepa	Virulencia	Unión a la planta	Incorporación de glucosa (nmol/h.mg prot.)
A1011 chvB::Tn5			0,2
A1020 chvB::Tn5			0,2
A1038 chvB::Tn5			0,2
A1045 chvB::Tn5			0,2
ME2 cromosoma::Tn3	+	+	3,6
ME116 cromosoma Tn3::HoHo1	+	+	3,7
A723 (cepa salvaje)	+	+	2,6
LBA4001 (cepa salvaje)	+	+	4,1

La reacción se detuvo a los 60 min de la incubación de las membranas internas (0,2 a 0,3 mg de proteínas) con UDP-(^{14}C)glucosa. Las características fenotípicas de cada cepa (virulencia y unión a la planta) se describieron previamente (82,67).

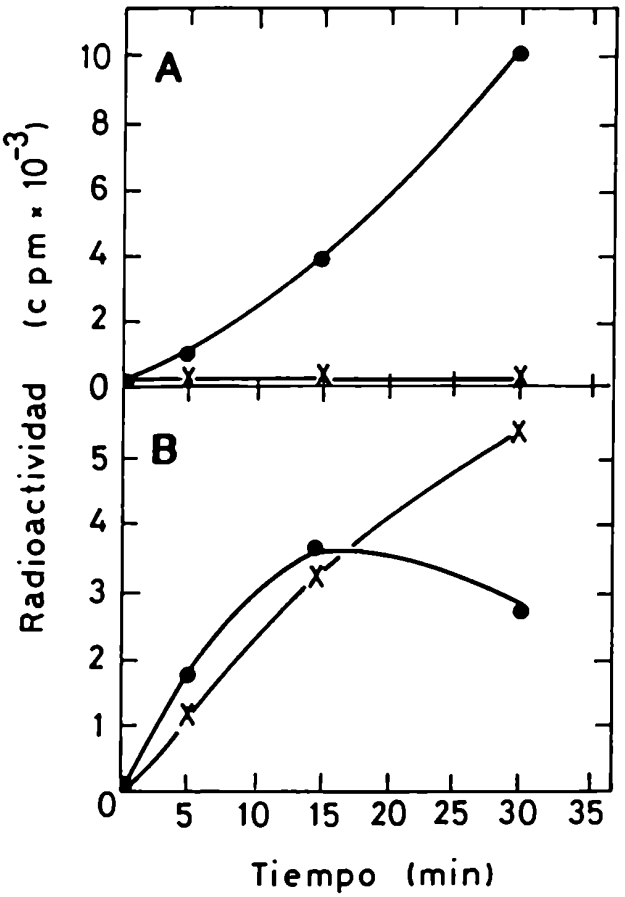

Fig. 36: Curva de tiempo de incorporación de radioactividad a las fracciones soluble e insoluble por la mutante A1011
La incubación de las membranas internas de A. tumefaciens A1011 (x) con UDP-(^{14}C)glucosa se realizó en las condiciones estándar (sección II.5.b.) y se midió la incorporación de ^{14}C-glucosa a la fracción neutra y soluble (A) y a la fracción insoluble en TCA (B). La cepa utilizada como control fue una revertante obtenida en el laboratorio de A. tumefaciens A1045, sensible al antibiótico carbencilina y capaz de sintetizar el glucano β1-2 (●).

Las cinéticas de incorporación de radioactividad a las fracciones neutra y soluble y a la insoluble de las cepas virulentas ME2 y ME116 fueron muy similares a las correspondientes de la cepa salvaje (no se muestra).

Los productos solubles y neutros formados por las membranas internas de las diferentes cepas se analizaron por HPLC. No se detectó el glucano β1-2 (tiempo de retención mayor de 30 min) dentro de los productos de las mutantes no virulentas A1011, A1020, A1038 y A1045. Sólo se detectaron compuestos que eluyeron con tiempos de retención menores de 5 min (este resultado se muestra en la Fig. 37-panel C (para la cepa A1020); los productos de las otras mutantes dieron el mismo perfil). Los productos neutros formados por las cepas virulentas ME2 y ME116 fueron idénticos a los correspondientes de la cepa salvaje (Fig. 37, paneles A, B y D).

La preparación cruda de células permeabilizadas así como las membranas internas purificadas de las mutantes en el locus chvB no virulentas fueron incapaces de sintetizar el glucano β1-2 a diferencia de las cepas virulentas analizadas (ME2 y ME116), cuyas membranas internas fueron tan activas como las de la cepa salvaje. En la sección III.14.g. se discutirá la relación que existiría entre la virulencia y la capacidad de síntesis del glucano β1-2.

III.14.c. Caracterización parcial de los productos insolubles en TCA formados por las mutantes

Con la finalidad de determinar si las mutantes chvB eran capaces de incorporar (^{14}C)-glucosa a una proteína intermediaria de la síntesis del glucano presente en las membranas internas, los productos insolubles en TCA for-

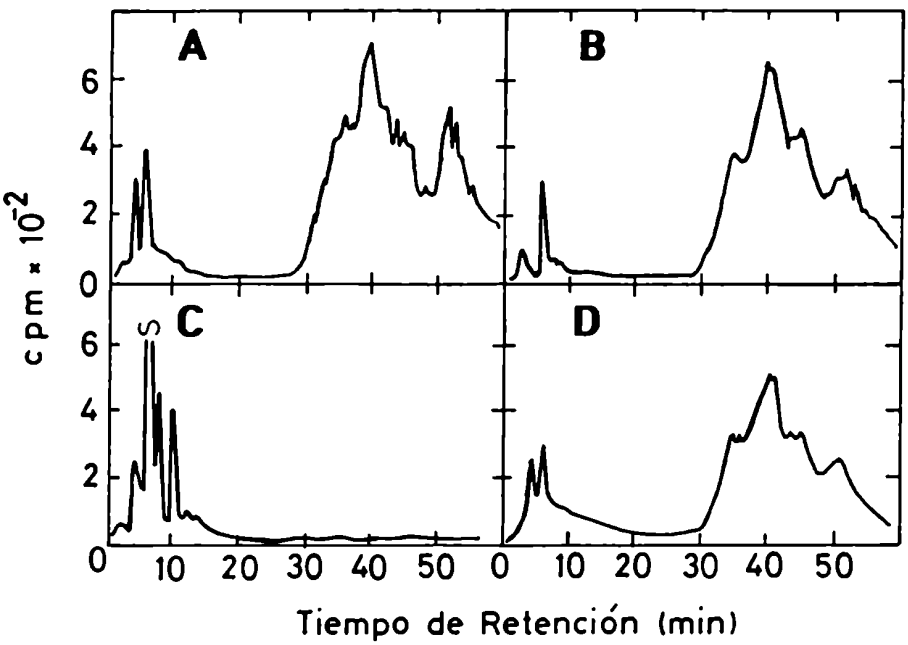

Fig. 37: HPLC de los productos neutros y solubles formados por las membranas internas de las diferentes cepas de A. tumefaciens

Los productos neutros y solubles (aproximadamente 4 x 10^4 cpm) formados por las membranas internas de A. tumefaciens A 723 (A), ME 2 (B), y ME 116 (D) y aproximadamente 6 x 10^3 cpm formados por las membranas internas de la mutante A 1020 (C) (ver sección II.5.b.), se analizaron por HPLC como se describió en la sección II.8.d.

mados por las mutantes A1011 y A1045 fueron parcialmente caracterizados. La formación de dichos compuestos fue lineal hasta aproximadamente los 40 min a diferencia de la radioactividad asociada a la proteína-oligosacárido intermediaria previamente caracterizada (ver sección III.7.), la cual llega a un máximo a un tiempo corto y después disminuye lentamente. La velocidad de incorporación de radioactividad a los compuestos insolubles en TCA fue mayor a 30°C que a 10°C. Por otro lado, la radioactividad asociada a dichos compuestos permaneció constante después del agregado de un exceso de UDP-glucosa no radioactivo ("chase") a los 40 min de la reacción en presencia de UDP-(^{14}C)glucosa. Este comportamiento también fue diferente al descripto para la oligosacárido-proteína-intermediaria (ver sección III.7.). El tratamiento con proteasa de los compuestos insolubles sólo solubilizó un 30% de la radioactividad y el 50% de los compuestos liberados por proteólisis se cargó positivamente en electroforesis con un buffer ácido (fórmico 5%). Estos resultados sugieren que la mayor parte de la radioactividad asociada a la fracción insoluble no corresponde a oligosacáridos unidos a alguna proteína de membrana. Por otro lado, las substancias que permanecieron insolubles después del tratamiento proteolítico sometidos a hidrólisis ácida parcial dieron un perfil de cromatografía en papel con el solvente C diferente al correspondiente del glucano β 1-2 (Fig. 38-B). En la Fig. 38-A se muestra el perfil obtenido de los productos de hidrólisis parcial de los compuestos insolubles de la mutante A1011. Los correspondientes de la mutante A1045 dieron un perfil muy similar. El disacárido obtenido por hidrólisis parcial y eluido del papel dio fundamentalmente galactosa por hidrólisis ácida total y cromatografía en papel con el solvente B.

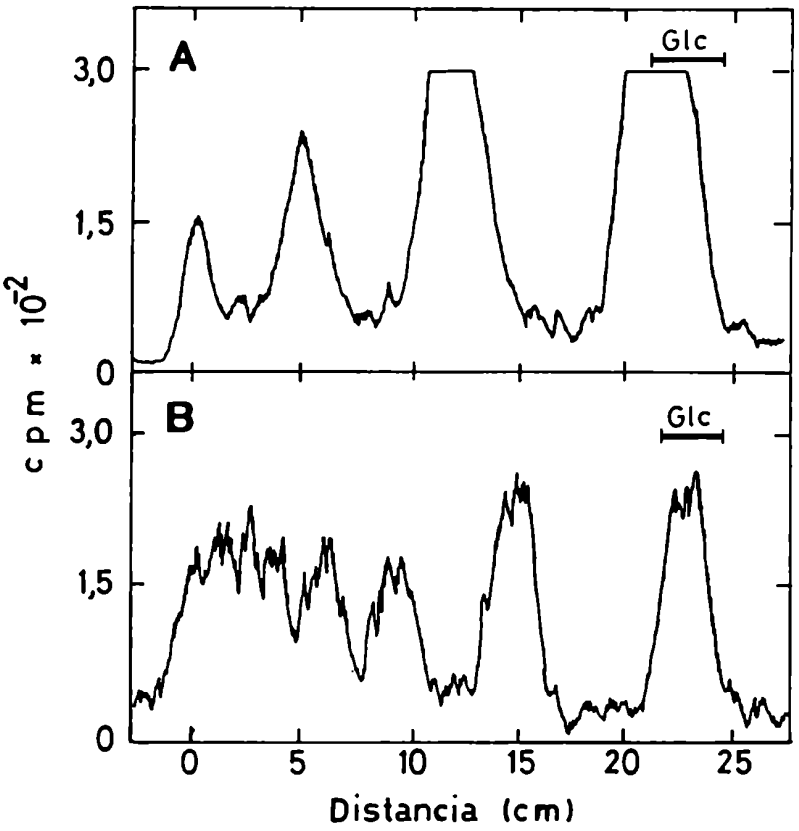

Fig. 38: Hidrólisis ácida parcial de los compuestos insolubles en TCA formados por la mutante A 1011
El precipitado obtenido después de centrifugar la mezcla de reacción (sección II.5.b.) se lavó varias veces con agua y se trató con proteasa en las condiciones descriptas (sección II.7.b.). Los compuestos radioactivos que permanecieron insolubles después de este tratamiento se sometieron a hidrólisis ácida parcial y se cromatografiaron en papel con el solvente C durante 3 días (A). Un estándar de glucano β1-2 se hidrolizó parcialmente en las mismas condiciones y se cromatografió paralelamente (B).

Estos resultados confirman que la mayor parte de los compuestos insolubles en TCA formados por las mutantes chvB no virulentas no están relacionados a la biosíntesis del glucano β1-2.

III.14.d. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS de las membranas internas de las diferentes cepas analizadas

Como se describió en la sección III.10., la oligosacárido-proteína intermediaria de 235 kDalton se identificó por fluorografía del gel en el cual se sometieron a electroforesis en gradiente de poliacrilamida con SDS las membranas de la cepa salvaje LBA4001 incubadas con UDP-(^{14}C) glucosa. La banda radioactiva (Fig. 30-B) (oligosacárido-proteína intermediaria) correspondió a una banda proteica revelada por Coomassie blue (Fig. 30-A). Las membranas internas de las cepas no virulentas mutantes A1011, A1020, A1038 y A1045, las cuales son incapaces de sintetizar el glucano β1-2 y de las cepas virulentas ME2 y ME116 se sometieron a electroforesis en gradiente de poliacrilamida con SDS junto con las membranas internas de la cepa parental A723 y la cepa salvaje LBA4001. Por coloración con Coomassie blue la proteína de 235 kDalton no se detectó en las membranas internas de las cepas no virulentas A1011, A1045, A1020 y A1038 (carriles 1 a 4, Fig. 39). La proteína de 235 kDalton tampoco se detectó en las membranas internas de las mutantes luego de tinción del gel por el método de plata (no se muestra). Las membranas internas de las cepas virulentas ME2 y ME116 tuvieron cantidades similares a las de las cepas salvajes A723 y LBA4001 de la proteína-intermediaria (carriles 5 a 8, Fig. 39). No se detectaron otras diferencias evidentes entre los perfiles proteicos de las membranas internas de las mutantes y los de las

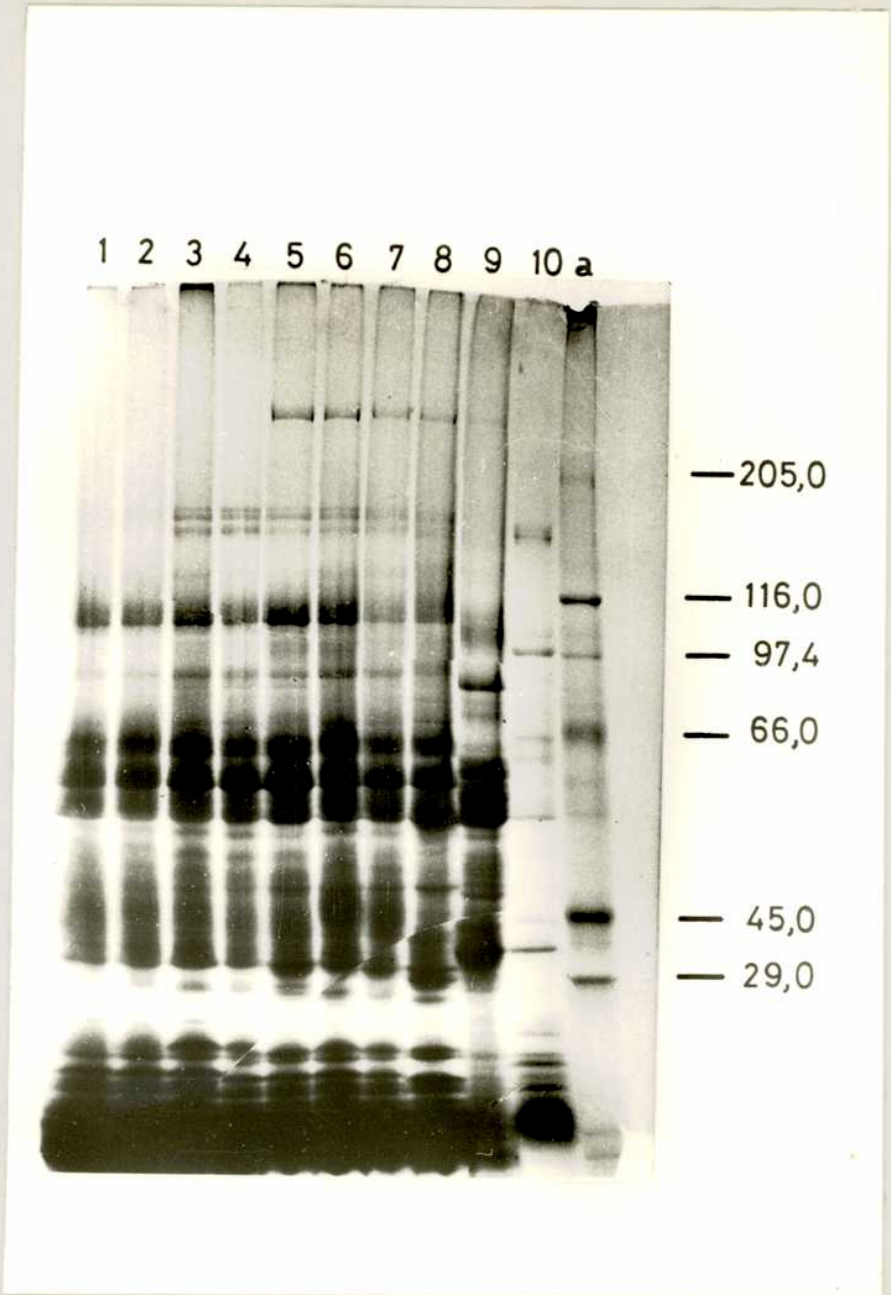

Fig. 39: Electroforesis en poliacrilamida con SDS de las membranas internas de diferentes cepas de A. tumefaciens

Las membranas internas de las diferentes cepas de A. tumefaciens (aproximadamente 0,2 mg) se sometieron a electroforesis en gradiente de poliacrilamida (5-15%) en presencia de SDS. Según se explicó en la sección II.9.b. Carril 1, A 1011; carril 2, A 1045; carril 3, A 1020; carril 4, A 1038; carril 5, ME 2; carril 6, ME 116; carril 7, A 723; carril 8, LBA 4001; carril 9, Rhizobium meliloti 51J0; carril 10, E. coli; carril a, estándares de pesos moleculares. Los números indican las masas moleculares de los estándares utilizados (en kilodaltons).

cepas virulentas (ME2, ME116, A723 y LBA4001). En otros experimentos las membranas internas de las diferentes cepas se incubaron con UDP-(^{14}C)glucosa en las condiciones descriptas en Materiales y Métodos y las fracciones precipitables con TCA se sometieron a electroforesis en el mismo sistema. No se detectó la proteína intermediaria de 235 kDalton por fluorografía del gel en las mutantes A1011, A1020 (Fig. 30-B, carriles 5 y 6), A1038 y A1045 (Fig. 40-B, carriles 8 y 9) ni de ninguna otra proteína radioactiva. La radioactividad asociada a la proteína de 235 kDalton en las membranas internas de las cepas virulentas ME116 y ME2 fue muy similar a la correspondiente de las cepas salvajes A723 y LBA4001 (Fig. 40-B, carriles 4 a 7).

Los paneles A de las figuras 30 y 40 corresponden a los perfiles proteicos obtenidos por coloración con Coomassie blue. Las diferencias observables entre los perfiles proteicos de la cepa salvaje LBA4001 y las mutantes A1011 y A1045 (Fig. 30-A) no se detectaron cuando se compararon con la cepa parental (Fig. 39).

Las mutantes avirulentas obtenidas por inserción cromasomal del Tn5 en el locus chvB son incapaces de sintetizar el glucano β1-2 por no tener la proteína intermediaria de 235 kDalton en las membranas internas sobre la cual se sintetizan las cadenas de oligosacáridos β1-2. Las cepas virulentas ME2 y ME116 las cuales sintetizan el glucano β 1-2 en cantidades normales poseen como era previsible la proteína intermediaria. Esta correlación entre la capacidad de síntesis del glucano β1-2 y la presencia de la proteína intermediaria de 235 kDalton en las membranas internas, enfatiza el rol de dicha proteína en la biosíntesis del glucano β1-2.

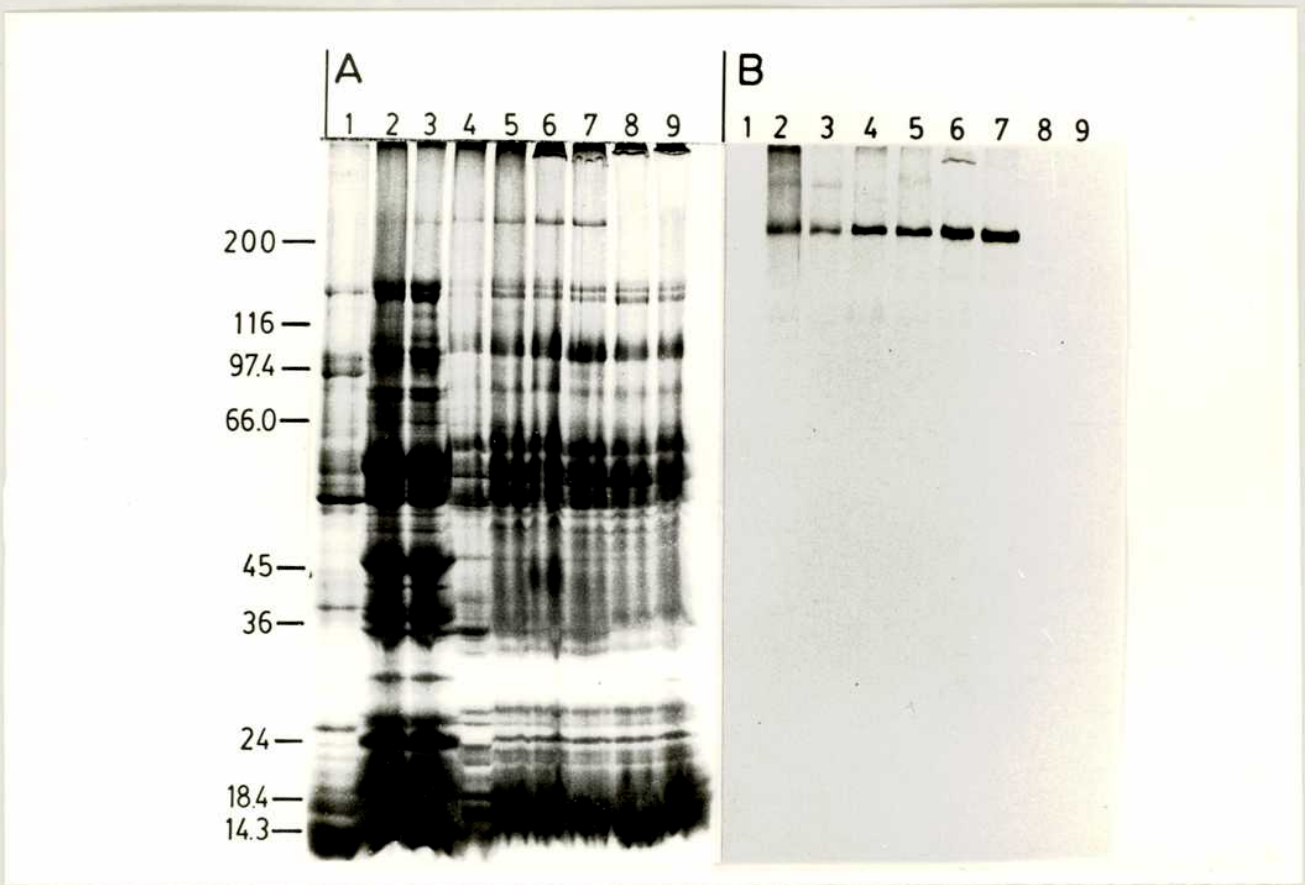

Fig. 40: Electroforesis en gradiente de poliacrilamida de las membranas internas de las diferentes cepas incubadas con UDP-(^{14}C)glucosa
Las membranas internas (0,2-0,3 mg de proteínas) se incubaron con UDP-(^{14}C)glucosa en las condiciones estándar durante los tiempos y variantes que se indicarán, y se sometieron a electroforesis en gradiente de poliacrilamida (5-15%) como se describió en la sección II.9.b. Las proteínas se tiñeron con Coomassie blue (A) y la radioactividad se detectó por fluorografía (B). Carril 1, E. coli, 20 min a 20°C en presencia de Cl_2Mn 10 mM; carril 2, R. meliloti 20 min a 20°C en presencia de Cl_2Mn 30 mM; carril 3, R. meliloti, 20 min a 20°C en presencia de Cl_2Mn 10 mM; carril 4, A. tumefaciens LBA 4001, 10 min; carril 5, A. tumefaciens A 723, 10 min; carril 6, A. tumefaciens ME 116, 10 min; carril 7, A. tumefaciens ME 2, 10 min; carril 8, A. tumefaciens A 1038, 10 min; carril 9, A. tumefaciens A 1020, 10 min. Los números indican las masas moleculares (en kilodaltons) de los estándares proteicos.

III.14.e. Estudio de la reacción de elongación. Soforosa como aceptor exógeno

La proteína de 235 kDalton funciona como intermediaria de la síntesis del glucano β1-2 aceptando residuos de glucosa. Dicha proteína actuaría solo como "proteína aceptora" o bien poseería también actividad enzimática en si misma (actividad de "transferasa" y/o "ciclasa"). En este caso, la proteína tendría un dominio donde se localizaría el sitio aceptor y otro(s) dominio(s) donde se localizaría(n) la(s) actividad(es) enzimática(s).

Para el dosaje de las actividades enzimáticas de elongación y/o ciclación en ausencia de la proteína aceptora, se usó un aceptor alternativo. Como se describirá en la sección III.16., las membranas internas de la cepa salvaje LBA4001 incubadas con UDP-(^{14}C)glucosa y el disacárido soforosa (glucosa β 1-2 glucosa) formaron un trisacárido radioactivo (soforotriosa). No se detectaron oligosacáridos de tamaños intermedios entre el glucano cíclico y la soforotriosa, en la fracción soluble. La actividad de β1-2 glucano-transferasa responsable de la formación del trisacárido pudo provenir de la misma proteína de 235 kDalton o de otra proteína presente en el extracto de membranas internas, la cual participaría en la síntesis del glucano β1-2. Las membranas internas de las mutantes A1011 y A1045 se incubaron durante 15 min con UDP-(^{14}C)glucosa en las condiciones descriptas en Materiales y Métodos y en presencia de soforosa 10 mM. No se detectó el trisacárido soforotriosa entre los productos de reacción de las membranas de las mutantes A1011 y A1045. Este resultado preliminar parecería indicar que las mutantes - las cuales son incapaces de sintetizar el glucano β1-2 y no tienen la proteína intermediaria de 235 kDalton - carecen de la actividad de

transferasa responsable de la formación del trisacárido. Por lo tanto, las mutaciones en el locus chvB afectan también dicha actividad de transferasa, lo cual sugiere a la misma proteína de 235 kDalton, como responsable de esta actividad.

La confirmación de estos resultados preliminares, la realización de experimentos similares y la purificación de la proteína de 235 kDa, ayudarán a determinar si la proteína intermediaria de 235 kDalton posee actividad enzimática en si misma.

III.14.f. Resumen de las características fenotípicas de las diferentes cepas y discusión

Como ya se mencionó, las mutantes avirulentas en el locus chvB de A. tumefaciens son defectivas en la unión con la planta, primer o uno de los primeros pasos del proceso de infección. Esto probablemente se deba a alguna alteración de la superficie celular de la bacteria, la cual modifique la arquitectura de la pared celular. La ausencia del glucano β1-2 en las células podría ser la causa de dicha alteración. La arquitectura defectuosa produciría el fenotipo descripto para las mutantes chvB, las cuales son pleiotrópicas, ya que además de ser avirulentas son no móviles por carecer de flagelo y presentan resistencia a dos fagos (67).

Se verificó la falta de movilidad de las mutantes analizadas, por observación microscópica en contraste de fase de cultivos frescos (densidad óptica a 660 nm $\lesssim$ 1). Las mutantes chvB fueron no móviles a diferencia de la cepa parental A723 y las cepas ME2 y ME116 las cuales fueron móviles (aproximadamente un 70% de las células). Este porcentaje fue disminuyendo con

el tiempo de observación al microscopio. A los 10 min el porcentaje de células móviles fue muy bajo (5-10%).

En la Fig. 2 se muestra un mapa de restricción de EcoRI (E) de la región cromosomal de virulencia de A. tumefaciens que incluyen los locus chvB y chvA (67). Las inserciones de los transposones Tn3 y Tn3-HoHo1 en las cepas virulentas ME2 y ME116 respectivamente, previamente ubicadas dentro del locus chvB, fueron recientemente remapeadas (261), encontrándose que están ubicadas fuera del locus chvB. Por lo tanto no están descriptas cepas que contengan inserciones en dicho locus que presenten el fenotipo salvaje. Las mutantes en el locus chvB (A1011, A1020, A1038 y A1045) fueron incapaces de sintetizar el glucano β1-2 "in vivo" (180), o "in vitro" (esta tesis) por no tener la proteína intermediaria de 235 kDalton en sus membranas internas (Tabla V). Esta proteína además de funcionar como aceptora de residuos de glucosa podría contener dominios con actividad enzimática de transferasa y/o ciclasa. En tal caso, las mutantes serían defectuosas en el sistema enzimático de síntesis del glucano β1-2. Por otro lado, las cepas ME2 y ME116 virulentas que contienen inserciones de los transposones Tn3 y del Tn3-HoHo1 respectivamente, sintetizan cantidades normales del glucano β1-2 y contienen la proteína de 235 kDalton (Tabla V). Esto muestra una correlación entre la presencia de la proteína de 235 kDalton en las membranas internas y la capacidad de síntesis del glucano β1-2, que enfatiza el rol de dicha proteína.

Las mutantes avirulentas chvB son defectuosas en un paso temprano del proceso de infección: la unión a la planta (82,67). La adherencia es un prerequisito para la transferencia del T-DNA del plásmido Ti a la célula de la planta. La incapacidad de dichas mutantes de sintetizar el glucano β1-2 provocaría la unión defectiva bacteria-planta y por lo tanto la avirulencia.

Sin embargo, las mutantes chvB son pleiotrópicas, ya que adicionalmente son no móviles (Tabla V) (67), presentan resistencia a dos fagos (67) y no pueden transferir conjugativamente el plásmido pAgk84 (A. Kerrs, resultados no publicados). Por lo tanto, el mismo defecto bioquímico (ausencia del glucano β1-2) podría ser el responsable del fenotipo pleiotrópico de las mutantes o en forma indirecta producir alteraciones en la superficie celular que afecten dichas funciones.

El locus chvB tiene 5 kilobases de longitud y consiste en una única unidad transcripcional (67). Una posibilidad es que el locus completo contenga el gen estructural de la proteína de 235 kDalton o que se encuentren codificadas funciones regulatorias de la síntesis de dicha proteína. Recientemente, por estudios bioquímicos de diferentes cepas que contienen inserciones del transposón Tn3-HoHo1 fuera del locus chvB y cerca del extremo 3', se determinó que el gen estructural de la proteína de 235 kDalton se encuentra parcialmente contenido en dicho locus pero se extiende 3,5 kilobases "downstream" fuera del mismo (261).

TABLA V

Resumen de las caracteristicas fenotipicas de las cepas analizadas

Cepa	Virulencia (unión a la planta)	Adherencia	Movilidad	Síntesis glucano β1-2	Proteína 235 kDa
A. tumefaciens:					
A1011 chvB::Tn5					
A1020 chvB::Tn5					
A1038 chvB::Tn5					
A1045 chvB::Tn5					
ME2 Crom::Tn3	+	+	+	+	+
ME116 Crom::Tn3-HoHo1	+	+	+	+	+
LBA 4001 (cepa salvaje)	+	+	+	+	+
A723 (cepa parental)	+	+	+	+	+
E. coli					
R. meliloti 102F51				+	+

La virulencia, la unión a la planta y la movilidad de las cepas de A. tumefaciens fueron previamente determinadas (82,67). La movilidad fue verificada (sección III.14.f.).

III.15. Estudio de los compuestos intermediarios de la biosíntesis del glucano β1-2 en R. meliloti

Rhizobium y Agrobacterium pertenecen a la misma familia: Rhizobiaceae. Si bien producen efectos biológicos muy diferentes en las plantas, presentan características bioquímicas muy parecidas. R. meliloti y A. tumefaciens excretan al medio de cultivo exopolisacáridos idénticos. Por otro lado, se ha descripto para la mayoría de los géneros de esta familia la producción "in vivo" del glucano β1-2 cíclico. En la sección III.1. se mencionaron los resultados que habían sido obtenidos en el laboratorio respecto de la síntesis "in vitro" del glucano β1-2 en R. meliloti. En condiciones muy similares a las utilizadas para A. tumefaciens, las células permeabilizadas de R. meliloti sintetizan una familia heterogénea de glucanos β1-2 cíclicos cuyos componentes mayoritarios tienen pesos moleculares levemente mayores a los correspondientes de A. tumefaciens (ver sección III.2.e.).

Se prepararon membranas internas de R. meliloti con la finalidad de estudiar los compuestos intermediarios de la biosíntesis del glucano β1-2 cíclico en dicha bacteria. Se midió la formación de compuestos solubles y neutros y de compuestos insolubles en TCA, a diferentes tiempos de la incubación con UDP-(^{14}C)glucosa en presencia de Mg^{++}, en las condiciones estándar (sección II.5.b.). Se encontró incorporación de radioactividad a la fracción insoluble (compuestos intermediarios) que representó un 10% de la incorporación a la fracción soluble y neutra (glucano β1-2), a los 30 min de incubación (Fig. 41). Este porcentaje fue muy similar al medido para A. tumefaciens a los 20 min de incubación (sección III.7.) (Fig. 21), en las mismas condiciones. Sin embargo, la actividad de síntesis del glucano β1-2 en R.

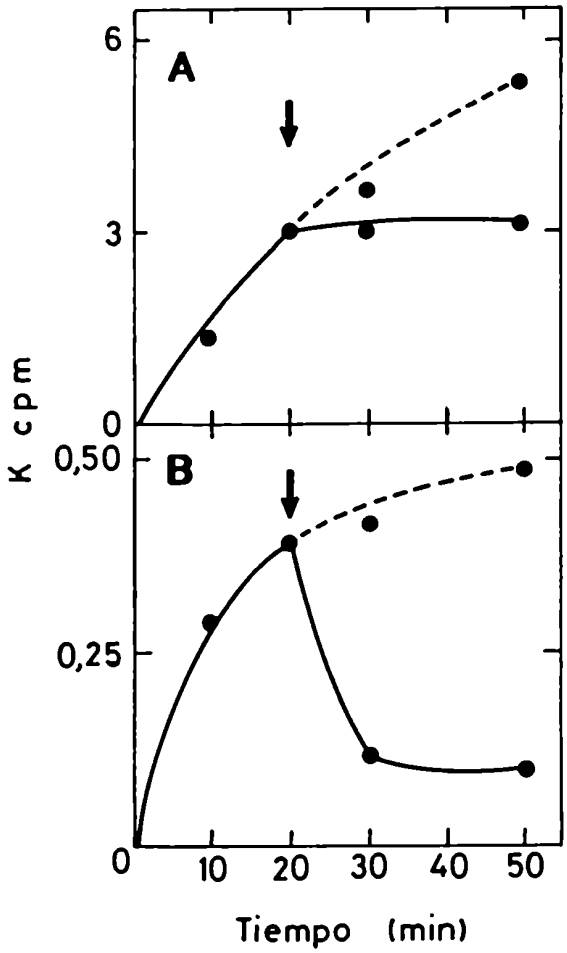

Fig. 41: Biosíntesis del glucano β1-2 por las membranas internas de R. meliloti

El experimento se realizó en las condiciones estándar (sección II.5.b.). A) Incorporación de ^{14}C-glucosa al glucano β1-2 (fracción soluble y neutra). B) Incorporación de ^{14}C-glucosa a la proteína intermediaria (fracción insoluble en TCA). La flecha indica el agregado de UDP-glucosa no radioactivo 2 mM a los 20 min de la reacción. La línea punteada corresponde a un control sin el agregado de UDP-glucosa.

meliloti (incorporación a la fracción soluble y neutra) fue un orden de magnitud inferior comparando tiempos idénticos de incubación. Un 70% de la radioactividad asociada a la fracción insoluble se solubilizó luego del agregado de un exceso de UDP-glucosa no radioactivo ("chase"), a los 20 minutos de incubación (Fig. 41-B). La velocidad de incorporación de radioactividad a la fracción soluble y neutra (glucano β1-2) disminuyó apreciablemente después del "chase" con UDP-glucosa (Fig. 41-A). Este comportamiento fue similar al descripto para el producto final (glucano β1-2) y los compuestos intermediarios (oligosacárido-proteína intermediaria) en A. tumefaciens (Fig. 22). Las condiciones estándar de incubación (10°C, tiempos cortos, Mg^{++} 10 mM) para la síntesis "in vitro" del glucano β1-2 y acumulación de radioactividad en la proteína intermediaria pueden no ser las apropiadas para el sistema en R. meliloti, cuyas velocidades de reacción fueron apreciablemente menores. La acumulación de radioactividad a la fracción insoluble fue mayor a 20°C (Fig. 42-B), mientras que la incorporación a la fracción soluble y neutra (glucano β1-2) aumentó con la temperatura en forma lineal hasta los 30°C (Fig. 42-A). Por otro lado, se midió la incorporación a ambas fracciones (soluble, neutra e insoluble), en presencia de diferentes concentraciones de Cl_2Mn y Cl_2Mg. Se observaron mayores incorporaciones en presencia de Mn^{++} como ion divalente (Fig. 43). El óptimo de Mn^{++} para la formación del glucano β1-2 estuvo cerca de 10 mM, mientras que en presencia de Mg^{++} la incorporación aumentó en forma lineal hasta 20 mM de Mg^{++} y fue un poco mayor en Mg^{++} 30 mM. Por otro lado, la acumulación de radioactividad en la fracción insoluble aumentó en forma lineal de 0 a 30 mM de Mn^{++} mientras que llegó a un plateau en 20 mM de Mg^{++}. Sin embargo, la radioactividad acumulada a concentraciones altas de Mn^{++} pudo provenir de compuestos no relacionados a la

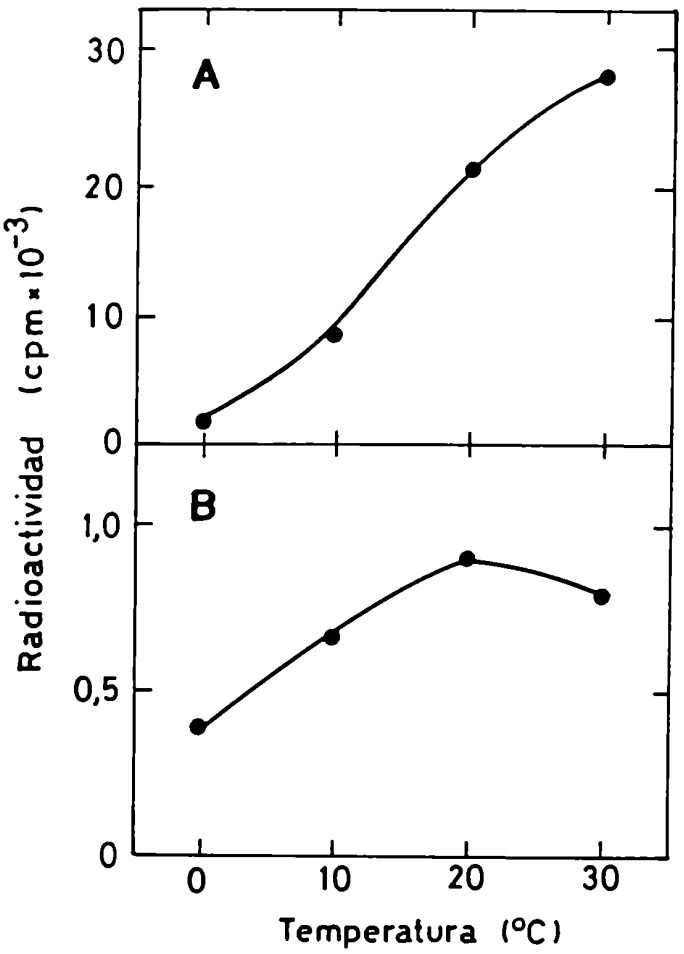

Fig. 42: Curva de temperatura
La incubación de las membranas internas de R. meliloti con UDP-(^{14}C)glucosa se realizó en las condiciones estándar (sección II.5.b.) durante 20 min y a las temperaturas indicadas en la figura. Luego de detener la reacción por calentamiento a 100° C durante 1 min, se midió la formación del glucano β1-2 (A) y la incorporación a la proteína intermediaria (B) (sección II.5.b).

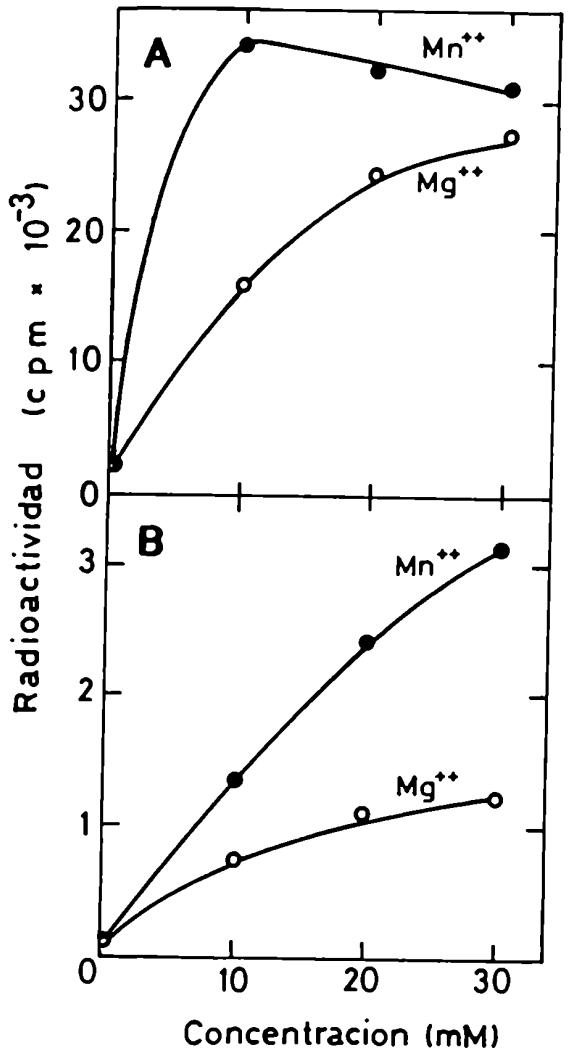

Fig. 43: Curva de ión divalente
La incubación de las membranas internas de R. meliloti con UDP(^{14}C)glucosa se realizó a 20°C durante 20 min y en presencia de diferentes concentraciones de Cl_2Mg (○) o Cl_2Mn (●). Luego de detener la reacción se midió la formación del glucano β1-2 (A) y la incorporación de ^{14}C-glucosa a la proteína intermediaria (B) (ver sección II.5.b.).

biosíntesis del glucano β 1-2. En un experimento de pulso y "chase" se observó que sólo un 25% de la radioactividad acumulada en la fracción insoluble a los 20 min de incubación, 20°C y a 30 mM de Cl_2Mn se solubilizó luego del agregado de un exceso de UDP-glucosa. El restante 75% formado en dichas condiciones puede entonces no estar relacionado con los compuestos intermediarios. Las membranas internas de R. meliloti fueron incubadas con UDP-(^{14}C)glucosa, a 20°C durante 20 min y a dos concentraciones diferentes de Cl_2Mn (10 y 30 mM) y sometidas a electroforesis en gradiente de poliacrilamida con SDS. La proteína de 235 kDalton fue detectada en las membranas internas de R. meliloti por coloración con Coomassie blue (Fig. 39, carril 9 y Fig. 40-A, carriles 2 y 3). Por otro lado, la radioactividad correspondiente a la fracción insoluble en TCA, estuvo asociada a dicha proteína (Fig. 40-B, carriles 2 y 3) a las dos concentraciones de Mn^{++} utilizadas en la incubación. Como control, se prepararon membranas internas de Escherichia coli y se incubaron con UDP-(^{14}C)glucosa durante 20 min, a 20°C, y en presencia de Cl_2Mn 10 mM. La proteína intermediaria de 235 kDalton no estuvo presente en las membranas internas de Escherichia coli, una bacteria que no produce el glucano β 1-2 cíclico (Fig. 39, carril 10 y Fig. 40-A, carril 1). Por fluorografía, no se detectó radioactividad asociada a dicha proteína ni a ninguna otra (Fig. 40-B, carril 1).

Las membranas internas de R. meliloti fueron capaces de sintetizar "in vitro", el glucano β 1-2 cíclico, si bien la velocidad de incorporación de radioactividad al glucano fue casi un orden de magnitud inferior. La proteína intermediaria de 235 kDa fue detectada por Coomassie blue o por fluorografía del gel en el cual se sometieron a electroforesis las membranas internas de

R. meliloti incubadas con UDP-(^{14}C)glucosa.

Dicha proteína no se detectó ni por coloración con Coomassie blue, ni por fluorografía en la membranas internas de E. coli, una bacteria que no produce el glucano β1-2 cíclico.

III.16. Comparación con el sistema enzimático de síntesis de los "Oligosacaridos Derivados de Membrana" (MDO) de E. coli

III.16.a. Características del sistema enzimático de síntesis de los MDO

Los oligosacáridos derivados de membrana (MDO) de Escherichia coli son glucanos periplasmáticos que están substituídos variablemente con Sn-1-fosfoglicerol (derivados de fosfatidilglicerol), fosfoetanolamina y residuos ester de O-succinilo (201,238,120). Weissborn y Kennedy (245) describieron una actividad de glicosiltransferasa de E. coli que cataliza "in vitro", la elongación de cadenas de glucosa unidas en β1-2 (las cuales forman parte de los MDO). Esta actividad sería esencial para la síntesis "in vivo" de los MDO de E. coli. El sistema "in vitro" requiere UDP-glucosa, como dador de glucosas, Mg^{++}, un factor termoestable y soluble, la fracción enzimática de membranas y un aceptor exógeno tal como octil-β-glucósido o soforosa (glucosa β1-2 glucosa). En ausencia de un aceptor exógeno, la actividad enzimática medida "in vitro" es muy baja. Para comparar este sistema con el sistema de síntesis "in vitro" de los glucanos β1-2 cíclicos, se estudió el efecto del agregado de octil-β-glucósido y soforosa sobre la actividad enzimática.

III.16.b. Soforosa como aceptor exógeno

La soforosa (10 mM) tuvo muy poco efecto sobre la incorporación de radioactividad a la fracción soluble y neutra (glucano β 1-2) (sólo un 20-30% de estimulación medida a los 15-20 minutos de incubación en condiciones estándar). Sin embargo, cuando se analizaron los productos de la incubación, obtenidos en presencia del disacárido soforosa 10 mM, se observó la formación de un compuesto que cromatografió en papel con el solvente C delante del estándar de maltotriosa (Fig. 44). La radioactividad en el origen (O) corresponde al glucano β 1-2. Las membranas internas incubadas con UDP-(^{14}C)glucosa a diferentes concentraciones de soforosa (0, 4, 10 y 50 mM) formaron cantidades crecientes del compuesto que llamamos S_3 (Fig. 45). El compuesto S_3 cromatografió en el mismo sistema en la misma posición que la soforotriosa obtenida por hidrólisis ácida parcial del glucano β 1-2 marcado con ^{14}C (no se muestra). No se detectaron otros oligosacáridos radioactivos y solubles de grados de polimerización intermedios entre la soforotriosa y los glucanos β 1-2 cíclicos (los cuales permanecen en el origen en el sistema cromatográfico utilizado). Este resultado indica que los glucanos β 1-2 cíclicos se formaron utilizando a la proteína-intermediaria como aceptora endógena y que el sistema sólo fue capaz de sintetizar ^{14}C-soforotriosa, a partir de soforosa como aceptor exógeno y UDP-(^{14}C)glucosa.

La actividad enzimática de glicosiltransferasa responsable de la formación de ^{14}C-soforotriosa, presente en las membranas internas puede o no participar en la biosíntesis del glucano β1-2 cíclico. En el caso de ser la actividad de glicosil transferasa que participa en la síntesis del glucano,

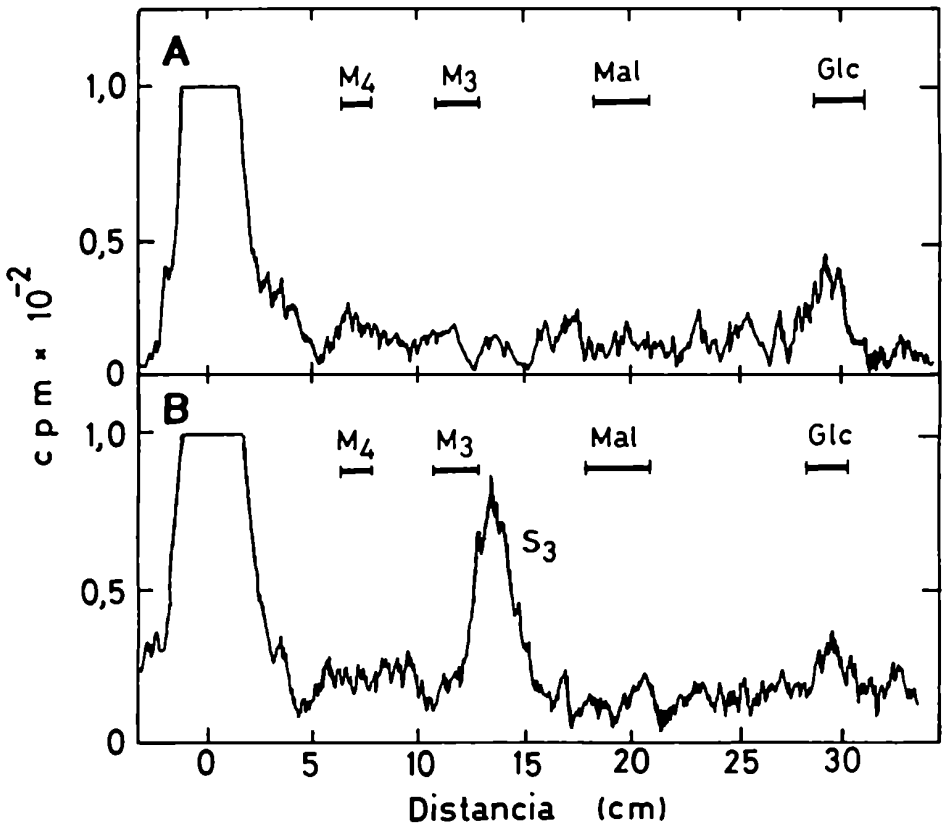

Fig. 44: Soforosa como aceptor exógeno
La incubación de las membranas internas de A. tumefaciens LBA 4001 con UDP-(^{14}C)glucosa se realizó durante 15 min en las condiciones estándar (sección II.5.b.) en presencia de soforosa (glucosa β1-2 glucosa) 10 mM. La fracción soluble y neutra se concentró con un rotavapor y vacío y se cromatografió en papel con el solvente C durante 3 días (B). Simultáneamente se cromatografió un control incubado en ausencia de soforosa (A). Glc, glucosa; Mal, maltosa; M_3, maltotriosa.

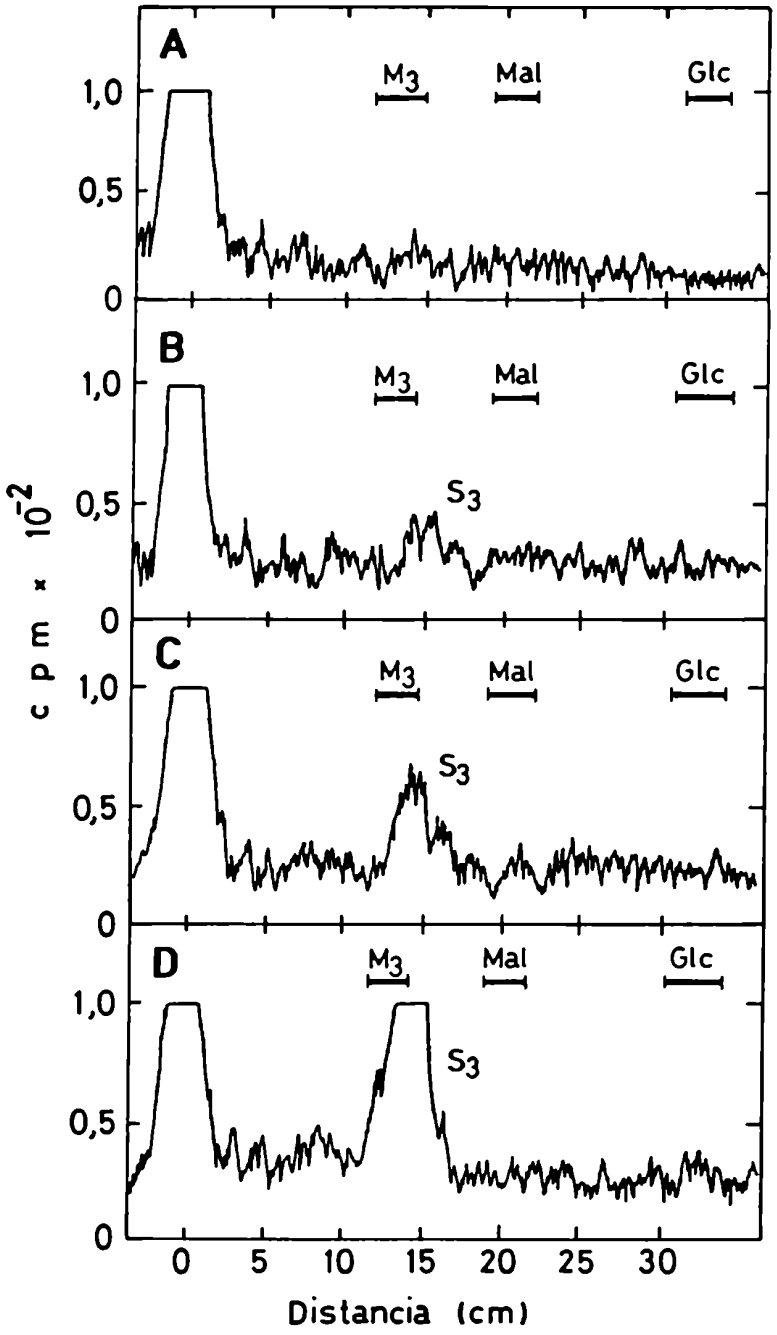

Fig. 45: Efecto de distintas concentraciones de soforosa
Se procedió como se describe en la leyenda de la figura 44. La incubación se realizó durante 20 min y en presencia de distintas concentraciones de soforosa. A) 0 mM, B) 4 mM; C) 10 mM, D) 50 mM. Glc, glucosa; Mal, maltosa; M_3, maltotriosa.

dicha actividad podría encontrarse en algún dominio de la misma proteína intermediaria de 235 kDa, como ya se discutió en la sección III.14.e.

III.16.c. Efecto del octil-β-glucósido

El octil-β-glucósido presentó un pequeño efecto estimulatorio sobre la incorporación a la fracción soluble y neutra (glucano β1-2) a concentraciones entre 0 y 5 mM (Fig. 46) y una fuerte inhibición a concentraciones mayores de 10 mM (Fig. 46). Esta inhibición puede deberse a un efecto detergente del compuesto. Los productos solubles y neutros formados en presencia de 0 a 5 mM de octil-β-glucósido, permanecieron en el origen en una cromatografía en papel con el solvente A. Este resultado indica que el octil-β-glucósido no actuó como aceptor de residuos de ^{14}C-glucosa, ya que en este caso se hubiera esperado una movilidad considerable en dicha cromatografía, debido al carácter no polar del octil-β-glucósido. Por otro lado, los glucanos sintetizados en presencia de diferentes concentraciones de octil-β-glucósido presentaron la misma baja sensibilidad a la glusulasa (10% liberación de ^{14}C-glucosa) lo que indica una estructura cíclica de los productos (ver sección III.2.f.). En el caso que el sistema hubiera utilizado al octil-β-glucósido como aceptor exógeno se esperaría una estructura lineal de los productos y por lo tanto una sensibilidad mayor a la glusulasa.

El sistema de síntesis "in vitro" del glucano β1-2 cíclico es diferente al sistema descripto por Weissborn y Kennedy (245) de los MDO de E. coli. El sistema de síntesis del glucano β1-2 es muy activo en ausencia de aceptores exógenos como octil-β-glucósido o soforosa y no requiere la presencia de un factor soluble termoestable aislado del citosol o periplasma de

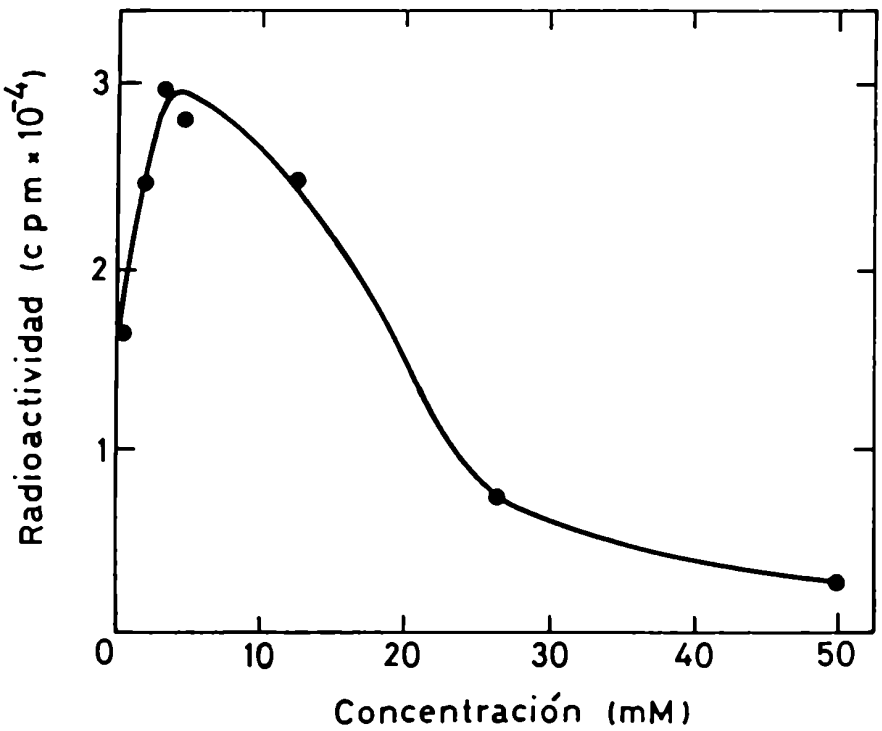

Fig. 46: Efecto del octil-β-glucósido sobre la síntesis del glucano β1-2
La incubación de las membranas internas de A. tumefaciens LBA 4001 con UDP-(^{14}C)glucosa (sección II.5.b.) se realizó en presencia de distintas concentraciones de octil-β-glucósido, durante 10 min y se midió la formación del glucano β1-2 como se describió en la sección II.5.b.

la bacteria. Es capaz de sintetizar soforotriosa libre (soluble) a partir de soforosa y UDP-(^{14}C)glucosa. Sin embargo, aún en estas condiciones o en presencia de octil-β-glucósido, utiliza al aceptor endógeno (proteína intermediaria de 235 kDa) para la síntesis del glucano β1-2 cíclico.

IV. CONCLUSIONES GENERALES Y COMENTARIOS

Los resultados descriptos en el presente trabajo de investigación permiten obtener las siguientes conclusiones:

1) El estudio de la estructura de los productos neutros formados "in vitro" por incubación de las células permeabilizadas o las membranas internas de A. tumefaciens con UDP-(^{14}C)glucosa y Mg^{++}, indicó que la mayor parte de ellos son glucanos con uniones glicosídicas β 1-2 de grado de polimerización variable comprendido entre 14 y 24. La ausencia de sorbitol entre los productos de reducción con borohidruro de sodio e hidrólisis ácida total, y del derivado tetrametilado de glucosa entre los productos de permetilación e hidrólisis ácida total, indican que se trata de una estructura macrocíclica similar a la de los glucanos β 1-2 que Agrobacterium y Rhizobium liberan al medio de cultivo, demostrada por Resonancia Magnética Nuclear y Espectometría de Masa por otros autores (64). Por otro lado, los glucanos sintetizados "in vitro" son poco sensibles a la degradación por las enzimas presentes en el jugo intestinal de caracol Helix pomatia. Como se discutió en la sección III.2.f. la baja sensibilidad se debe a que, si bien el jugo de caracol contiene una importante actividad de exoglucanasa, carece de una actividad apreciable de endoglucanasa capaz de iniciar la hidrólisis de estructuras cíclicas.

En nuestro laboratorio Tolmasky y col. (sección III.1.) habían encontrado previamente que las células permeabilizadas de R. meliloti sintetizan "in vitro" glucanos β1-2 a partir de UDP-(^{14}C)glucosa, los cuales también poseerían una estructura similar.

El análisis del producto de A. tumefaciens por filtración por geles, cro-

matografía en papel y HPLC mostró la heterogeneidad en cuanto a los pesos moleculares de los glucanos β1-2. Las especies mayoritarias de A. tumefaciens tuvieron grados de polimerización levemente menores que los de R. meliloti.

Dentro de los compuestos formados por las células permeabilizadas de A. tumefaciens a partir de UDP-(^{14}C)glucosa, se encontró un compuesto, que se denominó X, cuyas propiedades se describieron en la sección III.4. pero que no fue identificado. En ensayos preliminares, dicho compuesto no se detectó entre los productos formados por las membranas internas de A. tumefaciens incubados con UDP-(^{14}C)glucosa. Esto parecería indicar que no existe relación entre el compuesto X y la biosíntesis del glucano.

Se ha descripto la síntesis "in vivo" de glucanos β1-2 sustituidos con grupos O-acilo por diferentes cepas de Agrobacterium y Rhizobium (94). Recientemente Miller y col. (156) encontraron glucanos β1-2 cíclicos sustituidos con Sn-1-fosfoglicerol en el espacio periplásmico de A. tumefaciens. Simultáneamente, Batley y col. (22) demostraron por Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C, la presencia en el sobrenadante de un cultivo de Rhizobium NGR234, de glucanos β1-2 cíclicos sustituidos en la posición C6 de algunos de los residuos de glucosa con Sn-1-fosfoglicerol.

No se puede descartar que entre los productos sintetizados por las células permeabilizadas o las membranas internas de A. tumefaciens, estén presentes glucanos cargados sustituidos por grupos acilo u otro sustituyente que les confiera carga. En el caso de las células permeabilizadas estos glucanos constituirían una proporción muy baja de los compuestos purificados por filtración por geles (ver sección III.2.a.), y en el caso de las membranas internas quedarían retenidos en la columna de DEAE-Sephadex utilizada para el

dosaje de la actividad.

La diferencia en los volúmenes de elución observada por filtración por geles entre el glucano celular sintetizado "in vivo" y el sintetizado "in vitro" (sección III.3.) puede deberse a la ausencia en este último de alguno de los sustituyentes cargados mencionados.

2) Las membranas internas de A. tumefaciens fueron muy activas en la síntesis del glucano β1-2, consumiendo la mayor parte del sustrato UDP-(^{14}C)glucosa en tiempos menores de una hora. Para observar dicha actividad, no se necesitó la presencia de factores solubles. Los productos formados por las membranas internas y UDP-(^{14}C)glucosa fueron idénticos a los sintetizados por las células permeabilizadas.

3) La heterogeneidad de tamaños observada en los glucanos solubles de A. tumefaciens y R. meliloti obtenidos "in vitro" no se debe a productos intermediarios en la síntesis. La misma distribución se observó a distintos tiempos de incubación o luego de un "chase" con UDP-glucosa no radioactivo. Por lo tanto, todos ellos son productos finales. La resistencia a la degradación por la glusulasa indica que todos son cíclicos. La ausencia de glucanos precursores solubles de menores grados de polimerización en los sobrenadantes obtenidos después de centrifugar las mezclas de reacción, sugirió que estos se encontrarían en la fracción insoluble.

4) Un 25% de la radioactividad incorporada al glucano β1-2 a los 3 minutos de la reacción, se encontró asociada a la fracción insoluble de membranas internas. La formación del glucano β1-2 y de los compuestos insolubles en TCA (fracción de membranas) fueron paralelas en diferentes condiciones de

incubación, por ejemplo ambas requerieron la presencia de Mg^{++}. La cinética de la reacción en un experimento de pulso y "chase" demostró claramente que se trata de un intermediario (fracción insoluble) y producto (glucano β1-2) de reacción.

Los compuestos radioactivos asociados a la fracción de membranas, son oligosacáridos formados por glucosas unidas en β1-2 covalentemente unidos a una proteína de membrana. La mayor parte de los compuestos insolubles en TCA se solubilizó luego de un tratamiento con proteasa. Los productos de este tratamiento se identificaron como glicopéptidos y la porción sacarídica de éstos como cadenas de glucosas unidas en β1-2. Como ya se discutió en la sección III.8.c., es probable que la mayor parte de los oligosacáridos unidos a la proteína de membrana posean tamaños similares a los glucanos β1-2 cíclicos (productos finales). En tal caso existiría una mayor acumulación de precursores lineales con grados de polimerización de 14 a 25 unidos a dicha proteína, los cuales luego de una reacción de ciclación (terminación) se liberarían a la fracción soluble. La linealidad de los precursores unidos a la proteína es muy factible debido a la alta sensibilidad de los glicopéptidos a la glusulasa (sección III.8.c.).

La presencia de compuestos radioactivos de alto peso molecular (proteína glucosilada) en la fracción insoluble se demostró por cromatografía de filtración por geles (sección III.8.e.).

Por electroforesis en gradiente de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, de las membranas internas incubadas con UDP-(^{14}C)glucosa y fluorografía del gel, fue posible visualizar una proteína radioactiva cuyo peso molecular aparente fue de 235 kDaltons. Esta proteína glicosilada se comportó como intermediaria, ya que luego de una dilución de la marca

("chase") con UDP-glucosa la radioactividad asociada a ella desapareció rapidamente. Esto se debe, como ya se explicó en la sección III.7. a que los productos finales (glucanos β1-2 cíclicos) se encuentran en la fracción soluble.

5) El efecto del agregado de EDTA a diferentes tiempos de la reacción sobre la acumulación de compuestos radioactivos insolubles en TCA (oligosacárido-proteína intermediaria) (sección III.11.), junto con lo sumarizado en el punto anterior indica que la biosíntesis del glucano β1-2 cíclico transcurre a través de por lo menos dos etapas.

$$\text{Etapa 1 - P235} + n\text{UDP-Glc} \xrightleftharpoons{Mg^{++} \text{ ó } Mn^{++}} \text{P235 - (Glc}\beta\text{1-2)}_n + n\text{UDP (elongación)}$$

$$\text{Etapa 2 - P235-(Glc}\beta\text{1-2)}_n \longrightarrow \text{P235} + \text{(Glc}\beta\text{1-2)}_n \text{ cíclico (terminación, ciclación)}$$

P235: proteína intermediaria de 235 kDalton que se encuentra en la membrana interna de A. tumefaciens.

Solamente la primer etapa requiere la presencia de ión divalente. Esta reacción sería reversible ya que la formación del glucano β1-2 cíclico es inhibida por UDP. Las actividades de elongasa (UDP-glucosa β1-2 glucano transferasa) y ciclasa podrían estar localizadas en la misma proteína intermediaria de 235 kDalton, la cual entonces además de una actividad aceptora de residuos de glucosa, tendría actividad enzimática en sí misma. Los tamaños de los productos finales (glucanos β1-2 cíclicos) serían el resultado de un compromiso entre las velocidades de elongación y ciclación.

6) Las mutantes cromosomales no virulentas A1011, A1020, A1038 y A1045 de A. tumefaciens son defectivas en uno de los primeros pasos del proceso de

infección: la unión a la planta (82,67). Estas mutantes son incapaces de sintetizar "in vitro" el glucano β1-2 cíclico. Previamente se había descripto que estas mutantes no formaban el glucano "in vivo" (180). Las cepas ME2 y ME116 que al igual que las mutantes mencionadas contienen inserciones de transposones en el cromosoma pero que no afectan la virulencia, ni la unión a la planta, sintetizaron "in vitro" el glucano β1-2 cíclico en cantidades muy similares a la cepa parental.

Si bien las membranas internas de las mutantes no virulentas de A. tumefaciens formaron compuestos radioactivos insolubles en TCA, su caracterización parcial llevó a la conclusión que dichos compuestos no están relacionados a la biosíntesis del glucano β1-2. Por otro lado, el análisis de las proteínas presentes en las membranas internas de las mutantes por electroforesis en gradiente de poliacrilamida en presencia de SDS, demostró que la proteína intermediaria de 235 kDalton está ausente. Por fluorografía del gel no se detectó la presencia de la proteína de 235 kDalton ni de ninguna otra proteína radioactiva luego de someter a electroforesis las membranas internas incubadas con UDP-(^{14}C)glucosa. Las cepas virulentas ME2 y ME116, que a diferencia de las mutantes sintetizan el glucano β1-2 "in vivo" (180) e "in vitro" contienen la proteína intermediaria de 235 kDalton en sus membranas internas, y por incubación de éstas con UDP-(^{14}C)glucosa, apareción fundamentalmente una banda radioactiva que coincidió con la proteína de 235 kDalton. La correlación que se encontró entre la capacidad de síntesis del glucano β1-2 cíclico y la presencia de la proteína intermediaria de 235 kDalton en las membranas internas, enfatiza el rol de dicha proteína en la biosíntesis del glucano.

7) Las inserciones del transposón Tn5 en el locus cromosomal chvB de A. tumefaciens produjeron cepas incapaces de sintetizar el glucano β1-2 por carecer de la proteína intermediaria. Los genes localizados en este locus codificarían para funciones regulatorias de la síntesis de dicha proteína o para su gen estructural. Esta última posibilidad parecía poco probable debido a que el tamaño del locus (5 kbases) no tendría el lugar suficiente para codificar una proteína de 235 kDalton. Sin embargo, por experimentos realizados en el laboratorio (los cuales no forman parte de esta tesis), en los que se analizan las proteínas de las membranas internas de cepas de A. tumefaciens que contienen inserciones del transposon Tn3 fuera del locus chvB y cerca del extremo 3', así como de una mutante chvB complementada con un plásmido que contiene el locus, se demostró que el gen estructural de la proteína de 235 kDalton está parcialmente contenido en dicho locus y se extiende fuera de él del lado 3' ("downstream") (261). Las membranas internas de estas cepas contenían proteínas de pesos moleculares menores de 235 kDalton (proteínas "truncadas") que funcionaron como intermediarias en la biosíntesis del glucano. Esto explicaría el fenotipo salvaje de dichas cepas (261).

8) La ausencia de la proteína intermediaria de 235 kDalton (y por lo tanto del glucano β1-2 cíclico) es el primer defecto bioquímico descripto en las mutantes chvB de A. tumefaciens. Este defecto podría ser la causa primaria del fenotipo observado: incapacidad de unión a la planta y consecuentemente avirulencia. El glucano β1-2 cíclico tendría algún rol en el proceso de infección de A. tumefaciens a la planta, más específicamente en la etapa de unión a la misma; como ya fue sugerido recientemente por Puvanesarajah y col. (180). Hace algunos años (1) fue observado un efecto estimulatorio del glu-

cano β 1-2 sobre la formación de hilos de infección y nódulos producidos por Rhizobium trifolii en las raíces de la planta. R. trifolii produce el glucano y pertenece a la misma familia Rhizobiaceae.

La característica pleiotrópica de las mutaciones en la región chvB (82,67) podría estar provocada por una arquitectura defectuosa de la envoltura bacteriana (membrana interna, espacio periplásmico y pared celular), debida a la ausencia del glucano y/o de la proteína intermediaria.

9) Las membranas internas de R. meliloti fueron activas en la síntesis del glucano β 1-2 cíclico, y el análisis por electroforesis en gradiente de poliacrilamida con SDS, de una fracción de membranas incubadas con UDP-(^{14}C)glucosa mostró que la misma proteína de 235 kDalton funciona como aceptora de residuos de ^{14}C-glucosa. Las membranas internas de E. coli, una bacteria que no produce el glucano cíclico pero que sintetiza los MDO (oligosacáridos derivados de membrana) (201), carecieron de la proteína de 235 kDalton. De estos resultados se desprende un nuevo paralelismo entre la capacidad de síntesis del glucano β 1-2 cíclico y la presencia de la proteína de 235 kDalton en las membranas internas.

10) El sistema de síntesis "in vitro" del glucano β 1-2 cíclico de A. tumefaciens fue diferente al descripto para los MDO (oligosacáridos derivados de membrana) de E. coli, los cuales tienen un núcleo central formado por cadenas de glucosas unidas en β 1-2 (201). A diferencia del sistema de E. coli (245), el sistema de A. tumefaciens es muy activo en ausencia de aceptores exógenos tal como soforosa u octil-β-glucósido (los cuales produjeron muy poco efecto sobre la actividad enzimática), y no requiere la presencia de un factor termoestable y soluble aislado de la bacteria. Por otro lado, las membranas

internas de E. coli no contienen la proteína intermediaria de 235 kDalton.

BIBLIOGRAFIA

1. Abe, M., Amemura, A. and Higashi, S. (1982) Plant Soil 64 315

2. Aguilar, O. M., Kàpp, D. and Pühler, A. (1985) J. Bacteriol. 164 245

3. Aguilar, O. M., Reiländer, H., Arnold, W., and Pühler, A. (1987) J. Bacteriol. 169 5393

4. Akiyoshi, D. E., Klee, H. J., Amasino, R. M., Nester, E. W. and Gordon, M. R. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 5994

5. Alperin, D. M., Idoyaga-Vargas, V. P. and Carminatti, H. (1982) J. Chromatogr. 242 299

6. Alt-Moerbe, J., Rak, B. and Schröder, J. (1986) EMBO J. 5 1129

7. Aman, P., Franzén, L. E., Darvill, J. E., Mc Neil, M., Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1982) Carbohydr. Res. 103 77

8. Aman, P., McNeil, M., Franzen, L. E., Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1981) Carbohydr. Res. 95 263

9. Amemura, A. (1984) Agric. Biol. Chem. 48 1809

10. Amemura, A. (1985) Mem. Inst. Sci. Ind. Res. 42 69

11. Amemura, A. and Cabrera-Crespo, J. (1986) J. Gen. Microbiol. 132 2443

12. Amemura, A., Hashimoto, T., Koizumi, K. and Utamura, T. (1985) J. Gen. Microbiol. 131 301

13. Amemura, A., Hisamatsu, M. and Harada, T. (1977) Appl. Environ. Microbiol. 34 617

14. Amemura, A., Hisamatsu, M., Mitani, H. and Harada, T. (1983) Carbohydr. Res. 114 277

15. Armstrong, D. W.,Ward, T. J., Armstrong, R. D. and Beesley, T. E. (1986) Science 232 1132

16. Banerjee, D., Basu, M., Chatterjee, G. C. (1983) Indian J. Biochem. Biophys. 20 154

17. Banerjee, D., Basu, M., Choudhury, J. and Chatterjee, G. C. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 100 1384

18. Banerjee, D., Basu, M., Tiwari, R. K. and Chatterjee, G. C.(1983) Folia Microbiol. 28 87

19. Banfalvi, Z., Sakanyan, V., Koncz, C., Kiss, A., Dusha, I. and Kondorosi, A. (1981) Mol. Gen. Genet. 184 318

20. Barengo, R. and Krisman, C. R. (1978) Biochim. Biophys. Acta 540 190

21. Barengo, R., Flawiá, M. and Krisman, C. R. (1975) FEBS Lett. 53 274

22. Batley, M., Redmon, J. W., Djordjevic, J. P. and Rolfe, B. G. (1987) Biochim. Biophys. Acta. 901 119

23. Bauer, W. D. (1981) Ann. Rev. Plant Physiol. 32 407

24. Bauer, W. D. (1982) Plant. Physiol. (69) (Suppl) Abst. 793

25. Beltra, R., Serrada, J., Sanchez-Serrano, J. J., Del Solar, G. and Alonso, E. (1985) An. Inst. Nac. Invest. Agrar. Ser. Agric. 28 273

26. Bender, H. (1980) Carbohydr. Res. 78 147

27. Bender, H. (1982) Carbohydr. Res. 101 279

28. Bender, H. (1983) Carbohydr. Res. 117 1

29. Bender, H. (1985) Carbohydr. Res. 135 291

30. Better, M., Lewis, B., Corbin, D., Ditta, G. and Helinski, D. R. (1984) Cell 35 479

31. Bhuvaneswari, T. V., Pueppke, S. G. and Bauer, W. D. (1977) Plant Physiol. 60 486

32. Blumenfeld, M. L. (1986) Tesis Doctoral: "Sintesis de glucanos α1,4 unidos a proteína en músculo cardíaco de rata".Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

33. Bonner, W. and Laskey, R. A. (1974) Eur. J. Biochem. 46 83

34. Braun, A. C. (1953) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44 344

35. Brewin, N. J., Beringer, J. E., Buchanan-Wollaston, A. V., Johnston, A. W. B. and Hirsch, P. R. (1980) J. Gen. Microbiol. 116 261

36. Buchmann, I., Marner, F. J., Schröder, G., Waffenschmidt, S. and Schröder, J. (1985) EMBO J. 4 853

37. Buikema, W. B., Long, S. R., Brown, S. E., van den Bos, R. C., Earl, C. D. and Ausubel, F. M. (1983) J. Mol. Appl. Genet. 2 249

38. Buikema, W. J., Klingensmith, J. A., Gibbons, S. L and Ausubel, F. M. (1987) J. Bacteriol. 169 1120

39. Carlson, R. W. (1984) J. Bacteriol. 158 1012

40. Carlson, R. W., Sanders, R. E., Napoli, C., Albersheim, P. (1978) Plant Physiol. 62 912

41. Casse, F., Boucher, C., Julliot, J. J., Michel, M. and Denarie, J. (1979) J. Gen. Microbiol. 113 229

42. Chanekar, A., Perombelon, M. C. M. (1980) Phytopathologische Zeitschrift 98 137

43. Chapman, A., Trowbridge, I. S., Hyman, R. and Kornfeld, S. (1979) Cell 17 509

44. Chen, A. P., Phillips, D. A. (1976) Phisiol. Plant. 38 83

45. Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Milton, P. G. and Nester, E. W. (1977) Cell 11 263

46. Close, T. J., Tait, R. C. and Kado, C. I. (1985) J. Bacteriol. 164 774

47. Coira, J. A., Cavaignac, S. and Ugalde, R. A. (1987) J. Biol. Chem. 262 10601

48. Cori, G. T. and Cori, C. F. (1943) J. Biochem. 151 57

49. Couso, R. O., Ielpi, L., García, R. C. and Dankert, M. A. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 204 434

50. Craig, A. S. and Williamson, K. I. (1972) Arch. Microbiol. 87 165

51. Dazzo, F. B. (1980) En: Advances in Legume Science, R. J., Lumerfield and A. H. Bunting, editors pp49-59 Crown Publishers, Southhampton

52. Dazzo, F. B. and Brill, W. J. (1977) Appl. Microbiol. 33 132

53. Dazzo, F. B. and Brill, W. J. (1978) Plant Physiol. 62 18

54. Dazzo, F. B. and Hrabak, E. M. (1982) Plant Soil 69 259

55. Dazzo, F. B. and Truchet, G. L. (1983) J. Membrane Biol. 73 1

56. Dazzo, F. B., Hrabak, E. M. (1981) J. Supramol. Struct. Cell. Biochem. 16 133

57. Dazzo, F. B., Hubbel, D. H. (1975) Appl. Microbiol. 30 1017

58. Dazzo, F. B., Truchet, G. L., Sherwood, J. E., Hrabak, E. M. and Gardiol, A. E. (1982) Appl. Environ. Microbiol. 44 478

59. De Stevens, G. (1955) en Methods in Enzymology (Colowick, S. P., and Kaplan, N. O., eds.), Vol. 1 pp. 173-177, Academic Press, New York.

60. Deasey, M. C. and Matthysse, A. G. (1984) Phytopathol. 74 991

61. Dedonder, R. A. and Hassid, W. Z. (1961) Biochim. Biophys Acta 90 239

62. Deinema, M. and Zevenhuizen, L. P. T. M. (1971) Arch. Microbiol. 78 42

63. Dekker, R. F. H., Rietschel, E. T. and Sandermann, H. (1977) Arch. Microbiol. 115 353

64. Dell, A., York, W. S., Mc Neil, M., Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1983) Carbohydr. Res. 117 185

65. Dixon, R. A. (1984) J. Gen. Microbiol. 130 2745

66. Douglas, C. J., Halperin, W. and Nester, E. W (1982) J. Bacteriol. 152 1265

67. Douglas, C. J., Staneloni, R. J., Rubin, R. A. and Nester, E. W. (1985) J. Bacteriol. 161 850

68. Douglas, C., Halperin, W., Gordon, M. and Nester, E. (1985) J. Bacteriol. 161 764

69. Downie, J. A. and Johnston, A. W. B. (1986) Cell 47 153

70. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Anal. Chem. 28 350

71. Dudman, W. F. (1976) Carbohydr. Res. 46 97

72. Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinski, D. R. and Ditta, G. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83 4403

73. Earl, C. D., Ronson, C. W. and Ausubel, F. M. (1987) J. Bacteriol. 169 1127

74. Egelhoff, T. T. and Long, S. R. (1985) J. Bacteriol. 164 591

75. El-Sayed, M. M., Olama, Z. A. and Allam, M. E. (1983) Carbohydr. Res. 118 195

76. Ervin, S. E., Hubbell, D. H. (1985) Appl. Environ. Microbiol. 49 61

77. Finan, T. M., Hirsch, A. M., Leigh, J. A., Johansen, E., Kuldau, G. A., Deegan, S., Walker, G. C. and Signer, E. R. (1985) Cell 40 869

78. Footrakul, P., Suyanandana, P., Amemura, A. and Harada, T. (1981) J. Ferm. Technol. 59 9

79. Foster, A. B. (1957) Advan. Carbohydr. Chem. 12 81

80. García, R. C., Recondo, E. and Dankert, M. (1974) Eur. J. Biochem. 43 93

81. García-Patrone, M. (1985) Mol. Cell. Biochem. 68 131

82. Garfinkel, D. J. and Nester, E. W. (1980) J. Bacteriol. 144 732

83. Ghai, S. K., Hisamatsu, M., Amemura, A. and Harada, T. (1981) J. Gen. Microbiol. 122 33

84. Glogowski, W. and Galsky, A. G. (1978) Plant Physiol. 61 1031

85. Gorin, P. A. J., Spencer, J. I. T. and Westlake, D. W. S. (1961) Canad. J. Chem. 39 1067

86. Guyon P., Chilton, M. D., Petit, A., Tempe, J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 2693

87. Hakomori, S. (1964) J. Biochem. 55 205

88. Halverson, L. J. and Stacey, G. (1985) Plant. Physiol. 77 621

89. Harada, T. and Amemura, A. (1981) Memb. Inst. Sci. Ind. Res., Osaka Univ. 38 37

90. Harada, T., Amemura, A, Saito, H., Kanamaru, S. and Misaki, A. (1968) J. Ferment. Technol. 46 679

91. Harada, T., Amemura, A., Jansson, P. and Linberg, B. (1979) Carbohydr. Res. 77 285

92. Higashi, Y., Strominger, J. L. and Sweeley, C. C. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57 1878

93. Higashiura, T., Ikeda, M., Okuba, M., Hisamatsu, M., Amemura, A and Harada, T. (1985) Agric. Biol. Chem. 49 1865

94. Hisamatsu, M, Yamada, T, Higashiura, T and Ikeda, M (1987) Carbohydr. Res. 163 115

95. Hisamatsu, M., Amemura, A., Matsuo, T., Matsuda, H. and Harada, T. (1982) J. Gen. Microbiol. 128 1873

96. Hisamatsu, M., Ott. I., Amemura, A., Harada, T., Nakanishi, I and Kimura, K. (1977) J. Gen. Microbiol. 103 375

97. Hisamatsu, M., Sano, K., Amemura, A. and Harada, T. (1978) Carbohydr. Res. 61 89

98. Hisamatsu, M., Yamada, T., Akaki, M., Nashimoki, H., Takai, Y. and Amemura, A. (1985) Agric. Biol. Chem. 49 1447

.99. Hooykaas, P. J. J. (1979) Thesis, University of Leiden, The Netherlands

100. Hooykaas, P. J. J., Klapwijk, P. M., Nuti, M. P., Schilperoort, R. A. and Rörsch, A. (1977) J. Gen. Microbiol. 98 477

101. Hooykaas, P. J. J., Peerbolte, R., Regensburg-Tu nk, P. de V. and Schilperoort, R. A. (1982) Mol. Gen. Genet. 188 12

102. Hooykaas, P. J. J., Van Brussel, A. A. N., Den Dulk-Ras, H., Van Slogteren, G. M. S. and Schilperoort, R. A. (1981) Nature 291 351

103. Hooykaas, P. J., Snijdewint, F. G. M. and Schilperoort, R. A. (1982) Plasmid 8 73

104. Horvath, B., Kondorosi, E., John, M., Schmidt, J., Török, I., Györgypal, Z., Barabas, L., Wieneke, V., Schell, J. and Kondorosi, A. (1986) Cell 46 335

105. Hrabak, E. M., Urbano, M. R. and Dazzo, F. B. (1981) J. Bacteriol. 148 697

106. Hubbell, D. H., Morales, V. M. and Umali Garcia, M. (1978) Appl. Env. Microbiol. 35 210

107. Hughes, T. A. and Elkan, G. H. (1981) Plant Soil 61 87

108. Hughes, T. A., Leece, J. G. and Elkan, G. H. (1979) Appl. Environ. Microbiol. 37 1243

109. Icanes, A., Wise, L. S. and Dimler, R. J. (1951) Anal. Chem. 23 415

110. Ielpi, L., Couso, R. and Dankert, M. (1981) FEBS Lett. 130 253

111. Intire, F. C., Peterson, W. H. and Riker, A. G. (1942) J. Biol. Chem. 143 491

112. Inze, D., Follin,A., Van Lijsebethens, M., Simoens, C., Genetillo, C., Van Montagu, M. and Schell, J. (1984) Mol. Gen. Genet. 194 265

113. Iyer, V. N., Klee, H. J. and Nester, E. W. (1982) Mol. Gen. Genet. 188 418

114. Jacobs, T. W., Egelhoff, T. T. and Long, S. R. (1985) J. Bacteriol. 162 469

115. Jansson, P. E., Kenne, L., Lindberg, B., Ljunggren, H., Lonngren, J., Ruden , U. and Svensson, S. (1977) J. Amer. Chem. Soc. 99 3812

116. Jayaswal, R. K., Veluthambi, K. , Gelvin, S. B. and Slighlom, J. L. (1987) J. Bacteriol. 169 5035

117. Johnston, A. W. B., Beynon, J. L., Buchanan-Wollaston, A. V., Setchell, S. M., Hirsch, P. R. and Beringer, J. E. (1978) Nature 276 635

118. Kato, G., Marnama, Y., Nakamura, M. (1980) Agric. Biol. Chem. 44 2843

119. Kemper, E., Waffenschmidt, S. Weiler, E. W., Rausch, T. and Schröder, J. (1985) Planta 163 257

120. Kennedy, E. P., Rumley, M. K., Schulman, H. and Van Golde, L. M. G. (1976) J. Biol. Chem. 251 4208

121. Kiss, G. B., Dobo, K., Dusha, I., Breznovitz, A. and Kondorosi, A. (1980) J. Bacteriol. 141 121

122. Klapwijk, P. M., Scheulderman, T. and Schiperoort, R. A. (1978) J. Bacteriol. 136 775

123. Koizumi, K., Okada, Y., Horiyama, S., Utamura, T., Hisamatsu, M. and Amemura, A. (1983) J. Chromatogr. 265 89

124. Koizumi, K., Okada, Y., Horiyama, S., Utamura, T., Higashiura, T and Ikeda, M. (1984) J. Inclus. Phenom. 2 891

125. Kondorosi, A., Kondorosi, E., Banfalvi, Z., Dush, J., Putnoky, P. and Bachem, C. W. B. (1984) En: Proc. of the 15 Int. Congress of Genetics, New Deli p205-216

126. Koukolikova-Nicola, Z., Shellito, R. D. ,Hohn, B., Wang. K., Van Montagu, M., and Zambryski, P. (1985) Nature 313 191

127. Krisman, C. R. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46 1206

128. Krisman, C. R. (1973) Ann. N. Y. Acad. Sci. 210 81

129. Krisman, C. R. and Barengo, R. (1975) Analytical Biochemistry 66 584

130. Lavintman, N., Tandecarz, J., Carceller, M., Mendiara, S. and Cardini, C. E. (1974) Eur. J. Biochem. 50 145

131. Lee, Y. C. and Scocca, J. R. (1972) J. Biol. Chem. 247 5753

132. Leigh, J. A., Signer, E. R. and Walker, G. C. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82 6231

133. Leloir, L. F. and Behrens, N. H. (1971) Rev. Soc. Arg. Biol. 43 108

134. Leloir, L. F. and Cardini, C. E. (1957) J. Am. Chem. Soc. 79 6340

135. Lemmers, M., Debenckeleer, M., Holsters, M., Zambryski, P., Depicker, A., Hernalsteens, J.P., Van Montagu, M. and Schell, J. (1980) J. Mol. Biol. 144 353

136. Leps, W. T., Brill, W. J. and Bingham, E. T. (1980) Crop. Sci. 20 427

137. Lippincott , J. A. and Lippincott, B. B. (1977) en Cell Wall Biochemistry related to specifitiy in Host-Plant Pathogen Interaccions (Solhein, B. and Raa, J. eds) Universitetsforlarget, Oslo,439-451

138. Lippincott, B. B. and Lippincott, J. A. (1969) J. Bacteriol. 97 620

139. Lippincott, B. B. and Lippincott, J. A. (1978) Science 199 1075

140. Ljunggren, H. and Fahraens, G. (1961) J. Gen. Microbiol. 26 521

141. Lowry, O. H., Rosebrough, N. H., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193 265

142. Macda, I., Saito, H., Masada, M., Misaki, A. and Harada, T. (1967) Agric. Biol. Chem. 31 1184

143. Maier, R. J. and Brill, W. J. (1976) J. Bacteriol. 127 763

144. Maier, R. J., Bishop, P. E. and Brill, W. J. (1978) J. Bacteriol. 134 1199

145. Maier, R. J., Brill, W. J. (1978) J. Bacteriol. 133 1295

146. Martinez Molina, E., Morales, V. M. and Hubbell, D. H. (1979) Appl. Environ. Microbiol. 38 1186

147. Marton, J., Wullems, G. J., Molendijk, L. and Schilperoort, R. A. (1979) Nature 277 129

148. Matthysse, A. G. (1983) J. Bacteriol. 154 906

149. Matthysse, A. G. (1987) Appl. Environ. Microbiol.53 2574

150. Matthysse, A. G. (1987) J. Bacteriol. 169 313

151. Matthysse, A. G., Holmes, K. V. and Gurlitz, R. H. G. (1981) J. Bacteriol. 145 583

152. Matthysse, A. G., Wyman, P. M. and Holmes, K. V. (1978) Infect Inmun. 22 516

153. Mc Neil, M., Darvill, J., Darvill, A. G., Albersheim, P., van Veen, R., Hooykaas, P., Schilperoort, R. and Dell, A. (1986) Carbohydr. Res. 146 307

154. Mester, L., Schimpl, A. and Senn, M. (1967) Tetrahedron Lett. 18 1697

155. Miller, K. J., Kennedy, E. P., Reinhold, V. N. (1986) Science 231 48

156. Miller, K. J., Reinhold, V. N., Weissborn, A. C. and Kennedy, E. P. (1987) Biochim. Biophys. Acta 901 112

157. Montreuil, J., Monsigny, M. and Buchet, M. T. (1967) Compt. Rend., Ser. D. 264 2068

158. Mort, A. J. and Bauer, W. D. (1980) Plant Physiol. 66 158

159. Mutharia, L. M., Crockford, G., Bogard, W. C., Hancock, R. E. W. (1984) Infect. Inmun. 45 631

160. Nakanishi, K., Kimura, K., Kusui, S. and Yamazaki, E. (1974) Carbohydr. Res. 32 47

161. Napoli, C. A., Dazzo, F. B., Hubbell, D. H. (1975) Appl. Microbiol. 30 123

162. Neuberger, A., Gottschalk, A., Marshall, R. D. and Spiro, R. G. (1972) En: Glycoproteins: Their composition, structure and function (Gottschalk, A., Ed.) 2° Edicion, pag 450-490 Elsevier Amsterdam

163. New, P.B., Scott, J. J., Ireland,C. R., Farrand, S. K., Lippincott, B. B. and Lippincott, J. A. (1983) J. Gen. Microbiol. 129 3657

164. Noel, K. D., Vandenbosch, K. A., Kulpaca, B. (1986) J. Bacteriol. 168 1392

165. Nuti, M. P., Ledeboer, A. M., Lepidi, A. A. and Schilperoort, R. A. (1977) J. Gen. Microbiol 100 241

166. Nuti, M. P., Lepidi, A. A., Prakash, R. K., Schilperoort, R. A. and Cannon, F. C. (1979) Nature 282 533

167. Nutman, P. S. (1951) Proc. R. Soc. London Ser. B 139 176

168. Nutman, P. S. (1962) Proc. R. Soc. London Ser. B 156 122

169. Oaklem, B. R., Kirsch, D. R., Morris, N. R. (1980) Anal. Biochem. 105 361

170. Ohyama, K., Pelcker, L. E. and Schaefer, A. (1979) Plant Physiol. 63 382

171. Osborn, M. J. and Munson, R. (1984) Methods Enzymol. 31A: 642-653

172. Osborn, M. J., Rosen, S. M., Rothfield, L., Zeleznik, L. D. and Horecker, B. L. (1964) Science 145 783

173. Palomares, A., Montega, E. and Olivares, J. (1978) Microbios 21 33

174. Petit, A, David, C., Dahl,G. A., Ellis, J. G., Guyon, P., Casse-Delbart, F. and Tempé, J. (1983) Mol. Gen. Genet. 190 204

175. Planqué, K., van Nierop, J. J., Burgers, A., Wilkinson, S. G. (1979) J. Gen. Microbiol. 110 151

176. Pueppke, S. G. and Hymowitz, T (1982) Crop. Sci. 22 558

177. Pueppke, S. G. and Benny, U. K. (1981) Physiol. Plant. Pathol. 18 169

178. Pueppke, S. G., Kluepfel, D. A. and Anand, V. K. (1982) Physiol. Plant. Pathol. 21 35

179. Puhler, A., Aguilar, M. O., Hynes, P., Klipp, W., Priefer, U., Simon, R. and Weber, G. (1984) Advances in the genetics of free-living and symbiotic nitrogen fixation bacteria, p609-619 In C. Veeger and W. E. Newton (ed). Advances in nitrogen fixation research Nijhoff-Junk/Pudoc, The Hague

180. Puvanesarajah, V., Schell, F. M., Stacey, G., Douglas, C. J. and Nester, E. W. (1985) J. Bacteriol. 164 102

181. Rao, S. S., Lippincott, B. B.. Lippincott, J. A. (1982) Physiol. Plant 56 374

182. Ream, L. W. and Gordon, M. P. (1982) Science 218 854

183. Reese, E. T., Parrish, F. W. and Mandels, M. (1961) Can. J. Microbiol. 7 309

184. Robbins, P. W., Bray, D., Dankert, M. and Wright, A. (1967) Science 158 1536

185. Roberts, G. P. and Brill, W. J. (1980) J. Bacteriol. 144 210

186. Roberts, G. P., MacNeil, T., MacNeil, D. and Brill, W. J. (1978) J. Bacteriol. 136 267

187. Robertsen, B., Aman, P., Darvill, A. G., Mc Neil, M. and Albersheim, P. (1981) Plant Phisiol. 67 389

188. Robyt, J. F. (1975) Carbohydr. Res. 40 373

189. Robyt, J. F. and Taniguchi, H. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 174 129

190. Robyt, J. F. and Walseth, T. F. (1978) Carbohydr. Res. 61 433

191. Robyt, J. F., Kimble, B. K. and Walseth, T. F. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 165 634

192. Rosenberg, C., Boistard, P., Dénairé, J. and Casse-Delbart, F. (1981) Mol. Gen. Genet. 184 326

193. Russa, R. and Lorkiewicz, Z. (1974) J. Bacteriol. 119 771

194. Russa, R., Lüderitz, O. and Rietschel, E. T. (1985) Arch. Microbiol. 141 284

195. Russa, R., Urbanik, T., Kowalczuc, E. and Lorkiewicz, Z. (1982) FEMS Microbiol. Lett. 13 161

196. Ruvkun, G. B. and Ausubel, F. M. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 191

197. Ruvkun, G. B., Sundaresan, V. and Ausubel, F. M. (1982) Cell 29 551

198. Saenger, W. (1980) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 19 344

199. Schmidt, J., John, M., Wieneke, U, Krüssmann, H. D. and Schell, J. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 9581

200. Schnaitman, C. A. (1981) Manual of Methods for General Bacteriology Ed. P. Gerhardt, Amer. Soc. Microbiol. pp 52-61

201. Schneider, J. E., Reinhold, V., Rumley, M. K. and Kennedy, E. P. (1979) J. Biol. Chem. 254 10135

202. Schröder, G., Waffenschmidt, S., Weiler, E. W., and Schröder, J. (1983) Eur. J. Biochem. 138 387

203. Schwimmer, S., Bevenue, A., Weston, W. J. (1956) Arch. Biochem. Biophys. 60 279

204. Sequeira, L. (1978) Annu. Rev. Phytophatol. 16 453

205. Sharon., N. (1975) En: Complex Carbohydrates: Their chemistry, biosynthesis and functions. Addrison.-Wesley p466

206. Shearman, C. A., Rossen, L, Johnston, A. W. B. and Downie, J. A. (1986) EMBO J. 5 647

207. Smit, G., Kijne, J. W. and Lugtenberg, B. J. J. (1987) J. Bacteriol. 169 4294

208. Spiro, R. G. (1967) J. Biol. Chem. 242 4813

209. Stachel, S. E. and Nester, E. W. (1986) EMBO J. 5 1445

210. Stachel, S. E. and Zambryski, P. C. (1986) Cell 47 155

211. Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M. and Zambryski, P. C. (1985) Nature 318 624

212. Stachel, S. E., Nester, E. W. and Zambryski, P. C. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83 379

213. Stachel, S. E., Timmerman, B. and Zambryski, P. C. (1986) Nature 322 706

214. Staneloni, R. J., Tolmasky, M. E. and Leloir, L. F. (1984) J. Gen. Microbiol. 130 869

215. Staneloni, R. J., Ugalde, R. A. and Leloir, L. F. (1980) Eur. J. Biochem 105 275

216. Streeter. J. G. (1985) J. Bacteriol. 164 78

217. Studier, F. W. (1973) J. Mol. Biol. 79 237

218. Sundaresan, V., Jones, J. D. G., Ow, D. W. and Ausubel, F. M. (1983) Nature 301 728

219. Sykes, L. C. and Matthysse, A. G. (1986) Appl. Environ. Microbiol. 52 597 ..

220. Szeto, W. W., Zimmernan, J. L., Sundaresan, V. and Ausubel F. M. (1984) Cell 36 1035

221. Tandecarz, J. and Cardini, C. E. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 86 620

222. Tandecarz, J., Lavintman, N. and Cardini, C. E. (1975) Biochem. Biophys. Acta 399 345

223. Tarlov, A. R. and Kennedy, E. P. (1965) J. Biol. Chem. 240 49

224. Tempe, J. and Goldman, A. J. (1982) Opine utilization of Agrobacterium, Molecular Biology of Plant Tumors. New York: Academic pp427-49

225. Thomashow, M. F., Karlinsey, J. E., Marks, J. R. and Hurlbelt, R. E. (1987) J. Bacteriol. 169 3209

226. Thomashow, M. F., Nutter, R., Montoya, A. L., Gordon, M. P., and Nester, E. W. (1980) Cell 19 729

227. Tolmasky, M. E. (1982) Tesis Doctoral: "Prenol-fosfo-azúcares en Rhizobium meliloti" Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

228. Tolmasky, M. E., Staneloni, R. J. and Leloir, L. F. (1982) J. Biol. Chem. 257 6751

229. Tolmasky, M. E., Staneloni, R. J., Ugalde, R. A. and Leloir, L. F. (1980) Arch. Biochem. Biophys 203 358

230. Trevelyan, W. F., Procter, D. P. and Harrison, J. S. (1950) Nature 166 444

231. Truchet, G. L. and Dazzo, F. B. (1982) Planta 154 352

232. Tsien, H. C. and Schmidt, E. L. (1981) J. Bacteriol. 145 1063

233. Tung, K. K. and Nordin, J. H. (1968) Biochim. Biophys. Acta 158 154

234. Török, I., Kondorosi, E., Stepkowoski, T., Pósfai, J. and Kondorosi, A. (1984) Nucleic Acids Res. 12 9509

235. Ugalde, R. A., Coira, J. A. and Brill, W. J. (1986) J. Bacteriol. 168 270

236. Ugalde, R. A., Handelsman, J. and Brill, W. J. (1986) J. Bacteriol. 166 148

237. Ugalde, R. A., Staneloni, R. J. and Leloir, L. F. (1980) Eur. J. Biochem. 113 97

238. Van Golde, L. M. G., Schulman, H. and Kennedy, E. P. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 1368

239. Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van der Elsacher, S., Zaenen, J., Schilperoort, R. A. and Schell, J. (1974) Nature 252 169

240. Vance, C. P. (1983) Ann. Rev. Microbiol. 37 399

241. Verhue, W. and Hers, H. G. (1966) Biochem. J. 99 222

242. Ward, J. B (1981) Microbiol. Rev. 45 211

243. Watanabe, T., Kamo, Y., Matsuda, K. and Dudman, W. F. (1982) Carbohydr. Res. 110 170

244. Watson, B., Currier, T. C., Gordon, M. P., Chilton, M. P. and Nester, E. W. (1975) J. Bacteriol. 123 255

245. Weissborn, A. C. and Kennedy, E. P. (1984) J. Biol. Chem. 259 12644

246. Whatley, M. H., Bodwin, J. S., Lippincott, B. B. and Lippincott, J. A. (1976) Infect. Inmun. 13 1080

247. Whatley, M. H., Margot, J. B., Schell, J.,Lippincott, B. B. and Lippincott, J. A. (1978) J. Gen. Microbiol. 107 395

248. Wieland, F., Heitzer, R. and Schaefer, W. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 5470

249. Wright, A., Dankert, M., Fennessey, P. and Robbins, P. W. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57 1798

250. Yadv, N. S., Postle, K., Saiki, R. K., Thomashow, M. and Chilton, M. D. (1980) Nature 287 458

251. Yao, P. Y. and Vincent, J. M. (1976) Plant Soil 45 1

252. York, W. S., Mc Neil, M., Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1980) J. Bacteriol. 142 243

253. Zambryski, P., Holsters, M., Kruger, K., Depicher, A.,Schell, J., Van Montagu, M. V. amd Goodman, H. M. (1980) Science 209 1385

254. Zevenhuizen, L. P. T. M. (1971) J. Gen. Microbiol. 68 239

255. Zevenhuizen, L. P. T. M. (1973) Carbohydr. Res. 26 409

256. Zevenhuizen, L. P. T. M. (1981) Antonie van Leeuwenhoek 47 481

257. Zevenhuizen, L. P. T. M. and Ebbink, A. G. (1974) Antonie van Leeuwenhoek 40 103

258. Zevenhuizen, L. P. T. M. and Scholten Koerselman, H. J. (1979) Antonie van Leeuwenhoek 165 165

259. Zevenhuizen, L. P. T. M. and van Neerven, A. R. W. (1983) Carbohydr. Res. 118 127

260. Zevenhuizen, L. P. T. M., Scholten-Koerselman, J. and Posthumus, M. A. (1980) Arch. Microbiol. 125 1

261. Zorreguieta, A. Geremía, R. A., Cavaignac, S., Cangelosi, G. A., Nester, E. W. and Ugalde, R. A. (1988) Molecular Plant-Microbe Interactions , en prensa