

Tesis de Posgrado

Prenil-Fosfo-Azúcares en rhizobium trifolii : su participación en la síntesis de exopolisacáridos

Bossio, Juan Carlos

1989

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:

Bossio, Juan Carlos. (1989). Prenil-Fosfo-Azúcares en rhizobium trifolii : su participación en la síntesis de exopolisacáridos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2242_Bossio.pdf

Cita tipo Chicago:

Bossio, Juan Carlos. "Prenil-Fosfo-Azúcares en rhizobium trifolii : su participación en la síntesis de exopolisacáridos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2242_Bossio.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

PRENIL-FOSFO-AZUCARES EN RHIZOBIUM TRIFOLII
SU PARTICIPACION EN LA SINTESIS DE EXOPOLISACARIDOS

Autor: Juan Carlos Bossio

Director: Marcelo Alberto Dankert

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones

Bioquimicas "Fundación Campomar", Buenos Aires,
ARGENTINA

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

AÑO 1989

- 2242 -
Ej: 2

A la memoria de mi abuelo Bossio (A), que me contaba historias de italianos: antes, durante y después de tomar vino (B).

A todos los Gorbarán, excelentes panaderos, quienes comenzando por mi madre (C) me enseñaron, y con ellos aprendí, la noción y el concepto del trabajo. A todos ellos.

A la memoria del Dire (D), que jugaba como un chico.

KEY WORDS: WATER / FLOUR / YEAST / BREAD / MYSTERY

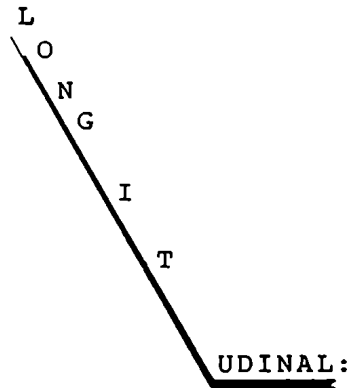
(Ça c'est la caisse, le mouton que tu veux est dedans)

.....de la ESTRUCTURA,

TRANSVERSAL:

"Si desconocéis una función,
estudiad una estructura"

Francis Crick



"O sea que además de las leyes causales que llevan al sistema a adoptar una estructura dada, hay un evento histórico (una perturbación) que determina la evolución del sistema. No se trata de que un sistema alejado del equilibrio pueda ser organizado por el suceso H, sino que este le dará cierto tipo de estructura, el suceso N le hubiera dado otra, y el M otra. El sistema tiene una serie de posibilidades."

Ilya Prigogine

ONTOGENIA

(pequeño teorema plural)

HIPOTESIS: El Deseo (E).

TESIS: La Razón (F).

Sea,

"Ça c'est la caisse, le mouton que tu veux est dedans."

Antoine de Saint-Exupéry (G)

o bien,

$E \implies R_1 \text{ ó } E \longrightarrow (AT) \longrightarrow R_2$

D. Berlyne y J. Piaget (H)

o mejor aún,

"Pedes in terra ad sidera visu."

Juan B. Terán (I)

por lo tanto,

"Como un infinito ejercicio de paciencia infinita (J):
levanta contra el viento la cabeza oscura (K)."

(que-es-lo-que-queríamos-demostrar)

Juan C. Bossio (J)

Miguel Gaya (K)

- v -

REFERENCIAS

- A) don Luis José Bossio (1899-1979).
- B) "Canciller Borgoña" (ex-Bodegas Giol). Departamento de Maipú, Provincia de Mendoza, Argentina.
- C) Amalia Virginia Gorbarán.
- D) Dr. Luis Federico Leloir (1906-1987).
- E) Autores varios.
- F) Autores varios. Véase por ejemplo Descartes, René, en: "Discours de la méthode pour bien conduire sa raison et chercher la vérité dans les sciences". (París, 1637)
- G) Antoine de Saint-Exupéry en "Le Petit Prince", edición bilingüe (francés-español). Alianza-Emecé, pág. 18 (Madrid, 1980).
- H) Berlyne, D. y Piaget, J., en "Etudes d'Epistemologie Génétique XII. Théorie du comportement et opérations". (Paris, P.U.F., 1960). E: Estímulo; R₁: Respuesta 1; R₂: Respuesta 2; (AT): Asimilación del Estímulo E a la Estructura T.
- I) Juan B. Terán: Lema de la Universidad Nacional de Tucumán, Provincia de Tucumán, Argentina.
- J) Juan C. Bossio: esta tesis.
- K) Miguel Gaya: Poemas III. Ediciones del Plata (Buenos Aires, 1984).

AGRADECIMIENTOS I: PERSPECTIVA

- Al Dr. Héctor F. Terenzi, con quien me inicié en la investigación científica.
- A los Miembros de la Comisión Directiva del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" en el momento de mi ingreso, por permitirme realizar este trabajo en el Instituto: Dr. L.F. Leloir, Dr. C.E. Cardini, Dr. I.D. Algranati, Dr. H. Carminatti, Dr. M.A. Dankert, Dr. H.N. Torres y Dr. J.M. Olavarría.
- Al Dr. M.A. Dankert, director de esta tesis, por su constante guía y sentido crítico brindados durante este trabajo. Lo que aprendí en su laboratorio en todos estos años excede largamente lo impreso en estas páginas.
- Al CONICET, por las becas obtenidas y a la memoria de su fundador, Dr. Bernardo Houssay. Sin el apoyo económico que significan dichas becas, la mayor parte de las personas de mi generación no hubiésemos tenido posibilidad real de comenzar y terminar un trabajo de tesis.
- A quienes fueron mis compañeros de laboratorio, por su amistad y enseñanzas: Lic. M. Bosch, Lic. J. Bustamante, Dr. R. Couso, Bioq. E. Guillén, Dra. N. Iñón, y Dr. L. Ielpi.
- A las Lic. S. Raffo, Lic. M. Bravo y Lic. A. Raimondi por su permanente disposición a brindarme todo tipo de ayuda y asistencia técnica.
- A mis amigos Dr. G. Alcain, Dr. A. Cataldi, Tony Coira, Dra. D. Catz, Dr. M. García Patrone, Dr. R. Geremía, Dr. N. Iusem, Lic. M. Nembrot, Dra. S. Moreno, Ing. J.A. Porcel, Lic. C. Semino, Dra. M. Stein y otros.
- A Mary Boxer y Manon Angel, por su amistad y permanente ayuda. También a Beile Wolf, Tilda Saba, Irene Cangiano y Fernando Massironi.
- A Sole Giménez, L. Choque, S. Genovese, F. Irusta, M. Mazzardi, A. Micali, A. Pelman, e Ing. J. Pinto, por la muy eficiente colaboración recibida.

- A la gente de Biblioteca, por toda la colaboración recibida: M. Guerin, G. Moure y F. Varde.
- A Dolores Turró y Norberto Malarini, por su colaboración y paciencia durante la impresión de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS II: PROSPECTIVA

Aquí deseo expresar mi agradecimiento a cada una de las personas cuya directa intervención contribuyó a determinar los próximos pasos de mi carrera científica:

Dr. I.D. Algranati
Dr. F. Baralle
Dr. J. La Torre
Dr. J. Mordoh
Dr. N. Palleroni
Dr. A.J. Parodi
Dr. H. Terenzi
Dr. R. Wolosiuk
Dr. M. Zakin
Dr. J. Zorzopoulos

PARTE DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS EN ESTA TESIS HAN SIDO PUBLICADOS EN:

"In vitro synthesis of a lipid-linked acetylated and pyruvylated oligosaccharide in Rhizobium trifolii", Bossio J.C., Iñón de Iannino N. and Dankert M.A. (1986) Biochemical and Biophysical Research Communications 134: 205-211

ABREVIATURAS

Acetil-CoA	acetil-coenzima A
AMP	5'adenosina monofosfato
BD	azul dextrano
Comp.	compuesto
CPS	polisacárido capsular
cpm	cuentas por minuto
D.O.	densidad óptica
DEAE-celulosa	dietil-amino-etil-celulosa
EDTA	ácido etilen-diamin-tetra-acético
EPS	exopolisacárido acídico
Fr	frente
Gal	galactosa
Glc	glucosa
GlcA	ácido glucurónico
Gala	ácido galacturónico
ManA	ácido manurónico
Glc1	sorbitol
GlcA1	glucuronitol
Glc-1-P	glucosa-uno-fosfato
¹ H-RMN	espectroscopía de resonancia magnética nuclear
LPS	lipopolisacárido
M ₂	maltosa
M ₃	maltotriosa
M ₄	maltotetrosa
M ₅	maltopentosa
min	minuto
mm	milímetros
NAcManUA	ácido N-acetil manurónico
NAcGlc	N-acetil glucosamina
NAcNeu	N-acetil neuramínico
NAcMur	N-acetil murámico
Or	origen
Pi	fosfato inorgánico
PPi	pirofosfato inorgánico
PEP	fosfo-enol-piruvato
raf	rafinosa
RUMP	relación de movilidad del compuesto respecto del UMP
^R GlcA	relación de movilidad del comp. respecto del GlcA
R _f	relación de movilidad del comp. respecto del frente del solvente
Sac	sacarosa
Stac	estaquiosa

Tris	tri(hidroxiaminometil)
	metano
uCi	micro Curíes
ug	microgramos
ul	microlitros
umoles	micromoles
UDP-Glc	5'uridina-difosfato glu-
	cosa
UDP-GlcA	5'uridina-difosfato glu-
	curónico
UDP-Gal	5'uridina-difosfato galac-
	tosa
UMP	5'uridina monofosfato
volts	voltios

I N D I C E

	<u>Pág.</u>
<u>RESUMEN</u>	1
I.0 <u>INTRODUCCION</u>	
I.1 LOS POLISACARIDOS BACTERIANOS	3
I.1.1 Generalidades	3
I.1.2 Productos de alto peso molecular	4
I.1.2.1 Homopolisacáridos	4
I.1.2.2 Heteropolisacáridos	7
I.1.2.2.1 Exopolisacáridos cons- tituídos por unidades repetitivas	9
I.1.2.2.2 Exopolisacáridos no cons- tituídos por unidades repetitivas	11
I.1.3 Productos de bajo peso molecular	12
I.2 LOS RHIZOBIOS Y SU INTERACCION CON PLANTAS LEGUMINOSAS	16
I.2.1 Generalidades	16
I.2.2 Formación del nódulo	18
I.2.3 Los carbohidratos en la interacción Rhizobio-leguminosa	21
I.2.3.1 Carbohidratos y fenómenos de reconocimiento	21
I.2.3.2 Polisacáridos en la simbiosis Rhizobio-leguminosa	23
I.3 ACTIVIDADES BIOLOGICAS ASOCIADAS A LOS POLISACARIDOS DE RHIZOBIOS	24
I.3.1 Estimulación de la infección y nodulación	24
I.3.2 Enrulamiento del pelo radicular	26

I.3.3 Formación del hilo de infección	28
I.3.4 La hipótesis de la lectina	29
I.4 GENES BACTERIANOS INVOLUCRADOS EN LA INTERACCION RHIZOBIO-LEGUMINOSA	32
I.4.1 Generalidades	32
I.4.2 Los genes "nod"	33
I.4.3 Regulación de la expresión de los genes "nod"	37
I.4.3.1 Generalidades	37
I.4.3.2 Inductores e inhibidores	40
I.4.4 Genes involucrados en la síntesis de glucanos beta,1→2 cíclicos	42
I.4.5 Genes involucrados en la síntesis de EPSs	43
I.5 LOS EXOPOLISACARIDOS DE RHIZOBIOS	46
I.6 SINTESIS DE POLISACARIDOS COMPLEJOS	51
I.6.1 El antígeno-0 de Salmonella	51
I.6.2 Lípido-intermediarios en la síntesis del antígeno-0	52
I.6.3 Lípido-intermediarios descriptos en bacterias	56

II.0 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

II.1 EL POLISACARIDO CAPSULAR DE AEROBACTER aerogenes	58
II.2 EL XANTANO	60
II.3 EL ACETANO	65
II.4 EL EPS DE RHIZOBIUM meliloti	69
II.5 OBJETIVOS DE ESTA TESIS	72

III.0 MATERIALES Y METODOS

III.1	CULTIVO DE LAS DISTINTAS CEPAS	
III.1.1	Medio de cultivo	74
III.1.2	Condiciones de crecimiento y obtención de células	75
III.1.3	Preparación de enzimas	76
III.1.4	Díalisis de los preparados enzimáticos	77
III.1.5	Mantenimiento de las cepas	79
III.1.6	Ensayo de nodulación	81
III.2	OBTENCION DE POLISACARIDOS	83
III.3	SISTEMA DE INCUBACION IN VITRO	84
III.3.1	Incubación estándar	84
III.3.2	Investigación de la presencia de polisacárido en los sobrenadantes	85
III.3.2.1	Método A: Análisis por cromatografía en papel	85
III.3.2.2	Método B: Precipitación con polisacárido carrier no radioactivo	85
III.4	TRATAMIENTOS DEGRADATIVOS	87
III.4.1	Hidrólisis ácida suave de lípido-azúcares	87
III.4.2	Hidrólisis ácida parcial o total de oligo o polisacáridos	87
III.4.3	Reducción catalítica con platino	88
III.4.4	Deacilación de oligosacáridos	89
III.4.5	Reducción con borohidruro	89
III.4.6	Reducción del grupo carboxilo en oligosacáridos que contienen ácido glucurónico	90
III.4.7	Permetilación	91
III.4.7.1	Permetilación de mono u oligosacáridos	92
III.4.7.2	Permetilación de polisacáridos	94
III.5	METODOS ANALITICOS	96
III.6	TRATAMIENTOS ENZIMATICOS	97
III.6.1	Tratamiento con fosfatasa alcalina	97
III.6.2	Tratamiento con beta-glucuronidasa	

de intestino de caracol	97
III.6.3 Tratamiento con beta-glucuronidasa comercial	98
III.6.4 Tratamiento con beta-glucosidasa comercial	98
III.6.5 Tratamiento con pirofosfatasa inorgánica	98
III.7 CROMATOGRAFIAS	100
III.7.1 Cromatografía en columnas de DEAE-celulosa	100
III.7.2 Cromatografía en columna de geles	100
III.7.3 Cromatografía y electroforesis en papel	101
III.7.4 Cromatografía en placa delgada (TLC)	103
III.7.5 Cromatografía en columna de borano	105
III.8 OBTENCION DE COMPUESTOS RADIOACTIVOS	106
III.8.1 Preparación de nucleótido-azúcares	106
III.8.2 Otros compuestos radioactivos	106

IV.0 RESULTADOS

IV.A ESTUDIOS IN VIVO	107
IV.A.1 Cultivo de las cepas	108
IV.A.2 Producción de exopolisacárido	109
IV.A.3 Composición de los exopolisacáridos de las cepas utilizadas	111
IV.A.4 Nodulación	113
IV.B ESTUDIOS IN VITRO	114
IV.B.1 ENSAYOS PRELIMINARES DE INCORPORACION DE RADIOACTIVIDAD A DISTINTAS FRACCIONES	115
IV.B.1.1 Transferencia de radioactividad a partir de UDP(¹⁴ C)GlcA	115
IV.B.1.2 Transferencia de radioactividad	

IV.B.1.3	a partir de UDP(¹⁴ C)Glc	119
	Transferencia de radioactividad	
	a partir de beta(³² P)UDP-Glc ó	
	de beta-(³² P)UDP-GlcA	119
IV B.2	PROPIEDADES DE LOS COMPUESTOS EXTRAIBLES CON "Solvente 1203"	123
IV.B.2.1	Labilidad en medio ácido suave	123
IV.B.2.2	Labilidad en medio alcalino suave	126
IV.B.2.3	Fraccionamiento del material soluble en el "Extracto 1203"	131
IV.B.3	ESTUDIOS CON OLIGOSACARIDOS LIBERADOS POR HIDROLISIS ACIDA SUAVE	135
IV.B.3.1	Fraccionamiento por electroforesis	135
IV.B.3.2	Fraccionamiento por filtración en columna de geles	138
IV.B.3.3	Oligosacáridos obtenidos a partir de las fracciones I y II de las columnas de DEAE-celulosa	142
IV.B.4	CARACTERIZACION DEL compuesto <u>d</u>	145
IV.B.4.1	Composición del compuesto <u>d</u>	146
IV.B.4.1.1	Extremo reductor del comp. <u>d</u>	147
IV.B.4.1.2	Presencia de restos GlcA en el compuesto <u>d</u>	152
IV.B.4.1.2.1	Caracterización de GlcA	152
IV.B.4.1.2.2	Reducción del compuesto <u>d</u> (¹⁴ C)GlcA a uno neutro	153
IV.B.4.1.3	Número de restos GlcA en el compuesto <u>d</u> : reducción parcial del comp. <u>d</u> (¹⁴ C)GlcA	159
IV.B.4.1.4	Posición de los enlaces en el trisacárido <u>d</u>	161
IV.B.4.1.4.1	Permetilación del trisa- cárido <u>d</u> con marca en (¹⁴ C)Glc	162
IV.B.4.1.4.2	Permetilación del trisa- cárido <u>d</u> con marca en (¹⁴ C)GlcA	162
IV.B.4.2	Fraccionamiento del comp. <u>d</u> en <u>d</u> ₁ y <u>d</u> ₂	167
IV.B.4.3	Presencia de restos acilo en el comp. <u>d</u> ₂	170
IV.B.4.4	Naturaleza del resto acilo en el comp. <u>d</u> ₂	172
IV.B.4.5	Posición del resto O-acetilo en <u>d</u> ₂	176
IV.B.4.5.1	Degradación enzimática del trisacárido <u>d</u> ₁	177
IV.B.4.5.2	Degradación enzimática del trisacárido <u>d</u> ₂	181
IV.B.4.5.3	Análisis del compuesto <u>e</u>	183

IV.B.5	PRESENCIA DE UNIONES DIFOSFATO	189
IV.B.5.1	Labilidad en medio alcalino suave del material marcado con (^{32}P) proveniente de beta(^{32}P)UDP-Glc	190
IV.B.5.2	Confirmación de la unión difosfato: aislamiento de (^{32}P)Pirofosfato	190
IV.B.6	ESTUDIOS CON LOS oligosacáridos <u>a</u> , <u>b</u> y <u>c</u>	195
IV.B.6.1	Interrelación entre los oligosacáridos <u>a</u> , <u>b</u> y <u>c</u>	195
IV.B.6.2	Hidrogenación catalítica (H_2 -Pt) de los compuestos radioactivos solubles en "Extracto 1203": aislamiento de oligosacáridos piruvilados sintetizados in vitro	199
IV.B.6.3	Marcación con (^{14}C)Piruvato: confirmación de la presencia de restos cetol-pirúvicos en los oligosacáridos <u>b</u> y <u>c</u>	203
IV.B.6.3.1	Incorporación de radioactividad proveniente de (^{14}C)PEP a "Extracto 1203"	203
IV.B.6.3.2	Confirmación de la interrelación propuesta entre los oligosacáridos <u>a</u> , <u>b</u> y <u>c</u>	205
IV.B.7	CARACTERIZACION DEL oligosacárido <u>a</u>	208
IV.B.7.1	Composición de restos glicosídicos	208
IV.B.7.2	Posición de los enlaces glicosídicos en el octasacárido <u>a</u>	209
IV.B.8	PRESENCIA DE RESTOS ACETILO EN LOS octasacáridos <u>a</u> , <u>b</u> y <u>c</u>	214
IV.B.8.1	Octasacáridos acetilados preparados por biosíntesis in vitro	214
IV.B.8.2	Posición del resto acetilo en los octasacáridos <u>a</u> , <u>b</u> y <u>c</u>	217
IV.B.8.2.1	Interrelación de los octasacáridos <u>a</u> , <u>b</u> y <u>c</u> marcados con (^{14}C)Acetilo	218
IV.B.8.2.2	Degradación con glucosidasa del octasacárido <u>a</u> marcado con (^{14}C)GlcA	221
IV.B.8.2.3	Degradación con glucosidasa del octasacárido <u>a</u> marcado con (^{14}C)Acetilo	223
IV.B.9	ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS DE INCORPORACION A "Extracto 1203" VARIANDO LA TEMPERATURA Y LOS TIEMPOS DE INCUBACION	227

IV.B.10 EXTENSION A OTRAS CEPAS DE RHIZOBIOS DE LOS ESTUDIOS DESARROLLADOS CON <i>Rhizobium trifolii</i> NA-30	235
--	-----

V.0 DISCUSION Y CONCLUSIONES

V.1 ESTUDIOS IN VIVO	243
----------------------	-----

V.2 ESTUDIOS IN VITRO	244
-----------------------	-----

V.2.1 Análisis del trisacárido <u>d</u>	250
---	-----

V.2.2 Análisis de los octasacáridos <u>a</u> , <u>b</u> y <u>c</u>	256
--	-----

VI.0 <u>BIBLIOGRAFIA</u>	267
--------------------------	-----

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	<u>Pág.</u>
<u>TABLAS</u>	
Tabla I	36
Tabla II	57
Tabla III	108
Tabla IV	110
Tabla V	112
Tabla VI	113
Tabla VII	118
Tabla VIII	120
Tabla IX	173
Tabla X	204
Tabla XI	234
Tabla XII	236
<u>FIGURAS</u>	
Fig. 1	8
Fig. 2	13
Fig. 3	19
Fig. 4	35
Fig. 5	39
Fig. 6	41
Fig. 7	48
Fig. 8	51
Fig. 9	53
Fig. 10	53
Fig. 11	55
Fig. 12	64
Fig. 13	68
Fig. 14	70
Fig. 15	116
Fig. 16	122
Fig. 17	125
Fig. 18	128
Fig. 19	129
Fig. 20	132
Fig. 21	133
Fig. 22	134
Fig. 23	137
Fig. 24	139
Fig. 25	140
Fig. 26	141
Fig. 27	143

Fig. 28	149
Fig. 29	150
Fig. 30	154
Fig. 31	156
Fig. 32	157
Fig. 33	158
Fig. 34	160
Fig. 35	163
Fig. 36	165
Fig. 37	168
Fig. 38	169
Fig. 39	171
Fig. 40	173
Fig. 41	175
Fig. 42	175
Fig. 43	178
Fig. 44	179
Fig. 45	181
Fig. 46	182
Fig. 47	184
Fig. 48	185
Fig. 49	188
Fig. 50	191
Fig. 51	194
Fig. 52	196
Fig. 53	198
Fig. 54	202
Fig. 55	207
Fig. 56	210
Fig. 57	210
Fig. 58	213
Fig. 59	216
Fig. 60	220
Fig. 61	222
Fig. 62	225
Fig. 63	229
Fig. 64	230
Fig. 65	233
Fig. 66	238-239
Fig. 67	241-242

R E S U M E N

Se estudió la biosíntesis de los EPSs acídicos de *Rhizobium trifolii* NA-30, *Rhizobium trifolii* ATCC 14479, *Rhizobium leguminosarum* 128-C-53 y *Rhizobium leguminosarum* 128-C-63. Nuestros estudios permiten concluir que en todos los casos, los sistemas mencionados comparten los mismos mecanismos de biosíntesis, por lo menos en cuanto respecta a sus etapas intermedias.

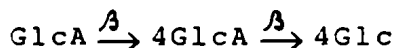
Estos mecanismos implican la participación de intermediarios lipídicos que fueron caracterizados como prenil-fosfo-azúcares. Dichos intermediarios pudieron prepararse marcados con (¹⁴C)Glc, (¹⁴C)GlcA, (¹⁴C)Acetilo, (¹⁴C)Piruvato, ó (³²P) (provenientes respectivamente de UDP(¹⁴C)Glc, UDP(¹⁴C)GlcA, (¹⁴C)Acetil-CoA, (¹⁴C)PEP o de beta(³²P)UDP-Glc).

Los estudios se realizaron fundamentalmente con *Rhizobium trifolii* NA-30.

Con algunas de las marcaciones mencionadas, los prenil-fosfo-azúcares fueron fraccionados intactos en columnas de DEAE-celulosa. Las porciones sacarídicas (para cada una de las marcas en (¹⁴C)) fueron separadas del lípido y analizadas mediante las técnicas corrientes en este tipo de estudios (degradación química ó enzimática, cromatografía en papel y Bio-Gel, electroforesis en papel, permetilación).

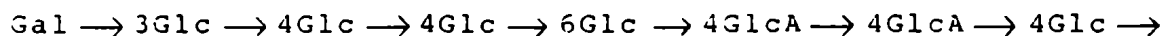
Se aislaron por lo menos cinco oligosacáridos: los trisacáridos d₁ y d₂, y los octasacáridos a, b y c.

Se logró aclarar totalmente la estructura del trisacárido d₁, que resultó idéntica al extremo reductor de la unidad repetitiva propuesta para *Rhizobium trifolii* NA-30 (157):



El trisacárido d₂ se identificó como su derivado acetilado.

Los octasacáridos a, b y c resultaron estrechamente vinculados entre sí, y para ellos se propone lo siguiente: el a sería el octasacárido que constituye la unidad repetitiva sin piruvilar:



el b poseería un grupo cetal-piruvato y el c, dos de estos grupos.

Tanto el trisacárido d₂, como los octasacáridos a, b y c están acetilados en una posición que fue acotada al disacárido que ocupa el extremo reductor de los mismos.

No se observó polimerización in vitro con ninguna de las cepas mencionadas.

ERRATA

página 158,

Donde dice:utilizando el solvente J.

Debe decir:utilizando el solvente J(n-propanol/nitrometano/agua, 5:2:2, v/v).

página 148, 4° párrafo;

Donde dice: ...(Fig 29, panel A)

Debe decir: ...(Fig 28, panel A)

página 233,

Donde dice: y 25° C (panel B). Radioactividad total (-○-), octasacáridos totales (-□-), octasacárido dipiruvilado (-○-), octasacárido monopiruvilado (-●-), trisacáridos (-□-), y ácido urónico (-▼-).

Debe decir: y 25° C (panel B). Radioactividad total (-○-), octasacáridos totales (-○-), octasacárido dipiruvilado (-□-), octasacárido monopiruvilado (-●-), trisacáridos (-□-), y ácido urónico (-▼-).

página 248,

Donde dice: ...(Fig 22, panel C)

Debe decir: ...(Fig 19, panel C)

I.0 INTRODUCCION

I.1 LOS POLISACARIDOS BACTERIANOS

I.1.1 Generalidades

Numerosas especies bacterianas son capaces de sintetizar una amplia variedad de polisacáridos, los cuales pueden tener distintos destinos. Algunos de ellos forman parte de la estructura misma de la célula, como por ejemplo ocurre con el lipopolisacárido (LPS), la mureína o los ácidos teicoicos; otros se mantienen unidos al cuerpo celular formando verdaderas cápsulas (CPS) y un tercer grupo lo constituyen aquellos polisacáridos que son secretados al medio extracelular.

Durante las últimas décadas, los microbiólogos han desarrollado nuevas técnicas para examinar el crecimiento de bacterias in vivo, sea en hábitats naturales o en tejidos infectados. Brown y Williams establecieron que el crecimiento de bacterias en tejidos infectados produce componentes de superficie que no se encuentran o que se encuentran disminuídos en los cultivos in vitro (1). Costerton emplea el término "biofilm" para describir aquellos productos con los cuales las bacterias establecen contacto con su entorno (2).

Distintos polisacáridos bacterianos secretados al medio forman parte sustancial del "biofilm" al que alude Costerton.

Este grupo de polisacáridos es heterogéneo y numeroso, y admite diversas clasificaciones. Siguiendo el criterio de Sutherland, se pueden agrupar en productos de alto y bajo peso molecular (3,4).

I.1.2 Productos de alto peso molecular

Este grupo se subdivide en aquellos polisacáridos constituidos por solamente un tipo de monosacáridos (homopolisacáridos) y aquellos constituidos por dos o más monosacáridos diferentes (heteropolisacáridos).

I.1.2.1 Homopolisacáridos

A este grupo pertenecen la celulosa bacteriana, el CPS de *E. coli* y *N. meningitidis* denominado "ácido colomínico" (polisiálico), dextranos, levanos, y distintos glucanos.

En lo que respecta a la celulosa bacteriana, este polisacárido es producido por varias especies de *Acetobacter* y su estructura es similar a la celulosa vegetal, es decir, moléculas de glucosa enlazadas por uniones glicosídicas beta, 1→4 (15). El producto elaborado por *Acetobacter xylinum* es un polímero de 600 residuos de glucosa que se organiza en forma de microfibras en cultivos líquidos (16). El sistema de síntesis de celulosa está constituido por enzimas asociadas a membranas. Se sabe que la actividad sintetasa es activada por Guanosina-5'-monofosfato cíclico (261).

En cuanto al CPS de *E. coli* (188) y *N. meningitidis* (187) denominado "ácido colomínico", es un homopolisacárido constituido por ácido siálico (N-acetilneuramínico). Fue descrito por primera vez en filtrados de cultivos de *E. coli* 235 por Barry y Goebel (17). Este polisacárido se dispone en forma de cápsula alrededor de la bacteria y puede ser visualizado con una variada cantidad de técnicas. Estudios de microscopía electrónica de los grupos de Bayer, Costerton y Cagel demuestran la naturaleza fibrilar de este polisacárido capsular (18,19,20).

Los dextranos son polímeros de moléculas de alfa-D-glucosa preferentemente unidas por enlaces glicosídicos 1→6, con un porcentaje variable respecto de las restantes uniones posibles. Distintas cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextraticum* y *Streptococcus viridans* son productoras de dextranos (5).

En ocasiones, los dextranos pueden estar o no sustituidos por restos no glicosídicos, lo cual modifica sustancialmente sus propiedades reológicas. Es el caso de un dextrano producido por una cepa de *Alcaligenes faecalis* variedad mixogenes. Esta bacteria produce normalmente un polímero constituido por moléculas de alfa-D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos 1→3, 1→4 y 1→6 que contiene además restos succinilos (6). Existe una mutante que produce un polímero con uniones 1 3 solamente, y además, carente de succinilos. Este dextrano se comporta en solu-

ción de manera distinta al producido por la cepa salvaje, permaneciendo en forma de gel aún después de calentamiento (7), y por tal motivo se lo denominó "curdlano" (del inglés "curd": cuajo).

Las propiedades de los dextranos dependen del tipo de enlaces glicosídicos presentes en sus estructuras y/o de la presencia o ausencia de sustituyentes acilos.

Recientemente fue aislada una mutante de *Rhizobium trifolii* (cepa J-60) que produce gran cantidad de un dextrano que fue caracterizado como curdlano (8). Del mismo modo que para el caso de los levanos, los dextranos son también sintetizados por exoenzimas (en este caso, dextransucrasa, ref. 262).

En lo que respecta a los levanos, son homopolímeros de moléculas de fructosa enlazadas predominantemente por uniones glicosídicas beta, $2 \rightarrow 6$ (9). Poseen pesos moleculares del orden del millón y son producidos tanto por bacterias gram positivas (*Streptococcus*, *Bacillus*) como gram negativas (*Acetobacter*, *Xanthomonas*, *Aerobacter*) (10). Los levanos producidos por bacterias del suelo mejoran las propiedades de los mismos (11).

Algunas especies bacterianas productoras de levanos son patógenas para plantas superiores (12). Como dijimos, los levanos constituyen también un ejemplo de formación extracelular de polisacáridos. En *Bacillus subtilis*, la enzima responsable

(levansucrasa) fue purificada a homogeneidad por el grupo de Dedonder (13), y cataliza la siguiente reacción:



La enzima fue cristalizada y posee un peso molecular de 40.000 Daltons (14).

A partir de los primeros años de la década pasada, fue creciente el interés por el estudio de los glucanos extracelulares producidos por *Streptococcus mutans*, dado que dichos polímeros están implicados en la etiología de la caries dental (21). Las uniones glicosídicas presentes son alfa,1→6 y alfa,1→3. Estos glucanos pueden presentarse en formas solubles o insolubles en agua. Dicha solubilidad depende del porcentaje de uniones alfa,1→3 (22).

En la Figura 1, se muestran esquemas de los homopolisacáridos más comunes.

1.1.2.2 Heteropolisacáridos

Es probablemente el grupo más amplio y heterogéneo. Los monosacáridos que los constituyen son comunmente D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, L-fucosa, L-ramnosa y ácido D-glucurónico. Los heteropolisacáridos se encuentran habitualmente sustituidos por restos acilos, generalmente O-acetilos, cetal-piruvatos, succinilos, hidroxibutiratos, metilos, etc.

FIGURA 1

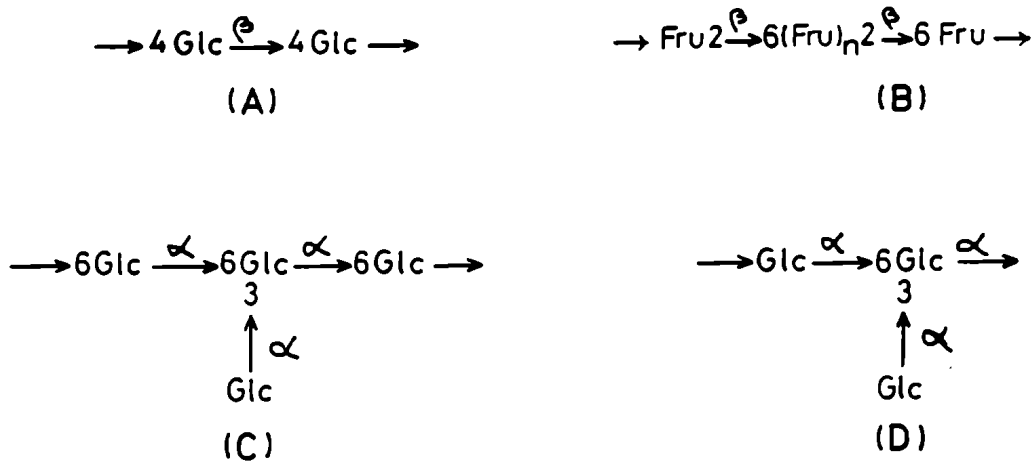


Figura 1: REPRESENTACION DE ALGUNOS HOMOPOLISACARIDOS

- (A) Porción de una molécula de celulosa.
- (B) Representación de un levano.
- (C) Representación de una porción de un dextrano.
- (D) Representación de una porción de glucano producido por *Streptococcus mutans*.

Este grupo puede subdividirse en aquellos exopolisacáridos que están constituidos por unidades repetitivas y aquellos cuya estructura no puede describirse en términos del concepto de unidad repetitiva, aunque la misma admita cierta regularidad. De este último grupo se conoce solo un ejemplo.

1.1.2.2.1 Exopolisacáridos constituidos por unidades repetitivas

Este grupo está formado por carbohidratos que poseen una estructura regularmente repetida, constituida por dos o más monosacáridos diferentes organizados en una cadena principal, a la que pueden agregarse cadenas laterales. Generalmente, estos carbohidratos, se encuentran además sustituidos por restos no glicosídicos.

El número de azúcares por unidad repetitiva varía desde dos hasta ocho o más. En algunas cepas de rhizobios fueron descritos EPSs con unidades repetitivas de hasta 11 monosacáridos (259).

A modo de ejemplo solamente, serán comentados algunos exopolisacáridos pertenecientes a este grupo. Ellos son: el xantano, el acetano y el ácido colánico.

El xantano es producido por la bacteria gram negativa *Xanthomonas campestris*, y dadas sus particulares propiedades reológicas tiene numerosas aplicaciones industriales (23,24). Es

un exopolisacárido acídico compuesto por D-glucosa, D-manosa, ácido D-glucurónico, O-acetilo y cetal-piruvato en una relación de 2:2:1:1:0,5 (25), agrupados en unidades repetitivas de cinco azúcares. Sobre una cadena principal de celulosa se une la cadena lateral constituida por el trisacárido $\text{Man} \xrightarrow{\beta} 4\text{GlcA} \xrightarrow{\beta} 2\text{Man}$. El acetilo forma un éster con la manosa interna y el enlace cetal-piruvato se forma con las manosas terminales (25). La manosa interna está sustituida por el resto glucurónico en posición 2, y se une a la cadena principal de celulosa por enlace glicosídico alfa, $1 \rightarrow 3$. De manera que el xantano puede considerarse una celulosa sustituida.

El acetano es un exopolisacárido producido por la bacteria gram negativa *Acetobacter xylinum*, que como dijimos anteriormente, también es productora de celulosa (26). El acetano contiene D-glucosa, D-manosa, ácido D-glucurónico y L-ramnosa en una relación molar de 4:1:1:1. Este polisacárido está acilado con uno o dos restos acetilos por unidad repetitiva, en posiciones aún no determinadas (26,220).

De modo análogo al caso del xantano, este polisacárido puede considerarse una celulosa sustituida, pero esta vez la cadena lateral está constituida por el pentasacárido $\text{Rha} \rightarrow 6\text{Glc} \xrightarrow{\beta} 6\text{Glc} \xrightarrow{\alpha} 4\text{GlcA} \xrightarrow{\beta} 2\text{Man}$.

Nuevamente, una manosa sustituida en posición 2 por un resto glucurónico se une a la cadena principal de celulosa por enlace glicosídico alfa, $1 \rightarrow 3$.

"Acido colánico" es el nombre dado a un polisacárido formado por enterobacterias, entre ellas E. coli K235. Se dispone en forma de cápsula alrededor de la célula y es serológicamente activo y tóxico cuando se inyecta intraperitonealmente en ratones (27). El ácido colánico está formado por L-fucosa, D-galactosa, D-ácido glucurónico y D-glucosa en una relación molar de 2:2:1:1. El polisacárido está constituido por unidades repetitivas de seis azúcares. Los dos restos de fucosa y la glucosa constituyen la cadena principal. Una de las dos fucosas puede o no estar acetilada. La cadena lateral está formada por el trisacárido $\text{Gal} \xrightarrow{\beta} 4\text{GlcA} \xrightarrow{\beta} 3\text{Gal}$. La galactosa terminal puede estar piruvilada (28). Nuevamente, una hexosa neutra sustituida por un resto de ácido glucurónico se liga mediante enlace glicosídico a la cadena principal. No obstante esta característica, la misma no puede generalizarse, dado que existen numerosos ejemplos de EPSs que no poseen restos urónicos en la cadena lateral, pero sí en la principal. Así ocurre con los EPSs de rhizobios, los que serán tratados más adelante (sección I.6).

I.1.2.2.2 Exopolisacáridos no constituidos por unidades repetitivas

Es el caso de los alginatos producidos por distintas especies de Azotobacter vinelandii (29) y Pseudomonas aeruginosa (30). Estos polisacáridos carecen de una estructura regular y están compuestos de ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico.

Dichos monosacáridos se distribuyen en bloques de ácido D-manurónico o de ácido L-gulurónico, o bien bloques mixtos que presentan alternancia de uno u otro (29,31).

Una diferencia con los alginatos producidos por algas es que los provenientes de bacterias están acetilados. Los grupos O-acetilo se encuentran esterificando bloques de alto peso molecular constituídos por ácido manurónico (32). Otra particularidad interesante en los alginatos bacterianos es que se sintetizan como ácido polimanurónico y la epimerización de residuos para formar ácido L-gulurónico ocurre después de la polimerización (33). Se postula que los restos O-acetilo protegerían de la epimerización a los restos de ácido D-manurónico (32).

Los alginatos de calcio forman una red insoluble que puede utilizarse como soporte para inmovilizar células. Recientemente, células de Langerhans inmovilizadas sobre alginatos fueron implantadas en perros pancreatectomizados en los cuales produjeron y secretaron insulina durante el período de un mes (34). La Figura 2 muestra las estructuras de dos de los heteropolisacáridos descritos en el texto.

I.1.3 Productos de bajo peso molecular

Distintas especies de bacterias producen y secretan al medio carbohidratos de bajo peso molecular. Hace ya unos 40 años,

FIGURA 2

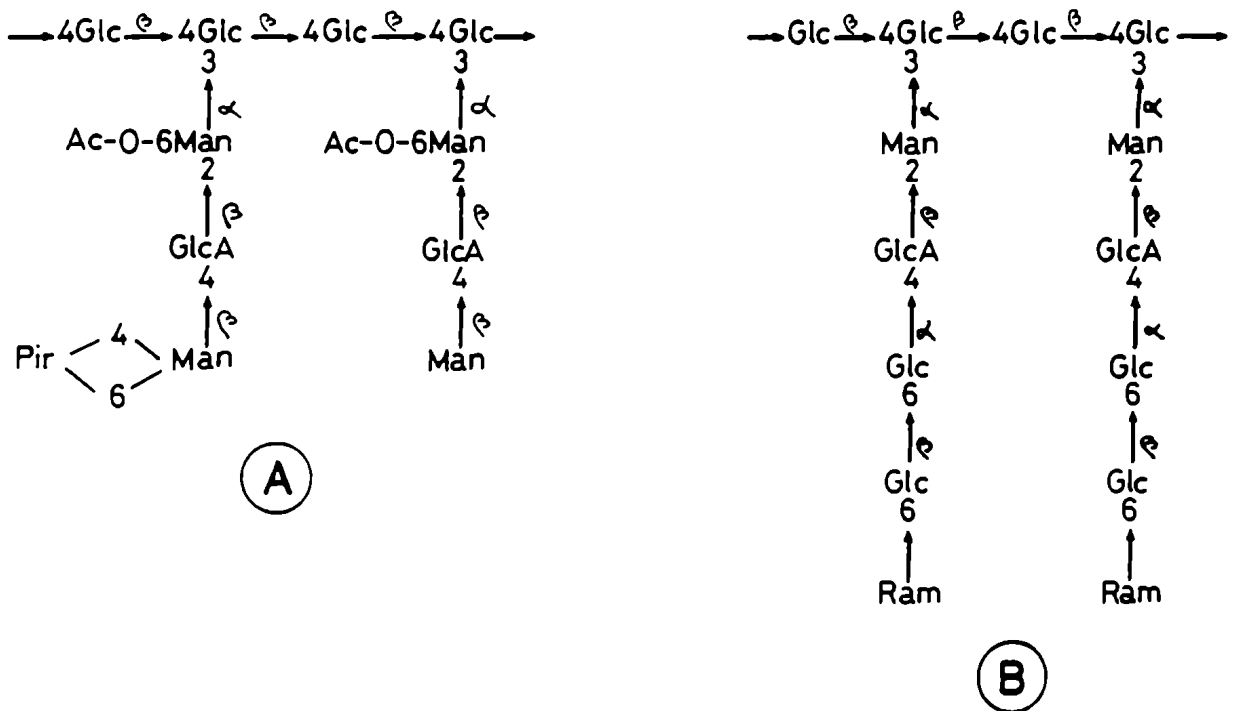


Figura 2: ESTRUCTURAS DE LAS UNIDADES REPETITIVAS DE DOS HETEROPOLISACARIDOS: XANTANO Y ACETANO

(A) Estructura del xantano (25).

(B) Estructura del acetano (26). No se representan 2 restos O-acetilo por unidad repetitiva (220).

Riker describió que cepas de agrobacterias eran productoras de glucanos de pesos moleculares bajos (35). Recientemente este hallazgo fue extendido a distintas especies de rizobios (36). Estos polisacáridos han sido identificados como glucanos beta,1→2 por el grupo de Hassid (37), y tanto en agrobacterias como en rizobios constituyen una familia de glucanos cíclicos con grado de polimerización (GP) entre 17 y 24 (38). Algunas especies secretan glucanos de GP:17; en otras predominan los de GP:19, y otras pueden producir glucanos de GP:20, 21, ó 22 (39,40).

El grupo de Dudman describió una cepa de *Rhizobium japonicum* que produce dos glucanos ramificados con enlaces glicosídicos 1→3 y 1→6 que poseen pesos moleculares del orden de 4500 y 12.000 Daltons (41). Asimismo, el grupo de Amemura comunicó que distintas especies de rizobios (42) y de *Acetobacter* (260) producen y secretan al medio de cultivo glucanos beta,1→2 de GP:6-42, pero a diferencia del caso de agrobacterias y rizobios, *Acetobacter* produce glucanos lineales.

Además de esta variedad de productos neutros, distintas especies de agrobacterias y rizobios producen y secretan al medio oligosacáridos cargados de bajo peso molecular. Dichos productos constituyen las unidades repetitivas de sus respectivos EPSs, en ocasiones sustituidas con restos no glicosídicos (42). Este es el caso de distintas cepas de *Rhizobium meliloti* que son

capaces de secretar al medio monómeros de su EPS piruvilados y/o succinilados. Los mismos sustituyentes se encuentran también en el EPS maduro (36).

Hay un tercer grupo de carbohidratos de bajo peso molecular que si bien no son secretados al medio, permanecen en el espacio periplásmico y están directamente vinculados a la interacción de la bacteria con su entorno, ya que participan en la regulación de la osmolaridad. Se los denomina oligosacáridos derivados de membrana (MDO), y se encuentran en *E. coli* y probablemente en otras bacterias. Fueron descritos por el grupo de Kennedy (43) y poseen un GP:8 a 18. Presentan enlaces glicosídicos 1→2 y 1→6.

Dichos oligosacáridos poseen un resto fosforil-glicerol o fosforil-etanolamina que les permite el "anclaje" en la membrana lipídica.

I.2 LOS RHIZOBIOS Y SU INTERACCION CON PLANTAS LEGUMINOSAS

I.2.1 Generalidades

El grupo de bacterias del suelo denominadas Rhizobios está constituido por bacilos Gram negativos que se caracterizan por su capacidad de infectar las raíces de las plantas leguminosas (44). Dicha infección origina una estructura denominada "nódulo", en la cual la bacteria fija nitrógeno atmosférico en una forma que puede ser utilizada por la planta.

Más allá de las distintas tradiciones de la antigüedad grecorromana, europea de los siglos recientes o americana precolombina en el sentido de que las leguminosas son "buenas para la tierra" (45), fueron los trabajos de Hellriegel y Willfarth en 1888 los que constituyen el punto de partida para el estudio moderno de la interacción Rhizobio-leguminosa (46). En aquel trabajo, los autores establecen que:

- 1) Las leguminosas se comportan de manera completamente distinta a las gramíneas en cuanto a su alimentación nitrogenada.
- 2) Las gramíneas dependen de las reservas de nitrógeno del suelo.
- 3) Las leguminosas poseen además otra fuente de nitrógeno.
- 4) Esta otra fuente la constituye el nitrógeno atmosférico.
- 5) Para esta asimilación diferencial, las leguminosas

dependen de microorganismos presentes en el suelo.

- 6) La sola presencia de microorganismos no basta para la asimilación del nitrógeno por las leguminosas. Es necesario que aquéllos establezcan una relación simbiótica con la planta.
- 7) Las nudosidades radiculares de las leguminosas no son simples órganos de reserva, sino que están en relación causal con la asimilación de nitrógeno libre.

El proceso total es considerado una simbiosis, dado que beneficia tanto a la bacteria como al huésped, y es responsable de la reducción de alrededor de 20 millones de toneladas de nitrógeno atmosférico por año (47).

La asociación simbiótica es especie-específica, y los rizobios se clasifican en base al huésped que infectan. Así por ejemplo, *Rhizobium trifolii* infecta y nodula trébol blanco o rojo (*Trifolium repens* o *pratensis*, respectivamente); *Rhizobium leguminosarum* nodula arveja (*Pisum sativum*); *Rhizobium meliloti* nodula alfalfa (*Medicago sativa*) y *Bradyrhizobium japonicum* nodula soja (*Glycine max*) (44).

Como dijimos anteriormente, el proceso previo a la nodulación es específico y requiere mecanismos de reconocimiento aún no aclarados.

1.2.2 Formación del nódulo

La formación y características finales del nódulo varían con los sistemas estudiados (48,49,50,51,52). La Figura 3 representa el esquema del desarrollo de un nódulo en leguminosas de clima templado. En la hilera superior se indica el fenotipo de las bacterias mutantes para una etapa dada de la simbiosis. La Figura 3 incluye las funciones conocidas hasta el momento y seguramente este esquema se modificará con el avance de los conocimientos.

El proceso comienza con la colonización de la raíz por bacterias que se adhieren polarmente a los pelos radiculares. Seguidamente ocurre un enrulamiento del pelo radicular que permite a las bacterias quedar ocluidas. Luego, a partir del sitio del rulo se desarrolla el llamado "hilo de infección", y las bacterias penetran por él hasta la raíz. El hilo de infección atraviesa las células externas de la corteza y se ramifica. Simultáneamente las células internas de la corteza comienzan a proliferar y forman un núcleo de células en división por delante del hilo de infección. Dichas células en división son invadidas por bacterias, las cuales son liberadas del hilo de infección y se cubren de membranas aportadas por las células de la planta.

Las células infectadas cesan de dividirse y comienzan a hincharse (53), conjuntamente se forma un meristema apical con

FIGURA 3

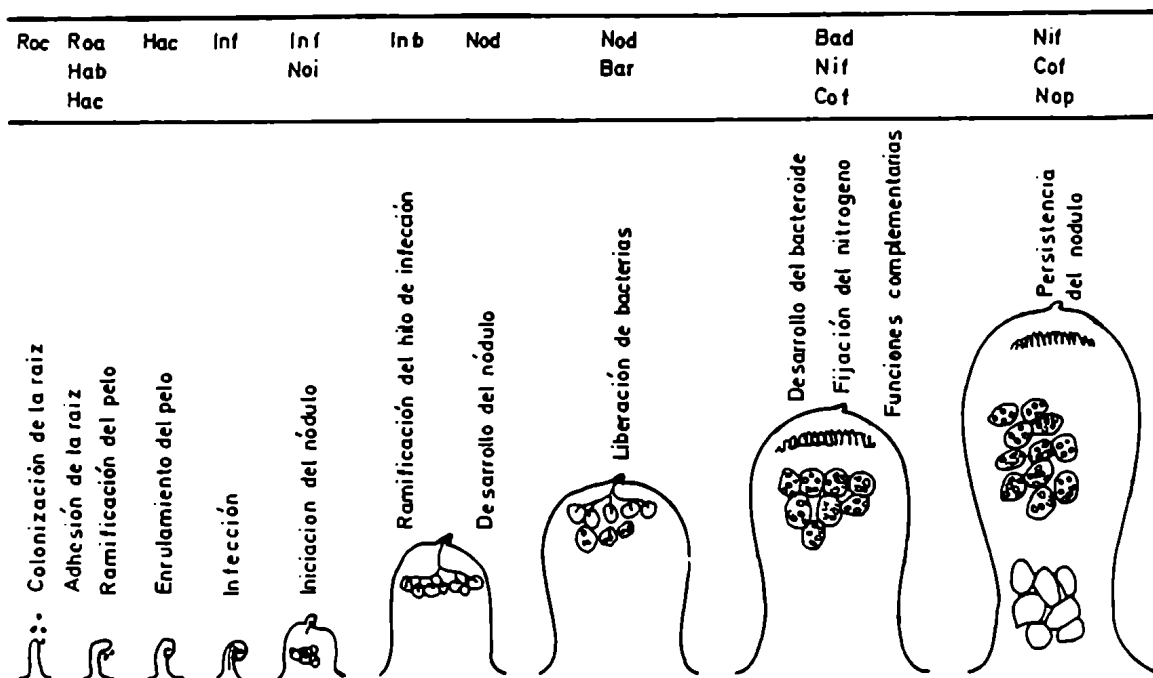


Figura 3: ESQUEMA DEL DESARROLLO DE UN NODULO EN LEGUMINOSAS DE CLIMA TEMPLADO

- Roc: Colonización de la raíz (root colonization).
 Roa: Adhesión a la raíz (root adhesion).
 Hab: Ramificación del pelo (hair branching).
 Hac: Enrullamiento del pelo (hair curling).
 Inf: Infección (infection).
 Noi: Iniciación del nódulo (nodule initiation).
 Inb: Ramificación del hilo de infección (infection thread branching).
 Nod: Desarrollo del nódulo (nodule development).
 Bar: Liberación de las bacterias (bacterial release).
 Bad: Desarrollo del bacteroide (bacteroid development).
 Nif: Fijación de nitrógeno (nitrogen fixation).
 Cof: Funciones complementables (complementary functions).
 Nop: Persistencia del nódulo (nodule persistence).

Tomado de Rolfe, B.G. and Shine, J. (53).

células no infectadas que continúan dividiéndose. Algunas de estas células son invadidas por hilos de infección y otras proveen nueva corteza y paquetes vasculares. Esta actividad continúa así hasta que el nódulo queda morfológicamente constituido.

Durante el desarrollo y mantenimiento del nódulo, distintos sistemas de genes de la bacteria y/o la planta se expresan de una manera coordinada. Así, por ejemplo, la bacteria induce la síntesis del complejo de la nitrogenasa y sufre una serie de cambios morfológicos hasta que se estabiliza en la forma denominada "bacteroide", el cual es activo para la fijación de nitrógeno.

Asimismo, por un mecanismo no aclarado, la planta induce la síntesis de proteínas específicas del nódulo llamadas "nodulinas" (54), como también de la porción proteica de la leghemoglobina (55). La porción hemo es aportada por la bacteria (55).

Con respecto a las nodulinas, las mismas han sido aisladas de nódulos de soja (55), alfalfa (56), y poroto (57), y se las divide en dos categorías: comunes (c-nodulinas) presentes en todos los nódulos y vinculadas al proceso de fijación de nitrógeno, y las nodulinas específicas (s-nodulinas), implicadas en el metabolismo del carbono y nitrógeno (58).

En lo que respecta a la leghemoglobina, es una hemoproteína capaz de ligar oxígeno presente en el citoplasma de las células del nódulo (57,58,59). El complejo enzimático de la nitrogenasa

es sensible al oxígeno y la hemoproteína actúa regulando su presencia en el nódulo.

I.2.3 Los carbohidratos en la interacción Rhizobio-leguminosa

I.2.3.1 Carbohidratos y fenómenos de reconocimiento

Dada la extensa variedad de organismos existentes y de funciones e interacciones que los vinculan, no podemos menos que pensar que los carbohidratos constituyen entidades moleculares sumamente adecuadas para participar en fenómenos del tipo relatado por Ashwell o Kornfeld (toma de glicoproteínas circulantes por el hígado (60,61)); o aún en interacciones de las células entre sí o de las células con su medio circundante.

Un sencillo cálculo nos permitirá argumentar lo antedicho:

Tres residuos de un mismo aminoácido, D-alanina por ejemplo, pueden formar solo un tripéptido. Del mismo modo, tres residuos de un nucleótido pueden formar solo un trinucleótido. Sin embargo, tres residuos de un azúcar simple tal como D-glucosa, pueden formar hasta 100 trisacáridos diferentes. Si se realiza el mismo análisis, pero esta vez con tres residuos distintos, el número de posibilidades es 6 para el caso de tripéptidos o trinucleótidos y asciende a más de 1000 para el caso de trisacáridos (62).

La gran diversidad y complejidad estructural de los carbohidratos es el resultado de las características únicas que presentan. En primer término, una molécula de hexosa, por ejemplo, puede unirse a otra siguiente en cuatro posiciones diferentes. Además, los oligo o polisacáridos pueden ser de cadena lineal o ramificada, el enlace glicosídico puede presentar las configuraciones alfa o beta, y el anillo puede ser de cuatro o cinco miembros.

Además de esta enorme variedad de posibilidades, los carbohidratos pueden ser modificados por el agregado de sustituyentes no glicosídicos como piruvilos, acetilos, ésteres de sulfato, éteres, etc. Si se trata de polisacáridos complejos, estos sustituyentes les confieren propiedades reológicas particulares, lo cual en la naturaleza multiplica sus cualidades y los convierte además en núcleo de interés desde el punto de vista industrial.

Así ha ocurrido por ejemplo, con el caso del xantano, un exopolisacárido complejo producido por la bacteria *Xanthomonas campestris*, de amplia aplicación en las industrias del petróleo, cosmética o alimenticia (63), cuya biosíntesis fue aclarada en nuestro laboratorio (64), como veremos más adelante.

1.2.3.2 Polisacáridos implicados en la simbiosis Rhizobio-leguminosa

En general, los fenómenos de reconocimiento son la culminación de una serie compleja de hechos. Aunque la interacción Rhizobio-leguminosa ha recibido considerable esfuerzo de investigación, es realmente poco lo que se sabe acerca del o los mecanismos moleculares de la misma. Los polisacáridos que intervienen son varios, y de algunos de ellos se especula participen en algunas de las etapas de la simbiosis. Estos carbohidratos son:

- Glucanos beta,1→2 cíclicos (65)
- Lipopolisacáridos (LPS) (66)
- Polisacáridos capsulares (CPS) (67)
- Exopolisacáridos acídicos (EPS) (68,69,70,71,72)
- Fragmentos de oligosacáridos del EPS (73)

I.3 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS ASOCIADAS A LOS POLISACÁRIDOS DE RHIZOBIOS

La interacción de los polisacáridos de Rhizobios con la superficie de las células de la raíz de las leguminosas juega sin duda un importante papel en el establecimiento de la simbiosis. Como dijimos anteriormente, distintas especies de Rhizobios producen una variedad de polisacáridos implicados en la interacción con el huésped, algunas de cuyas funciones y actividades comienzan a ser comprendidas. Las mejor conocidas se describen a continuación.

I.3.1 Estimulación de la infección y nodulación

Varios autores consideran que el tratamiento de raíces de trébol, previo a la inoculación, con polisacáridos producidos por *Rhizobium trifolii*, se traduce en un aumento de la infectividad y de la nodulación. Se ha descrito esta estimulación con glucanos beta,1→2 cíclicos (65), o con fragmentos de oligosacáridos del EPS (75) o con CPS (75), o con LPS (76).

En lo que se refiere a los glucanos beta,1→2 cíclicos, los mismos son producidos por rhizobios y agrobacterias. Recientemente ha sido descrito que distintas especies de *Xanthomonas* producen y secretan el medio extracelular un glucano cíclico beta,1→2 de GP: 16 (77). Como es sabido, los tres géneros bacterianos mencionados establecen interacciones

(patógenas o no) con plantas, las cuales constituyen sus huéspedes específicos.

La participación de los glucanos cíclicos en fenómenos de infectividad ha sido estudiada sobre todo en agrobacterias.

Las especies virulentas de agrobacterias interactúan con plantas dicotiledóneas e inducen la formación de un tumor (agalla de corona). Mutantes avirulentas de *Agrobacterium tumefaciens* no sintetizan glucanos cíclicos (78). El fenotipo original se recupera por complementación con DNA de la cepa salvaje (79).

Por otra parte, con el sistema de *Rhizobium trifolii*, el número de nódulos también se incrementa por el pretratamiento de raíces de trébol (previo a la inoculación) con fragmentos de oligosacáridos del EPS, los cuales además presentan la particularidad de unirse específicamente a Trifolina A. La participación de esta lectina de trébol en la interacción rhizobio-leguminosa será discutida (sección I.3.4).

Los fragmentos de oligosacáridos que se unen específicamente a Trifolina A pueden obtenerse in vitro por tratamiento del CPS o del EPS de *Rhizobium trifolii* con una hidrolasa obtenida de lisados de dos bacteriofagos específicos de *Rhizobium trifolii* (80). Por otra parte, con el sistema de *Rhizobium meliloti*, cepas mutantes incapaces de sintetizar EPS (Exo^-), inducen la formación de nódulos no infectivos en alfalfa (81).

En lo que respecta al LPS, Dazzo y su grupo comunicaron que para el caso de de *Rhizobium trifolii*, el contenido de quinovosamina del LPS (quinovosamina: 2-amino-2,6 dideoxiglucosa) se modifica durante el pasaje de cultivos de fase exponencial a fase estacionaria. Esta modificación coincide en el tiempo con el carácter transiente de *Rhizobium trifolii* para unir específicamente Trifolina A (82).

I.3.2 Enrulamiento del pelo radicular

Como vimos previamente (sección I.2.2), esta etapa es una de las más tempranas en el proceso que lleva a la formación del nódulo. A pesar de que este fenómeno fue descrito por primera vez hace más de 100 años (83), se tuvieron indicios claros de la participación de una/s molécula/s en la simbiosis rhizobio-leguminosa hace aproximadamente unos 20 años cuando se demostró que sobrenadantes de cultivos de rhizobios libres de células inducen enrulamiento de pelos radiculares (69,71).

El grupo de Vincent estableció que el enrulamiento es específico dado que ocurre cuando las plantas son inoculadas con cepas de rhizobios homólogos (84).

Los resultados obtenidos hasta el presente indican que en este fenómeno están implicados el EPS, el CPS, algún factor o factores presentes en el filtrado de cultivos libre de células y una fracción (o fracciones) proteica extracelular producida por el huésped (70,71,84,85).

Es interesante destacar que trabajos de Erwin y Hubbel con el sistema de *Rhizobium trifolii* ponen de manifiesto que las fracciones aisladas no son capaces de desarrollar el fenómeno con la misma intensidad (68). Los autores sugieren que son necesarias por lo menos dos fracciones para un enrulamiento exitoso: una que contiene polisacárido/s y otra que contiene proteína/s (68).

Asimismo, Solheim estableció para el sistema de *Rhizobium trifolii* que cultivos desarrollados en presencia de raíces de trébol, y posteriormente filtrados para eliminar las células, exhiben mayor capacidad para producir enrulamiento que aquellos filtrados provenientes de cultivos desarrollados en ausencia de raíces de trébol (86). Concurrentemente con estos resultados, el mismo autor, y también el grupo de Dazzo, proponen que polisacáridos de la superficie de *Rhizobium trifolii* son degradados específicamente por enzimas provenientes de la raíz del huésped (87,88). Dicha actividad enzimática específica debida al huésped podría resultar en la síntesis del factor o factores biológicamente activos para producir enrulamiento.

En *Rhizobium trifolii*, cepas mutantes incapaces de producir enrulamiento (Hac^-) producen un EPS idéntico en su estructura glicosídica a las cepas salvajes (39), pero estudios de 1H -RMN realizados con las mismas cepas mutantes por otro grupo de autores, ponen de manifiesto que el EPS producido por las cepas Hac^- difiere del producido por las cepas salvajes en su com-

posición de sustituyentes no glicosídicos (en este caso acetato, cetal-piruvato y beta-hidroxibutirato) (90).

Por otra parte, y considerando que aún antes del enrulamiento del pelo radicular, las bacterias son atraídas hacia las raíces en crecimiento, debe destacarse que recientemente Caetano-Anollés y colaboradores describieron una mutante de *Rhizobium meliloti* (cepa L5-30) deficiente en motilidad y quimiotaxia que no es capaz de nodular normalmente: presenta menor número de nódulos y de aparición tardía (91).

I.3.3 Formación del hilo de infección

Como dijimos anteriormente (sección I.2.2), luego del reconocimiento y la adherencia, los rhizobios son ocluidos en el rulo del pelo radicular y el huésped deposita nueva pared celular internamente a este punto para comenzar a formar el hilo de infección (92).

Este hecho hace suponer que la antigua pared es degradada. Fue sugerido que los polisacáridos de rhizobios inducen respuestas en el huésped, una de las cuales sería la síntesis de poligalacturonasas que estarían vinculadas a la degradación de paredes celulares (93,94).

Si bien todos los polisacáridos de rhizobios fueron implicados en la formación del hilo de infección (95), los resultados

experimentales más concluyentes están relacionados a los glucanos cíclicos (96).

En el sistema de *Rhizobium meliloti*, la mutante GRT 21s no sintetiza glucanos cíclicos y es incapaz de promover la formación del hilo de infección (97). Esta evidencia sugiere que los glucanos cíclicos constituirían la molécula señal o una de las moléculas señal en la formación del hilo de infección. Su participación, como la de otro u otros polisacáridos, así como la actividad poligalacturonasa requiere aún futuros estudios.

I.3.4 La hipótesis de la lectina

Esta hipótesis fue inicialmente propuesta en el año 1975 por Albersheim y Anderson-Prouty (72). Postula que lectinas del huésped interactúan selectivamente con polisacáridos de superficie de rizobios.

Existen abundantes evidencias experimentales tanto a favor como en contra del comportamiento de lectinas como moléculas señal en la interacción rizobio-leguminosa y solo serán comentadas algunas de ellas.

La primera evidencia experimental a favor fue proporcionada por los trabajos de Bohlool y Schmidt, quienes demostraron que la lectina de poroto de soja marcada con isotiocianato podía unirse específicamente a 22 de 25 cepas de *Bradyrhizobium japonicum*.

Inversamente, la lectina era incapaz de unirse a la totalidad de las cepas heterólogas ensayadas, las que además no lograban nodular soja (98). Dichas cepas heterólogas adquirían la capacidad de unir la lectina si eran cultivadas en presencia de exudados de raíz de soja (99).

El grupo de Dazzo encontró una estrecha correlación entre la capacidad para unir lectinas y la infectividad en el sistema de *Rhizobium trifolii* (100). Las cepas infectivas de *Rhizobium trifolii* producen polisacáridos que presentan reacción cruzada con la superficie de las células de los pelos radiculares de trébol (100). La lectina purificada de trébol (trifolina A) se une a los polisacáridos de superficie de *Rhizobium trifolii* (101) e interactúa específicamente con el LPS y el CPS (102).

Según estos mismos autores, el reconocimiento en la interacción de *Rhizobium trifolii* con la raíz de trébol puede dividirse en dos fases: una primera fase de contacto entre la bacteria y el huésped, en la cual la lectina multivalente reconocería similares carbohidratos en el rhizobio y en la planta (100), y una segunda fase de adherencia mediante fibrillas extracelulares de origen aún desconocido (82).

Según Bauer, en el sistema de *Bradyrhizobium japonicum* la capacidad de unir lectina y la infectividad varían con la edad del cultivo (103) o por modificación de los carbohidratos implicados mediante sustituyentes no glicosídicos (104).

Asimismo, el grupo de Dazzo ha comunicado que en el sistema de *Rhizobium trifolii*, los sustituyentes no glicosídicos del EPS difieren en cantidad dependiendo de que el cultivo sea cosechado en fase exponencial o estacionaria (105).

Dazzo define a la lectina de *Rhizobium trifolii* (Trifoliina A) como una glicoproteína capaz de unir carbohidratos de manera específica y que tiene un peso molecular de aproximadamente 53.000 Daltons. Dicha proteína se agrega a valores de pH cercanos a su punto isoeléctrico, en partículas con un diámetro cercano a 10 nm (106).

En contra del comportamiento de lectinas como molécula señal está el hecho de que han sido aisladas especies de Rhizobios que unen lectinas pero son incapaces de infectar o nodular eficientemente (107,108,109,110).

Recientemente, Maréchal y Lepek, trabajando con una aglutinina de semilla de alfalfa encontraron que de manera dependiente del punto isoeléctrico, otras proteínas no vegetales (lisozima y albúmina bovina) presentaban la misma propiedad de aglutinación que la aglutinina. Asimismo, dichos autores comunicaron que existe también inespecificidad en la inhibición de la aglutinación: la misma puede ser lograda no solo con LPS de *Rhizobium meliloti* sino también con otros polímeros negativamente cargados (EPS de *Rhizobium meliloti* R41, DNA de timo bovino, entre otros) (111).

I.4 GENES BACTERIANOS INVOLUCRADOS EN LA INTERACCION RHIZOBIO-LEGUMINOSA

I.4.1 Generalidades

El primer paso en el establecimiento de la simbiosis es el reconocimiento y la invasión del huésped apropiado por la bacteria. Es claro que tanto la bacteria como la planta codifican productos para las diferentes etapas de este proceso y que los genes son activados en un momento preciso.

Es necesario, por lo tanto, que ambos simbioses ajusten un programa de expresión de los genes involucrados.

Los procesos que ocurren en la bacteria o en la planta difieren significativamente, dado que se trata de la interacción de dos organismos muy distintos: uno procariota y otro eucariota. Solo serán mencionados los genes bacterianos y algunos productos elaborados por la planta con actividad reguladora sobre los mismos.

Han sido aisladas un gran número de mutantes bacterianas para la simbiosis. Las mismas pueden clasificarse fenotípicamente en dos grupos: Nod⁻ y Fix⁻. Las primeras tienen bloqueada alguna/s etapa/s antes de la formación del nódulo, mientras que las segundas nodulan el huésped apropiado pero son incapaces de reducir nitrógeno atmosférico.

En base a esto, los genes se denominan "nod" y "fix". Dicha denominación hace referencia al fenotipo solamente. A medida que genes pertenecientes a uno u otro grupo son mejor caracterizados, adquieren nomenclatura genotípica que denota específicamente su función. Es el caso de los genes "nif" que codifican para el complejo enzimático de la nitrogenasa, hoy bien estudiados genéticamente (112) y en principio agrupados junto a los genes "fix".

Otro grupo importante de mutantes, también agrupadas fenotípicamente, son aquellas que son incapaces o bien deficientes en la producción de EPS. A estas mutantes se las denomina Exo⁻.

I.4.2 Los genes "nod"

En numerosas especies de Rhizobios, los genes nod, fix y nif están localizados en megaplásmidos. En *Rhizobium meliloti*, por ejemplo, fueron descritos dos megaplásmidos involucrados en la simbiosis, denominados plásmidos Sym. Uno de ellos es portador de genes nod, nif y fix, y el otro solamente algunos genes fix vinculados a la invasión de nódulos en desarrollo (113,114,115, 116).

Los genes nod se clasifican en "genes nod comunes" (genes "nod" propiamente dichos) y genes de "especificidad de huésped"

(genes "hsn", del inglés: host specificity nodulation). El tamaño que ocupa esta información es de alrededor de 20 Kilopares de bases. Es posible transferir la especificidad de huésped transformando cepas heterólogas con la porción de DNA que codifica los genes "hsn" (117,118).

La Figura 4 muestra un esquema de los genes nod en tres especies diferentes. Los genes "nod" propiamente dichos son A,B, C y D, y los genes "hsn" son E,F,G y H (sinonimia según el grupo de A. Kondorosi: E = hsnB, F = hsnA, G = hsnC y H = hsnD (126)). Cada grupo de genes constituye dos operones y cada uno de ellos se transcribe en ambas direcciones.

Asimismo, existe por lo menos un ejemplo de especificidad de huésped dentro de una misma especie de rhizobio. Así, *Rhizobium leguminosarum* es incapaz de nodular normalmente poroto primitivo de Afghanistan, pero la cepa denominada TOM posee el gen "nod X" en el plásmido Sym, y esta información genética "extra" le permite nodular dicho huésped. El gen "nod X" codifica para una proteína hidrofóbica de PM: 41.036 Daltons que no presenta homología clara con ninguna otra proteína de banco de datos (119).

La Tabla 1 muestra un resumen de los genes nod, sus productos y los fenotipos asignados hasta el presente.

La secuencia de aminoácidos deducida para el producto del gen nod F presenta homología con la proteína transportadora de

FIGURA 4

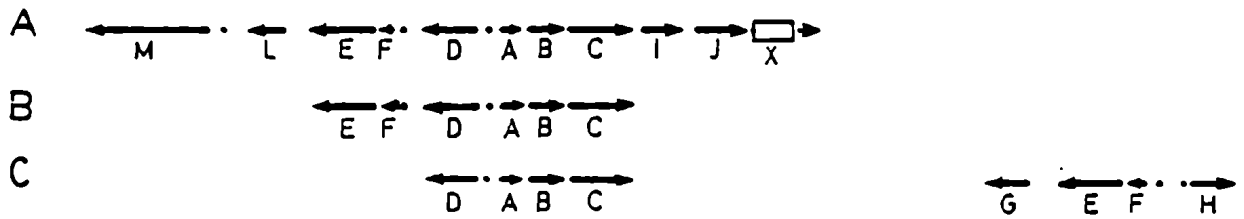


Figura 4: MAPA GENETICO DE LAS REGIONES "nod"

Tomado de Rossen L., Davies O. and Johnston A.W.B. (256). Sinonimia según el grupo de A. Kondorosi: F = hsnA, E = hsnB, G = hsnC, y H = hsnD (126,257).

- A) *Rhizobium leguminosarum* (bv. *viciae*).
- B) *Rhizobium trifolii* (R. leg. bv. *trifolii*).
- C) *Rhizobium meliloti*.

TABLA I: LOS GENES "nod" Y SUS PRODUCTOS

Gen	Producto codificado	Fenotipo de la cepa mutada			Referencia
		R.leguminosarum	R.trifolii	R.meliloti	
nodA	Citoplásmico	Hac ⁻	Hac ⁻	Hac ⁻	120-123
nodB		Hac ⁻	Hac ⁻	Hac ⁻	120,121, 123
nodC	Unido a membrana	Hac ⁻	Hac ⁻	Hac ⁻	120,121, 124
nodD	Regulatorio	Hac ⁻	Hac ⁻	R	123,125, 126
nodE		R	R (Nod ⁺ , poroto)	R	126-128
nodF	Homología con proteína transportadora de grupos acilo	?	R (Nod ⁺ , poroto)	R	123,126 127,128
nodG	Homología con ribitol deshidrogenasa	NI	NI	R	126,128
nodH		NI	NI	R	126,128
nodI	Asociado a membrana, homología con componentes de sistemas de transporte	R	NI	NI	129
nodJ	Probablemente unido a membrana	R	NI	NI	129
nodL		?	NI	NI	130
nodM	Homología con amido fosforibosil transferasa	?	NI	NI	130
nodX	Probablemente unido a membrana. Confiere capacidad para nodular poroto de Afghanistan	Nod ⁻ en poroto de Afghanistan			131

Tomado de Rossen L., Davies O. y Johnston W.B. (256).

Hac, enrulamiento del pelo radicular; R, retardo en el inicio de la nodulación y disminución del número de nódulos; NI, gen no identificado; ?, mutación no aislada; Nod, nodulación.

grupos acilo de *E. coli*, especialmente en la región que une pantotenato. El grupo de Johnston considera razonable suponer que el producto de dicho gen sea una proteína transportadora de grupos acilo probablemente implicada en reacciones de acetilación (127).

Resulta interesante destacar que mutaciones en los genes *nodF* o *nodE* permiten que *Rhizobium trifolii* nodule poroto, aunque pobremente (132). Rolfe considera que una explicación general para esta observación es que los productos de los genes *nodF* y *nodE* modifiquen algún componente de superficie presente en todas las especies de Rhizobios, pero que difiera poco de una especie a otra. Dicha modificación contribuiría al reconocimiento en el huésped apropiado e impediría el reconocimiento heterólogo (132).

I.4.3 Regulación de la expresión de los genes nod

I.4.3.1 Generalidades

La regulación de los genes *nod* fue estudiada en *Rhizobium leguminosarum* por el grupo de Johnston (127) y en *Rhizobium meliloti* por el grupo de Rolfe (85).

El gen *nodD* controla la expresión de los otros genes *nod*, sean éstos "genes *nod* comunes" (*nod A*, *B* y *C*) o "genes *hsn*" (*nod E*, *F*, *G*, y *H*). Además, en *Rhizobium leguminosarum*, el gen *nod D* es autorregulatorio. Dicha regulación ocurre solamente en presen-

cia de un compuesto (o compuestos) proveniente de exudados de raíz del huésped apropiado (134).

Rhizobium meliloti posee más de una copia del gen *nodD* en el plásmido *Sym* y no presenta el fenómeno de autorregulación. Mutaciones en el gen *nodD* impiden la nodulación en *Rhizobium leguminosarum*, pero no en *Rhizobium meliloti* (135).

La Figura 5 muestra un esquema de la organización y regulación de los genes *nod* en *Rhizobium meliloti*.

Existe una secuencia de 47 pares de bases altamente conservada inmediatamente antes del promotor de cada copia del gen *nodD*. Dicha secuencia se denomina "caja *nod*" ("nod box"), y mutaciones en ella inactivan los genes ubicados hacia la región 3' del promotor (136). La coordinación de la activación de los genes *nod* puede estar mediada por el pegado del producto del gen *nodD* al "nod box". Dicho producto sería previamente modificado por un factor (o factores) proveniente de la planta. De este modo, la RNA polimerasa se pegaría a los promotores para comenzar la transcripción (136). Parecería que la planta no solamente provee señales para las primeras etapas de la interacción sino también para estadios tardíos en los cuales el bacteroide necesita derreprimir los genes *nif*.

Como dijimos, dichos genes codifican para el complejo enzimático de la nitrogenasa y pueden ser estructurales o

FIGURA 5

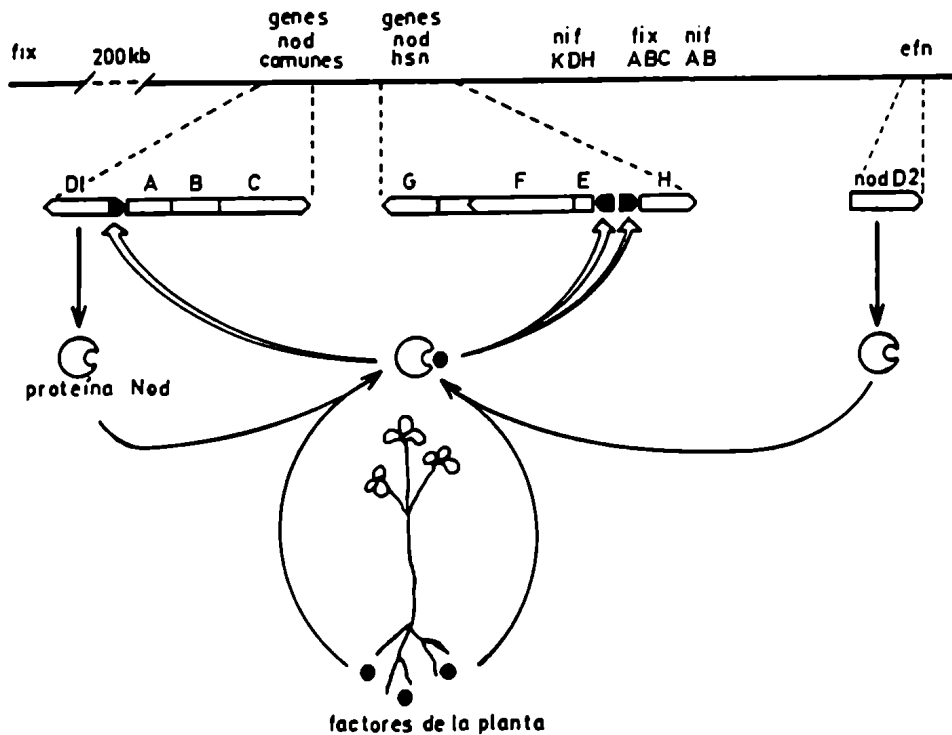


Figura 5: ORGANIZACION Y REGULACION DE LOS GENES "nod" EN *Rhizobium meliloti*.

En la parte superior se muestra un esquema de las regiones del plásmido *pSym* involucradas en la simbiosis.

nod, nodulación; *hsn*, especificidad de huésped; *nif*, fijación de nitrógeno, equivalente al sistema de *K. pneumoniae*; *fix*, fijación de nitrógeno; *efn*, otros genes no esenciales para la nodulación pero que incrementan su eficiencia.

Tomado de Kondorosi E. y Kondorosi A. (257).

inducibles. Todos ellos son activados por el producto del gen *nifA*, cuya transcripción es probablemente iniciada por una señal aún no identificada proveniente de la planta (112).

El gen regulador *nifA* actúa de manera semejante al gen homónimo del sistema de la nitrogenasa de *Klebsiella pneumoniae* (112).

1.4.3.2 Inductores e inhibidores

El análisis de extractos de raíces o de exudados de extractos de raíces de leguminosas, permitió identificar ciertos flavonoides, flavonas o flavononas que poseen actividad inductora de los genes *nod* (137,138) (Fig. 6).

Dichas moléculas son activadoras a concentraciones tan bajas como 200 nM (137). Algunos inductores muestran especificidad de especie; tal es el caso de la flavanona hesperitina, que es un potente inductor del sistema de genes *nod* en *Rhizobium leguminosarum* (139), pero relativamente ineficiente en el sistema de *Rhizobium meliloti* (137).

La diferencia en las respuestas de los genes *nod* frente a los distintos inductores puede de hecho determinar o contribuir a determinar la especificidad de huésped.

Asimismo, ciertos flavanoles e isoflavanoles, así como otros compuestos fenólicos inhiben severamente la transcripción de los genes *nodA,B,C* y *nodF,E* en *Rhizobium leguminosarum* (137).

FIGURA 6

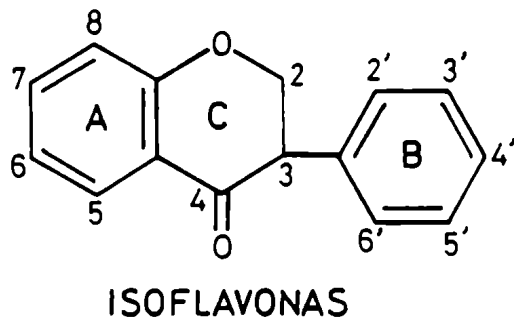
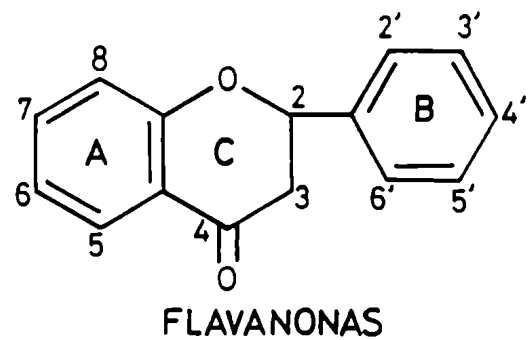
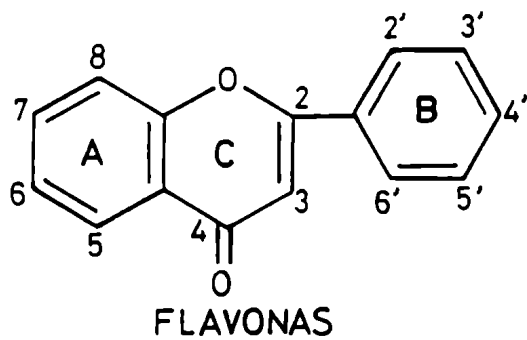


Figura 6: REPRESENTACION DE LAS ESTRUCTURAS COMUNES DE LOS FLAVONOIDES DESCRIPTOS EN EL TEXTO.

Para un tratamiento detallado véase el trabajo de Rolfe B. (258).

En el sistema de *Rhizobium trifolii*, una cumarina y un flavonoide están presentes en el exudado de raíces del huésped y se comportan como anti-inductores (140).

Parecería que las concentraciones de inductores y anti-inductores en la vecindad de la superficie de la raíz tiene importantes consecuencias en la regulación de la expresión de los genes *nod* y, por lo tanto, en el proceso de infección.

I.4.4 Genes involucrados en la síntesis del glucano beta,1→2 cíclicos

Los glucanos beta,1→2 cíclicos son homopolímeros de glucosa de pesos moleculares pequeños y ya fueron comentados (secciones I.1.3 y I.3.1). La participación de los glucanos cíclicos en la interacción con el huésped ha sido estudiada sobre todo en *Agrobacterias*, y más recientemente en *Rhizobium meliloti*.

En el sistema de *Agrobacterium tumefaciens* fueron detectadas tres regiones asociadas a virulencia: *chvA*, *chvB* (*chv*: del inglés "chromosomal virulence") y *exo C*. A diferencia de lo que ocurre con los genes *nod*, la información genética para la síntesis de los glucanos cíclicos es cromosomal.

La región *chv B* es necesaria para la síntesis de glucanos cíclicos tanto *in vivo* (78) como *in vitro* (79). Cepas mutantes *chv B⁻* avirulentas son incapaces de sintetizar glucanos cíclicos.

El fenotipo original se recupera por complementación con DNA de la cepa salvaje (78).

En el sistema de *Rhizobium meliloti*, la región ndv B (ndv: del inglés "nodulation development") es homóloga a la región chv B de *Agrobacterium tumefaciens* (141). También fueron encontradas secuencias homólogas en *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium phaseoli* (141). Cepas mutantes en la región ndv B de *Rhizobium meliloti* son incapaces de sintetizar glucanos cíclicos y forman estructuras semejantes a nódulos que carecen de hilo de infección, no poseen bacteroides y no fijan nitrógeno (141).

I.4.5 Genes involucrados en la síntesis del EPS

A diferencia de los genes nod que se localizan en plásmidos, y de aquellos genes que codifican para la síntesis de los glucanos cíclicos que son cromosomales, los genes involucrados en el sistema de síntesis del EPS, como así también aquellos que participan de su regulación, se disponen tanto en el cromosoma como en plásmidos.

Así, por ejemplo, en *Rhizobium meliloti*, cuatro genes implicados en la síntesis del EPS se ubican en un megaplásmido diferente al Sym (genes exo A,B,E y F), mientras que otros dos genes del mismo sistema mapean en el cromosoma (genes exo C y D) (142).

Asimismo, con el sistema de *Rhizobium phaseoli*, Johnston y su grupo describen que cepas curadas de su plásmido Sym, retienen la capacidad de sintetizar EPS, y que una región de dicho plásmido es capaz de inhibir la síntesis del exopolisacárido. El gen responsable de esta función fue denominado gen "psi" (inhibición de síntesis de polisacárido). Dicho gen se localiza próximo a los genes nod y fix. Johnston y su grupo proponen que el gen "psi" reprime la expresión de los genes cromosomales "pss" (síntesis de polisacárido) en el estado de bacteroide (143). En *Rhizobium leguminosarum*, los mismos autores determinaron que la secuencia de DNA de la región "pss" codificaría para uno o quizás dos genes (253). Por lo menos uno de los productos de traducción del gen "pss" estimado por datos de secuencia tiene una región hidrofóbica aminoterminal, lo cual sugiere que dicha proteína estaría asociada a membrana (253).

Asimismo, dado que el producto del gen "psi" también posee una región aminoterminal extremadamente hidrofóbica (254), los autores mencionados consideran que los productos de dichos genes podrían interactuar físicamente (253).

Por otra parte, en *Rhizobium meliloti*, cepas mutantes Exo^- no producen enrulamiento del pelo radicular ni tampoco forman hilo de infección (116). El grupo de Rolfe describe una cepa Exo^- (*Rhizobium* ANU 280) que produce enrulamiento del pelo radicular e hilo de infección, pero los nódulos son incapaces de

fijar nitrógeno. Los mismos autores establecen que en dicha cepa existen cinco locus genéticamente ligados que se localizan en el cromosoma y codifican información para la síntesis del EPS (144).

I.5 LOS EXOPOLISACARIDOS DE RHIZOBIOS

Ninguna de las macromoléculas involucradas activamente en el establecimiento de la infección y nodulación ha sido aún definitivamente identificada. Como dijimos anteriormente, numerosos estudios implican a distintos polisacáridos producidos por Rhizobios, de los cuales los exopolisacáridos ocupan abundante espacio en la literatura (68,69,70,71,72,145,146).

Algunos estudios relacionan la cantidad de EPS producida por una cepa particular con la capacidad de infectar y nodular eficientemente el huésped apropiado (147,148,149,150).

Así, una cepa mutante que produzca solo un 5% respecto de la cepa salvaje es aún capaz de provocar una infección y nodulación eficaz (151). Sin embargo, un valor del 0,1% resulta insuficiente, y en tal caso se forman estructuras semejantes a nódulos pero incapaces de fijar nitrógeno (148).

Otro tipo de estudios establecen la participación de EPSs mediante la restauración del fenotipo infectivo por coinoculación de cepas Exo^- con EPS homólogo o fragmentos de EPS homólogo (152). Exopolisacáridos heterólogos no son capaces de corregir el fenotipo.

Rolfe y su grupo suponen que dicha especificidad puede indicar un rol activo de los EPSs en el reconocimiento. Dado que la acción de los EPSs depende de la secreción de enzimas por la

planta que degradarían el polímero a oligómeros (153,154,155), los autores mencionados consideran razonable suponer que el mecanismo de acción de los EPSs podría ser semejante al de las llamadas oligosacarinas. Estas últimas son homogluicanos de bajo peso molecular que se originan por clivaje enzimático de las paredes de ciertas plantas en las cuales inducen respuestas de crecimiento, diferenciación y resistencia a enfermedades (156).

Los exopolisacáridos producidos por diferentes especies de rhizobios son heteropolisacáridos complejos, cuyas estructuras pueden describirse en términos de unidades repetitivas de 7 a 11 restos glicosídicos, de los cuales los más comunes son los monosacáridos glucosa, galactosa y ácido glucurónico.

Habitualmente son ramificados y se encuentran sustituidos por restos no glicosídicos tales como grupos cetal-piruvato, acetilos y beta-hidroxibutirilos, entre otros.

Es importante destacar que diferentes especies de Rhizobios que nodulan distintos huéspedes pueden producir exopolisacáridos con la misma estructura de restos glicosídicos, e inversamente existen ejemplos en los que una misma especie produce diferentes EPSs (157,158,159,160,161,162).

Un esquema de lo antedicho se muestra en la Figura 7.

Se observa que los distintos EPSs tienen en común el tetrasacárido que constituye la cadena principal, en cuya composición

FIGURA 7

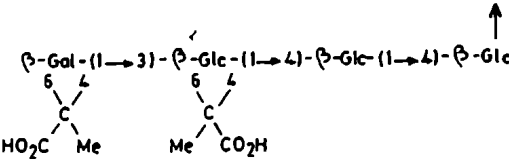
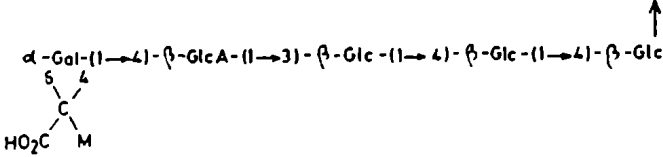
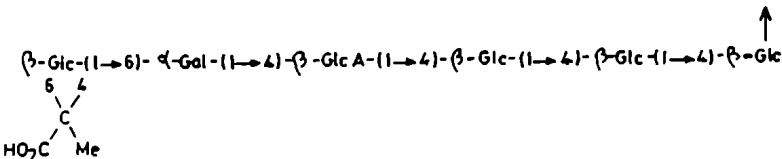
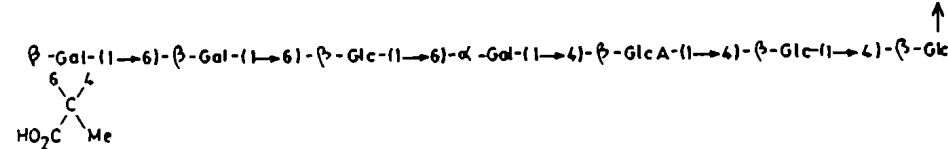
ESTRUCTURA	ESPECIES
<p>CADENA PRINCIPAL $\rightarrow 4)-\beta\text{-GlcA-(1}\rightarrow 4)-\beta\text{-GlcA-(1}\rightarrow 4)-\beta\text{-Glc-(1}\rightarrow 4)-\alpha\text{-Glc}_6$</p> <p style="text-align: right;">↑</p>	
<p>CADENAS LATERALES</p> <p style="text-align: center;"> $\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow 3)-\beta\text{-Glc-(1}\rightarrow 4)-\beta\text{-Glc-(1}\rightarrow 4)-\beta\text{-Glc}$  </p>	<p><i>R. phaseoli</i> 127K36 <i>R. phaseoli</i> LPR 49 <i>R. trifolii</i> NA30:0403 <i>R. trifolii</i> LPR 5 <i>R. leguminosarum</i> 128c53:128c63 <i>R. leguminosarum</i> LPR1</p>
<p>$\alpha\text{-Gal-(1}\rightarrow 4)-\beta\text{-GlcA-(1}\rightarrow 3)-\beta\text{-Glc-(1}\rightarrow 4)-\beta\text{-Glc-(1}\rightarrow 4)-\beta\text{-Glc}$</p> <p style="text-align: right;">↑</p> <p style="text-align: center;">  </p>	<p><i>R. phaseoli</i> 127K44</p>
<p>$\beta\text{-Glc-(1}\rightarrow 6)-\alpha\text{-Gal-(1}\rightarrow 4)-\beta\text{-GlcA-(1}\rightarrow 4)-\beta\text{-Glc-(1}\rightarrow 4)-\beta\text{-Glc-(1}\rightarrow 4)-\beta\text{-Glc}$</p> <p style="text-align: right;">↑</p> <p style="text-align: center;">  </p>	<p><i>R. phaseoli</i> 127K36</p>
<p>$\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow 6)-\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow 6)-\beta\text{-Glc-(1}\rightarrow 6)-\alpha\text{-Gal-(1}\rightarrow 4)-\beta\text{-GlcA-(1}\rightarrow 4)-\beta\text{-Glc-(1}\rightarrow 4)-\beta\text{-Glc}$</p> <p style="text-align: right;">↑</p> <p style="text-align: center;">  </p>	<p><i>R. phaseoli</i> 127K87</p>

Figura 7: ESTRUCTURA DE LAS UNIDADES REPETITIVAS DE LOS EXOPOLISACARIDOS PRODUCIDOS POR DISTINTAS ESPECIES DE RHIZOBIOS

Tomado de Albersheim P. y colaboradores (259). No se incluyen los restos O-acetilos ni otros sustituyentes acilos.

intervienen dos restos de ácido glucurónico y dos restos de glucosa.

Los hechos mencionados más arriba indicarían que la estructura glicosídica de los distintos EPSs no participaría en el proceso que determina la especificidad de huésped e infección. Sin embargo, es necesario puntualizar que los esquemas mostrados (Figura 7) no representan las estructuras completas de esos EPSs, dado que como dijimos, están además sustituidos por otros restos no glicosídicos. La identidad, posición y frecuencia de dichos sustituyentes no es fácil de determinar y se tienen indicios de que dichos grupos podrían jugar un papel importante en la selectividad de huésped. Así, se sabe que restos acilos forman parte de algunos antígenos capsulares de polisacáridos bacterianos (163).

En lo que respecta específicamente a los EPS de rhizobios, de acuerdo con un trabajo reciente debido a Leigh y colaboradores, la succinilación del EPS determina la formación y la invasión de nódulos efectivos por *Rhizobium meliloti* (164).

Asimismo, en el sistema de *Rhizobium trifolii*, el grado de acetilación del EPS está implicado en una nodulación eficaz. La cepa BART A que posee tres restos acetilos por unidad repetitiva es incapaz de nodular (165), mientras que la cepa NA-30 que posee solo uno nodula normalmente (157). Por lo que se conoce hasta el presente, los EPSs producidos por ambas cepas solo difieren en el grado de acetilación.

Todo indica que las propiedades de los polisacáridos complejos, tal el caso de los exopolisacáridos de Rhizobios, están definidas por su estructura, la cual queda determinada en el momento de su biosíntesis.

Veamos entonces cuál es la evolución y el estado actual de los conocimientos respecto a este último punto.

I.6 SINTESIS DE POLISACARIDOS COMPLEJOS

I.6.1 El antígeno-0 de Salmonella

Los primeros estudios vinculados a la biosíntesis de polisacáridos complejos de bacterias deben remitirse a los trabajos de Nikaido sobre la síntesis del lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella typhimurium* (255). Otro avance importante se hizo al investigar al polisacárido que constituye el antígeno-0 de *Salmonella newington*. En este caso, la unidad repetitiva de dicho polisacárido tiene la estructura que se muestra en la Figura 8:

Figura 8



El antígeno-0 conjuntamente con el "core" y el "Lípido A" constituyen el LPS (166).

La década que media entre 1960 y 1970 fue muy productiva en cuanto a los estudios que permitieron aclarar la biosíntesis de la estructura que se muestra, y otras similares.

En el año 1964, Robbins y colaboradores comunicaron la síntesis enzimática "in vitro" del Antígeno-0 en *Salmonella anatum* a partir de nucleótido-azúcares precursores (167). Un año más tarde, los laboratorios de Horecker y de Nikaido informaron de manera independiente la síntesis enzimática del polisacárido que

constituye el Antígeno-0, utilizando cepas de *Salmonella typhimurium* deficientes en GDP-Man (168) o carentes de TDP-Ram (169). No obstante el progreso que estos estudios significaron, ninguna de las reacciones intermediarias había sido establecida.

1.6.2 Lípido intermediarios en la síntesis del antígeno-0

A mediados de 1965, el grupo de Robbins comunicó que en la síntesis del antígeno-0 de *Salmonella newington*, los azúcares son transferidos desde los nucleótido-azúcares precursores a un aceptor lipídico ("ACL") antes de su incorporación al LPS (170). En el mismo volumen de aquella publicación, el grupo de Horecker informaba sobre un hallazgo similar en *Salmonella typhimurium* (171).

Un hecho novedoso fue que los oligosacáridos estaban unidos al aceptor lipídico mediante fosfato. La estructura del lípido fue establecida luego de su aislamiento y purificación por el grupo de Robbins: se trataba de undecaprenol, un poliprenol formado por once unidades de isopreno. Cada unidad de isopreno posee una doble ligadura. Un esquema del lípido se muestra en la Figura 9.

En *Salmonella newington*, un puente pirofosfato une la galactosa del extremo reductor al lípido (170). En la Figura 10 se representa la síntesis de la unidad repetitiva del Antígeno-0 en dicho sistema (170).

El paso siguiente constituye la polimerización de las unidades repetitivas. La dirección de crecimiento de las cadenas durante la polimerización fue aclarada por el grupo de Robbins (172). Como se muestra (Figura 11), la cadena en crecimiento es siempre agregada a una unidad repetitiva unida al poliprenol. De este modo, la elongación ocurre por el extremo reductor de la cadena en crecimiento.

FIGURA 11

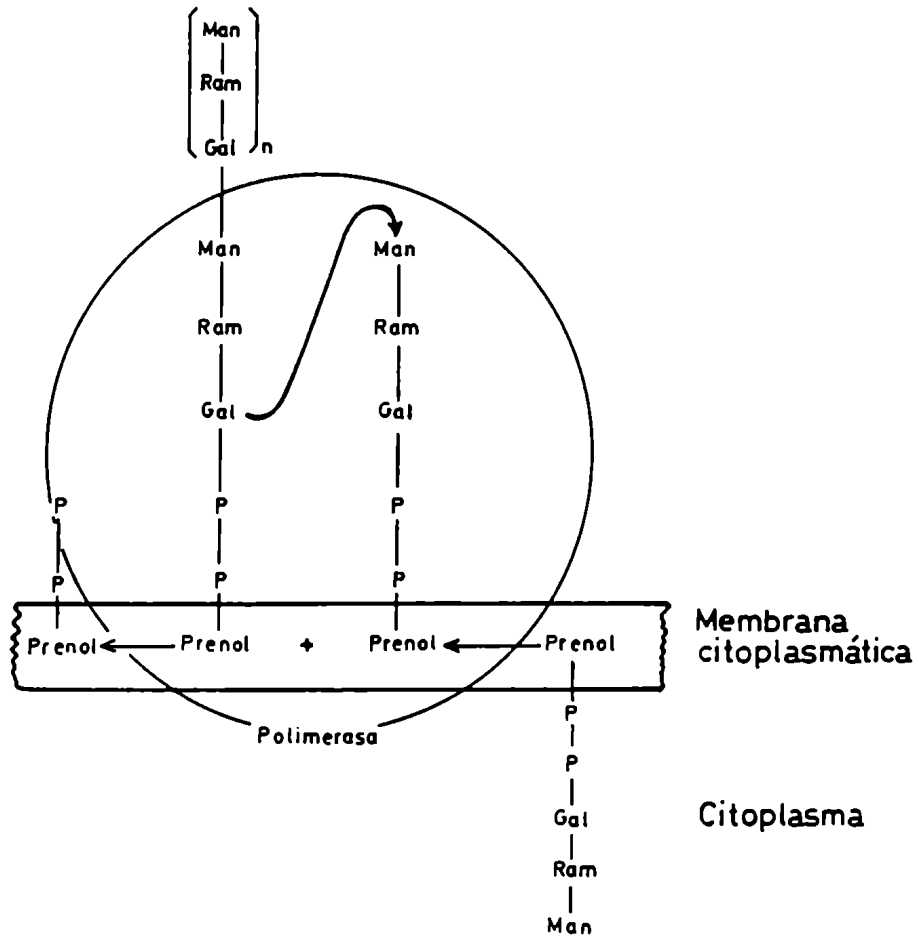


Figura 11: MECANISMO DE POLIMERIZACION DEL POLISACARIDO-O EN *Salmonella anatum*.

Tomado de Tipper D.J. y Wright A. (1973).

1.6.3 Lípido intermediarios descriptos en bacterias

Los prenil-fosfo-azúcares hallados en procariotes son variados y pueden agruparse atendiendo a su complejidad, contenido de fosfato o tipo de caracterización. En la Tabla II se mencionan solo algunos ejemplos. No todos han sido estudiados con igual detalle ni con las mismas técnicas, por lo cual la letra que figura al lado de cada compuesto significa lo siguiente:

- a) Lípidos que fueron identificados como prenoles por estudios de espectrometría de masas.
- b) Lípidos que han sido identificados como prenoles atendiendo a que su formación se activa por el agregado de P-prenol exógeno.
- c) Compuestos que tienen las propiedades químicas de los prenil-fosfo-azúcares, pero cuya fracción lipídica no ha sido estudiada con mayor detalle.

Los prenil-fosfo-azúcares de *Rhizobium trifolii* que se describen en esta tesis se caracterizarán de acuerdo con los criterios que definen al grupo c).

TABLA II

ALGUNOS LÍPIDO-FOSFO-AZUCARES DESCRIPTOS EN PROCARIOTES

Lípido	Fuente	Referencia
Man-P	Micococcus lysodeikticus a)	(174)
	Micobacterium tuberculosis a)	(175)
Glc-P	Salmonella a)	(176)
	Shigella flexneri b)	(177)
	Halobacterium salinarum c)	(178)
NacGlc-P	Streptococcus sanguis c)	(179)
NAcNeu-P	Escherichia coli a)	(180)
Maltosa-PP	Acetobacter xylinum c)	(181)
(Man)P δ PP	Mycobacterium smegmatis a)	(182)
NAcManUA-NAcGlc-P	Micrococcus lysodeikticus c)	(183)
Abe-Man-Ram-Gal-PP	Salmonella typhimurium c)	(184)
NAcGlc-Pentapéptido-PP	Micrococcus luteus c)	(185)
	Staphylococcus aureus c)	(185)
NAcGlc-NAcMur-pentapéptido-PP	Micrococcus luteus c)	(185)
	Staphylococcus aureus c)	(185)
	Escherichia coli c)	(185)
Ram-(Glc) ₂ -GlcA-Man-(Glc) ₂ -PP	Acetobacter xylinum c)	(186)
Man-GlcA-Man-Cel-PP	Xanthomonas campestris c)	(196)
(Glc) ₇ -Gal-PP	Rhizobium meliloti c)	(210)

II.0 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

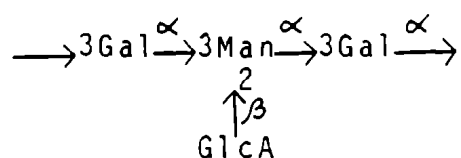
La biosíntesis de exopolisacáridos complejos ha sido aclarada solamente en dos sistemas: el polisacárido capsular de *Aerobacter aerogenes*, por el grupo de Heath (190) y, en nuestro laboratorio, el xantano, exopolisacárido producido y secretado por *Xanthomonas campestris* (64,196).

Fue establecido que en las etapas intermedias de biosíntesis participan prenil-fosfo-azúcares como precursores inmediatos.

En el primer caso, la porción lipídica fue caracterizada como undecaprenol mediante estudios de espectrometría de masas. En el caso del xantano, en forma indirecta de acuerdo a los criterios que definen al grupo c) de la Tabla II.

II.1 EL POLISACARIDO CAPSULAR DE *AEROBACTER aerogenes*

Aerobacter aerogenes (sinonimia: *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter aerogenes*, ref. 218) produce un polisacárido capsular (CPS), cuya unidad repetitiva está constituida por el tetrasacárido que se muestra a continuación:



El grupo de Heath utilizó como sistema de síntesis un preparado enzimático consistente en membranas de *Aerobacter aerogenes*. Las cepas elegidas eran mutantes en UDP-Gal-4'-epimerasa o GDP-Man pirofosforilasa. De este modo, el autor mencionado partía de mezclas de incubación que contenían preparados enzimáticos libres de aceptores lipídicos glicosilados (190).

Dichos preparados enzimáticos catalizaban la incorporación secuencial de los monosacáridos Gal, Man, GlcA y Gal (en ese orden) desde sus respectivos nucleótido-azúcares hacia la fracciones lipídica (prenil-fosfo-azúcares) o acuosa (CPS).

Mediante estudios cinéticos de transferencia de (^{14}C)Gal a partir de UDP(^{14}C)Gal a ambas fracciones, se demostró que los prenil-fosfo-azúcares aislados en la fracción lipídica son precursores de CPS.

Los preparados enzimáticos tratados con solventes orgánicos a baja temperatura, perdían lípidos endógenos y ya no eran capaces de sintetizar el CPS, cuando fueron utilizados para tal fin. Dicha capacidad era recuperada por el agregado de undecaprenol-fosfato exógeno (190).

El CPS sintetizado in vitro resultó idéntico al nativo por los criterios empleados (189,190).

II.2 EL XANTANO

El xantano es un exopolisacárido ácido producido y secretado por la bacteria Gram negativa *Xanthomonas campestris*, que ya fue comentado (sección I.1.2.2.1).

Hasta el presente, constituye el único caso de un EPS liberado al medio de cultivo del cual pudo lograrse su biosíntesis *in vitro* (64,196).

El preparado enzimático utilizado fue diferente al del caso del CPS de *Aerobacter aerogenes*. Esta vez consistió en bacterias permeabilizadas con EDTA/TRIS congeladas y descongeladas a fin de permitir el ingreso a la célula de nucleótido-azúcares agregados a la mezcla de incubación.

La primera mención del efecto del EDTA sobre bacterias se debe a Repaske en la década que media entre los años 1950 y 1960. Dicho autor utilizaba lisozima y EDTA en buffer TRIS para convertir bacterias Gram negativas en esferoplastos (192). Posteriormente, el grupo de Robbins utilizó bacterias permeabilizadas con EDTA/TRIS congeladas y descongeladas como sistema de ensayo para el estudio de la síntesis del Antígeno-O de *Salmonella* (219).

En el año 1965, Leive demostró que el tratamiento de *E. coli* con EDTA/TRIS libera el 50% del LPS y paralelamente permeabiliza a la célula frente a compuestos hidrofóbicos (193).

Hoy se sabe que el EDTA y otros quelantes secuestran iones divalentes que mantienen unidas a las moléculas de LPS en la membrana externa (para un tratamiento detallado del tema, véase ref. 195).

Las células permeabilizadas con EDTA/TRIS son menos resistentes al tratamiento de congelamiento y fractura. Dicho efecto puede visualizarse procediendo de tal modo y observando posteriormente al microscopio electrónico (194).

En nuestro laboratorio también se empleó dicha técnica de permeabilizar bacterias con el objeto de estudiar la biosíntesis de exopolisacáridos por *Acetobacter xylinum* (191). Los resultados con dicho sistema serán comentados más adelante (sección II.3).

Con *Xanthomonas campestris*, utilizando células permeabilizadas con EDTA/TRIS congeladas y descongeladas, fue posible lograr la biosíntesis in vitro del xantano. El preparado enzimático fue incubado en presencia de nucleótido-azúcares exógenos fríos y radioactivos (64,196).

La transferencia de radioactividad a la fase acuosa (EPS) pudo optimizarse en incubaciones realizadas a una temperatura de 20°C, en presencia de los tres nucleótido-azúcares adecuados (uno de ellos radioactivo), es decir: UDP-Glc, GDP-Man y UDP-GlcA (64,196). La ausencia de alguno de los precursores o bien la disminución de la temperatura de incubación resultaron en la per-

manencia del grueso de la radioactividad en la fase orgánica (prenil-fosfo-azúcares) (196). En incubaciones realizadas a baja temperatura (12°C), las condiciones de incubación pudieron aún modificarse por el agregado u omisión de los diferentes nucleótido-azúcares fríos y/o radioactivos. De esta manera fue posible preparar prenil-fosfo-azúcares de diferente complejidad y demostrar la biosíntesis secuencial de la unidad repetitiva unida a lípido (64). Debe destacarse que la primera reacción consiste en la transferencia de Glc-1-P a un lípido-P endógeno (Fig. 12), recreando la unión difosfato presente en el nucleótido-azúcar dador.

Asimismo, en lo que respecta a la entrada de sustituyentes no glicosídicos (piruvato y acetato), en el año 1977 Sutherland propuso que muy probablemente el dador de piruvato fuera el PEP (213). Algunos años más tarde, trabajando en nuestro laboratorio con *Xanthomonas campestris*, se demostró el presupuesto de Sutherland y se estableció además que en dicho sistema la piruvilación ocurre a nivel de prenil-fosfo-azúcares: el único modo de obtener in vitro xantano piruvilado consistió en lograr previamente la síntesis de la unidad repetitiva piruvilada unida a lípido (221).

En lo que concierne a la acetilación, el grupo de Robbins estableció en el año 1964 que en la síntesis del LPS de *Salmonella*, el dador de acetilo es Acetil-CoA, aunque sin aclarar

a qué nivel ocurría la entrada de dicho sustituyente (215). En lo que respecta a la acetilación de exopolisacáridos, la misma ha sido demostrada únicamente para el caso del EPS de *Xanthomonas campestris*. En nuestro laboratorio, utilizando células de *Xanthomonas campestris* permeabilizadas con EDTA/TRIS congeladas y descongeladas, se logró transferir radioactividad proveniente de (^{14}C)Acetil-CoA a oligosacáridos unidos a lípido y a polisacárido (216). Es decir, que en este sistema la acetilación ocurre a nivel de prenil-fosfo-azúcares.

Como dijimos previamente, el xantano constituye el primer EPS del cual se demostró la síntesis secuencial de la unidad repetitiva seguida de su polimerización. La Figura 12 muestra un esquema de la síntesis del xantano.

FIGURA 12

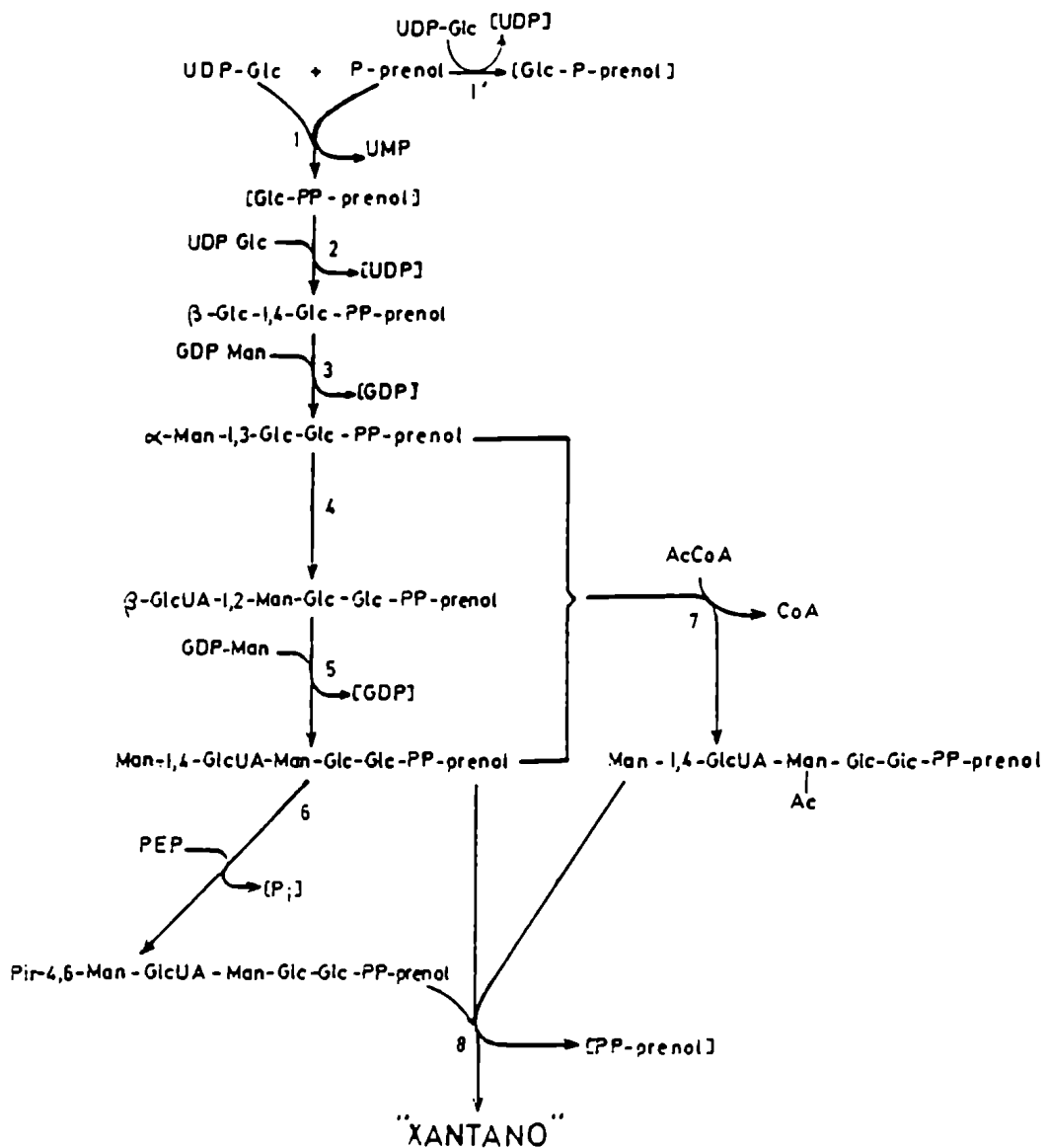


Figura 12: SINTESIS DEL XANTANO

Tomado de Ielpi L. (64)

II.3 EL ACETANO

Acetobacter xylinum es una bacteria Gram negativa de metabolismo aerobio (198). Se caracteriza por la producción de celulosa, la cual es secretada al exterior de la célula (222).

Produce, además, un exopolisacárido ácido, el cual fue aislado (199) y caracterizado (200) en nuestro laboratorio. Ambos polisacáridos forman una estructura de flotación denominada "zooglea", la cual mantiene a las bacterias en superficie.

El exopolisacárido ácido ha sido denominado "acetano" (200), y ya fue comentado previamente (sección I.1.2.2.1). Como dijimos en el punto anterior, en nuestro laboratorio fueron utilizadas células permeabilizadas con EDTA/TRIS congeladas y descongeladas con el objeto de estudiar la síntesis de exopolisacáridos por Acetobacter xylinum.

Mediante el empleo de dicho sistema de síntesis, fue posible preparar los prenil-fosfo-azúcares que se detallan a continuación:

- 1) Glc-PP-prenol (201)
- 2) Cel-PP-prenol (201) (Cel: celobiosa)
- 3) Gal-P-prenol (201)
- 4) Man-P-prenol (202)
- 5) $\text{Man} \xrightarrow{\alpha} 3\text{Cel-PP-prenol}$ (202)
- 6) $\text{GlcA} \xrightarrow{\beta} 6\text{Man} \xrightarrow{\alpha} 3\text{Cel-PP-prenol}$ (203)

- 7) $\text{Glc}^{\alpha} \rightarrow 4\text{GlcA}^{\beta} \rightarrow 6\text{Man}^{\alpha} \rightarrow 3\text{Cel-PP-prenol}$ (203)
- 8) $\text{Glc}^{\beta} \rightarrow 6\text{Glc}^{\alpha} \rightarrow 4\text{GlcA}^{\beta} \rightarrow 6\text{Man}^{\alpha} \rightarrow 3\text{Cel-PP-prenol}$ (203)
- 9) $\text{Rha} \rightarrow 6\text{Glc}^{\beta} \rightarrow 6\text{Glc}^{\alpha} \rightarrow 4\text{GlcA}^{\beta} \rightarrow 6\text{Man}^{\alpha} \rightarrow 3\text{Cel-PP-prenol}$ (26,203,204)
- 10) GlcA-lípido (203,223)

A excepción de los compuestos 3), 4) y 10), el resto forma una serie del mismo origen y complejidad creciente, cuyo producto final unido a lípido es el heptasacárido 9).

La composición de azúcares y los productos de degradación parcial de dicho heptasacárido son idénticos a los de la unidad repetitiva del acetano (200). Asimismo, si bien no todas las cepas estudiadas de *Acetobacter* producen acetano, existe considerable evidencia de una correlación directa entre la producción del mismo y la síntesis in vitro del heptasacárido-PP-prenol (205), reforzando la idea del rol de precursor que se tiene de este último.

Resultados preliminares logrados en nuestro laboratorio permitieron establecer que, en el sistema de síntesis del acetano, la acetilación ocurre a nivel de prenil-fosfo-azúcares y que el dador es Acetil-CoA (220). La participación de lípido-intermediarios en el sistema de síntesis del acetano constituye el primer estudio que involucra a prenil-fosfo-azúcares en la síntesis de exopolisacáridos (202,203,204).

La Figura 13 muestra el esquema propuesto para la síntesis secuencial del heptasacárido-PP-prenol (líneas llenas) y su pro-

bable polimerización (línea punteada). También en este caso la secuencia se inicia con la transferencia de Glc-1-P a un P-prenol endógeno (Figura 13, reacción 1).

FIGURA 13

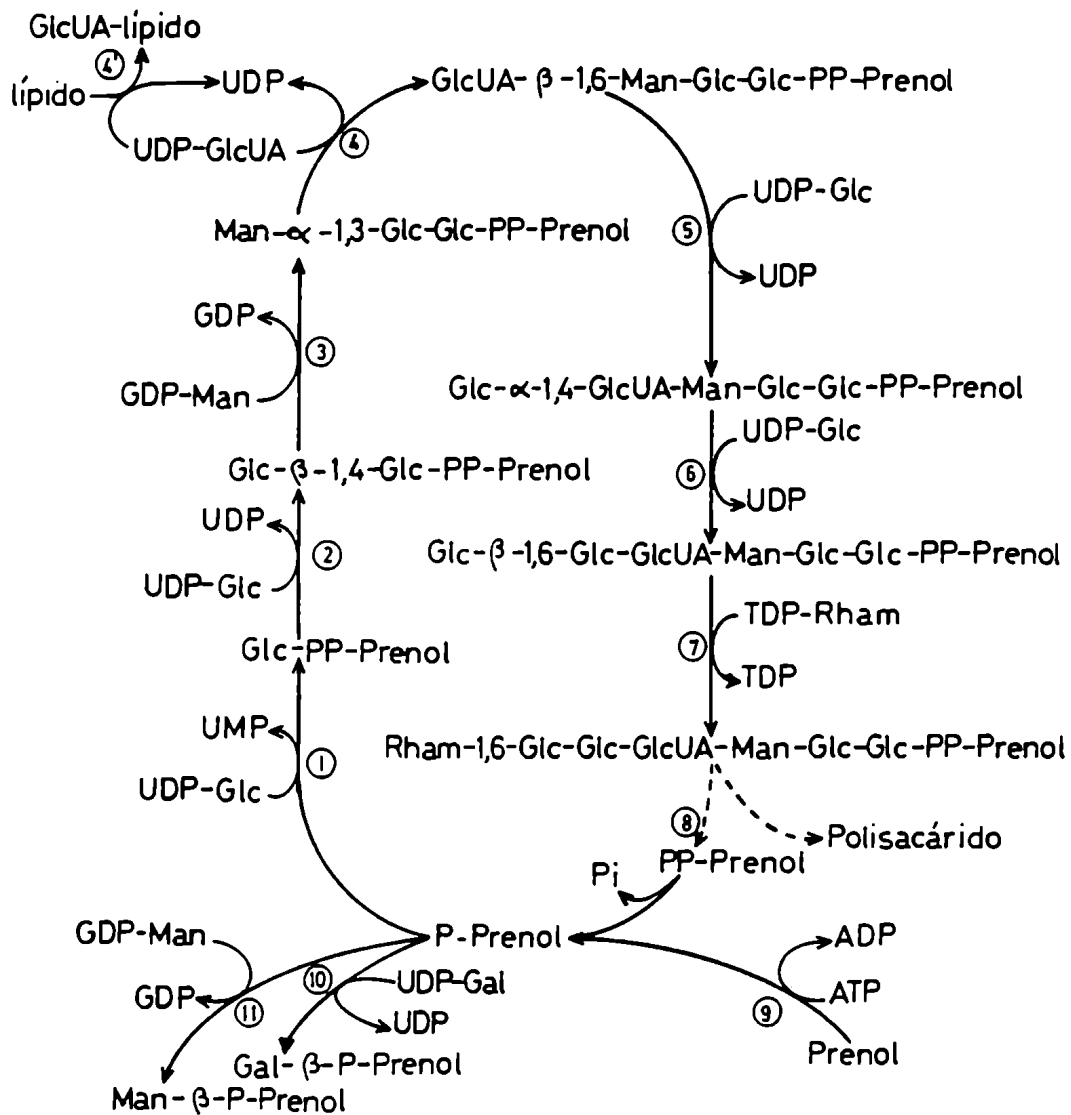


Figura 13: PROBABLES REACCIONES INTERMEDIARIAS EN LA SINTESIS DEL ACETANO

Tomado de Couso R. (26,203)

II.4 EL EXOPOLISACARIDO DE RHIZOBIUM meliloti

Los exopolisacáridos complejos producidos por *Rhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium radiobacter* y *Alcaligenes faecalis* variedad *myxogenes*, tienen todos ellos una misma estructura de azúcares. Sin embargo, los exopolisacáridos no son idénticos, ya que difieren en el tipo de sustituyentes no glicosídicos (206).

Así, todos los EPSs de las bacterias nombradas están compuestos por D-glucosa, D-galactosa y ácido pirúvico en una relación 7:1:1, pero mientras en *Rhizobium meliloti* existe un resto acetilo en posición aún no definida y grupo(s) succinilo(s), los EPSs restantes poseen sustituyentes succinilos pero carecen de acetilos (207).

La Figura 14 muestra un esquema de la unidad repetitiva del EPS de *Rhizobium meliloti*.

Tolmasky M. y colaboradores describieron la participación de prenil-fosfo-azúcares en el sistema de síntesis del EPS de *Rhizobium meliloti*. Dichos autores aislaron y caracterizaron los compuestos que se detallan a continuación:

- 1) Gal-PP-prenol (209)
- 2) $\text{Glc} \xrightarrow{\beta} 3\text{Gal-PP-prenol}$ (209)
- 3) Pir-octasacárido-PP-prenol (210)
- 4) Pir-acetil-octasacárido-PP-prenol (210)

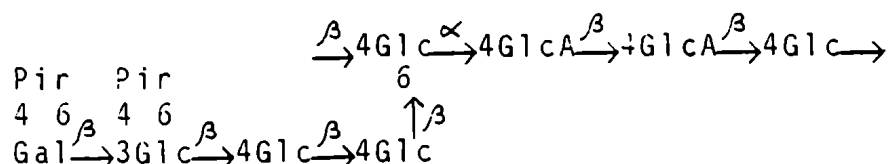
lo cual refuerza la idea que se tiene del rol de precursor de la unidad repetitiva unida a lípido (210). No se logró la síntesis del polímero in vitro.

En lo que respecta a la entrada de sustituyentes no glicosídicos, Tolmasky M y colaboradores demostraron que en el sistema de síntesis del EPS de *Rhizobium meliloti* el compuesto dador de piruvato es el PEP y que la piruvilación en este sistema también ocurre a nivel de lípido-intermediarios (208). Asimismo, dichos autores encontraron evidencias de que en el sistema mencionado, la acetilación ocurriría también a nivel de prenil-fosfo-azúcares, aunque no lograron marcar dichos compuestos con radioactividad proveniente de (^{14}C)Acetil-CoA (208).

II.5 OBJETIVOS DE ESTA TESIS

A pesar del interés que despiertan los EPSs de rhizobios, aún no ha sido aclarada la biosíntesis de ninguno de ellos. Los únicos sistemas estudiados hasta el presente son los de *Rhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* (210,217). Dichas bacterias producen EPSs con idéntica estructura de restos glicosídicos, pero difieren en el tipo de sustituyentes que presentan. Asimismo, las bacterias mencionadas interactúan con huéspedes diferentes. En ambos casos, se ha descrito la síntesis in vitro del oligosacárido que constituye la unidad repetitiva unida a un lípido, probablemente un prenil. Nada se sabe del proceso de polimerización.

Rhizobium trifolii infecta tanto el trébol blanco (*Trifolium repens*) como el rojo (*Trifolium pratensis*). El huésped constituye uno de los componentes más conspicuos de las praderas bonaerenses y, dado el valor agronómico de esta forrajera, pareció de interés estudiar el sistema. Distintas cepas de *Rhizobium trifolii* son productoras de EPSs, a uno de los cuales el grupo de Albersheim le ha asignado la siguiente estructura (157):



Los mismos autores describen también la existencia de un grupo acetilo cuya posición no definen.

Dados los antecedentes que se detallan en el punto anterior, los objetivos de esta Tesis consistieron en:

- 1) Investigar la síntesis in vitro del EPS de *Rhizobium trifolii*.
- 2) Investigar la posible participación de intermediarios lipídicos en dicho proceso.
- 3) Estudiar la síntesis y la estructura de los intermediarios aislados.
- 4) Estudiar la incorporación de los sustituyentes no glicosídicos (acetato y cetal-piruvato).
- 5) Estudiar la existencia de mecanismos de síntesis análogos en otras cepas de *Rhizobium trifolii* o de *Rhizobium leguminosarum* que producen el mismo EPS, en lo que respecta solamente a su estructura glicosídica.

III.0 MATERIALES Y METODOS

III.1 CEPAS EMPLEADAS

Las cepas utilizadas fueron:

Rhizobium trifolii NA-30

Rhizobium trifolii ATCC 14479

Rhizobium leguminosarum 128-C-53

Rhizobium leguminosarum 128-C-63

En el caso de Rhizobium trifolii cepa ATCC 14479, los cultivos en placa produjeron siempre una población de colonias de tamaño heterogéneo (ver sección III.1.5).

III.1.1 Medio de cultivo

En todos los casos, el medio utilizado fue el descrito por Robertsen y col. (157), el cual contiene:

	gr/lit	mg/lit
Manitol	10	
Acido glutámico	1.1	
Cloruro de sodio		50
*Cloruro de calcio dihidratado		50
Fosfato monopotásico		300
Fosfato disódico		300

	mg./lt.
*Cloruro férrico	6
Biotina	0.2
Pantotenato de calcio	0.1
Clorhidrato de tiamina	0.1
*Sulfato de magnesio heptahidratado	150

El medio se esterilizó en autoclave durante 15 minutos.

Las soluciones de los compuestos indicados con asteriscos se esterilizaron por separado y se agregaron estérilmente luego de enfriadas.

El medio sólido se preparó con el agregado de agar (Bacto) en una concentración final de 1.5% (p/v).

III.1.2 Condiciones de crecimiento y obtención de células

Los cultivos se realizaron con agitación a 200 rpm y a una temperatura de 28° C. Se utilizaron frascos Erlenmeyer de 2 litros de capacidad con 400 ml de medio de cultivo. Las siembras se realizaron utilizando 40 ml de cultivos de fase exponencial.

En el momento de cosechar los cultivos (48-72 hs, dependiendo de la cepa; longitud de onda: 650 nm; densidad óptica: 0.900; fase exponencial tardía) se realizaron controles de pureza de los mismos por siembra de placas de Petri que contenían medio

sólido. Los cultivos líquidos fueron centrifugados a $6.100 \times g$ durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó como fuente de polisacáridos (ver sección III.2). El precipitado se resuspendió en el mínimo volumen de buffer 0.01 M fosfato-citrato pH: 6 ó indistintamente en medio de cultivo estéril, y se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 5 minutos. Esta operación de lavado se repitió dos veces más. En el precipitado final pudo observarse la presencia de dos capas: una de color anaranjado en el fondo del tubo, y otra superior blanquecina y menos compacta.

III.1.3 Preparación de enzimas

Las bacterias lavadas se sometieron a fricción mecánica aspirando y expulsando con fuerza el material con una pipeta de punta delgada. Esta operación se repitió 40 a 50 veces a una temperatura no mayor de 4°C y tuvo por objeto remover la cápsula de las células.

El material se lavó 2 a 3 veces hasta la desaparición de la capa superior blanquecina, con buffer 0,01 M fosfato-citrato (pH: 6), o indistintamente con medio de cultivo estéril. El precipitado se suspendió finalmente en buffer 0,01 M EDTA-Tris-pH:8 en una proporción de 2,5 ml de buffer por litro de medio de cultivo, se homogeneizó con pipeta y luego se congeló a -20°C (201).

Las células permeabilizadas se descongelaron y se volvieron a lavar dos veces con dos volúmenes de buffer 0,01 M EDTA-Tris-pH:8. Luego se resuspendieron en un volumen del mismo buffer. A este material se lo denominó "preparado enzimático" y guardado a -20°C su actividad se conservó aún después de varios meses.

Con algunos preparados enzimáticos se observó que la actividad aumentaba si se congelaba el material con nitrógeno líquido (6 a 8 veces). Cuando se realizó esta operación, posteriormente las células fueron lavadas con buffer 0,01 M EDTA-Tris pH:8 y mantenidas a -20°C.

III.1.4 Diálisis de los preparados enzimáticos

El preparado enzimático fue diluido con 2 volúmenes de buffer Tris 50 mM-EDTA 10 mM-pH:8.2, helado. Posteriormente la suspensión de células permeabilizadas se introdujo en una bolsa de diálisis, que previamente fue hervida durante 10 min en una solución acuosa de EDTA 10 mM. Pasado dicho período se introdujo la bolsa de diálisis en cámara fría (4°C), y luego se cargó con el material a dializar. Esta operación y las siguientes fueron realizadas en el interior de la cámara fría.

La diálisis se desarrolló contra 6 litros de buffer cuya composición fue la siguiente:

TRIS-BASE (TRIZMA)	50 mM
EDTA ácido	10 mM
MSH	10 mM
pH:7.5	

Se llevó al valor de pH mediante el agregado de ClH concentrado (aproximadamente 2 ml para 6 litros de buffer). El buffer se dejó enfriar antes de introducir la bolsa de diálisis que contenía el preparado enzimático. El MSH se agregó al final y el frasco de Erlenmeyer (de 6 litros de capacidad) se tapó con "parafilm".

El frasco de diálisis se introdujo en un recipiente que contenía hielo granizado en cantidad suficiente para cubrirlo hasta las 3/4 partes. Se dejó dializando durante 12 horas con agitación magnética.

Transcurrido este período, el contenido de la bolsa de diálisis fue centrifugado a 12.000 x g durante 5 min y a una temperatura no mayor de 4° C. Posteriormente, el precipitado de células permeabilizadas y dializadas fue homogeneizado con pipeta de punta delgada en buffer 0.01 M EDTA-Tris-pH:8, en una proporción de 2,5 ml de buffer por litro de medio de cultivo. El material se guardó a -20° C. A este último preparado se hace referencia en el texto cuando se menciona a los "preparados enzimáticos dializados".

III.1.5 Mantenimiento de las cepas

Muestras procedentes de cada cepa fueron sembradas en cultivos líquidos, y cuando éstos estuvieron en fase exponencial se tomaron alícuotas de cada uno, las cuales fueron mantenidas en glicerol 10% a -70°C .

Para el caso de las cepas *R. trifolii* NA-30 y *R. trifolii* ATCC 14479, las bacterias fueron mantenidas además por liofilización, empleando el procedimiento siguiente, en el cual todas las operaciones fueron realizadas en forma estéril.

Cultivos de fase exponencial se utilizaron para inocular cajas de Petri que contenían medio sólido. Estas fueron incubadas a 28°C . A las 48 horas (para el caso de la cepa NA-30 ó 72 horas para la cepa ATCC 14479) se observó la existencia de una población heterogénea, mezcla de colonias grandes y pequeñas (G y P).

De manera independiente para cada cepa, se inocularon colonias "G" en frascos de Erlenmeyer de 200 mililitros de capacidad que contenían 40 ml de medio de cultivo. Se dejó desarrollar hasta fase exponencial; se sembraron nuevamente cápsulas de Petri que contenían medio sólido y la totalidad del cultivo fue utilizado para inocular frascos de Erlenmeyer de 2.000 ml que contenían 400 ml de medio de cultivo.

Los cultivos en medio sólido dieron colonias "G" para el caso de la cepa NA-30 y colonias "G" y "P" para la cepa ATCC 14479.

Los cultivos en medio líquido se dejaron desarrollar hasta fase exponencial y las células fueron centrifugadas a 9.000 x g durante 10 minutos a una temperatura de 4°C.

Las células fueron lavadas con tres o cuatro volúmenes de leche descremada y centrifugadas nuevamente a 9.000 x g durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. El precipitado se resuspendió en el menor volumen posible de leche descremada y se transfirió 0,2 ml de esta suspensión a tubos de 13 x 100 mm con tapón de algodón.

El contenido fue liofilizado, y los tubos fueron cerrados al vacío a la llama. Finalmente se guardaron a -20°C (224).

Preparación de la leche descremada: A 40 gramos de leche descremada comercial se agregaron 200 ml de agua bidestilada caliente. Se agitó con agitador magnético y se filtró a través de tela para quesos. Se cargaron en tubos de ensayo alícuotas de 6 ml y se autoclavó exactamente 15 minutos a 115°C (224).

III.1.6 Ensayo de nodulación

Se utilizó como soporte medio Crone (225). Como huésped se utilizó en todos los casos *Trifolium repens* y *Trifolium pratensis*. Las semillas del huésped fueron esterilizadas como describen Handelsman y col. (226). Las semillas fueron sumergidas en H₂SO₄ cc. helado en un frasco de Erlenmeyer parcialmente cubierto por hielo granizado. Luego de 1 minuto, se separó el ácido y se lavaron las semillas repetidamente con agua bidestilada helada estéril. Finalmente se transfirieron las mismas a frascos de Erlenmeyer de 200 cm³ de capacidad que contenían 40 ml de agua destilada estéril. Se incubaron las semillas durante una noche con agitación mecánica a 200 rpm. A las 3 horas de la incubación se realizó un cambio del agua con el objeto de separar sustancias pigmentadas (de color amarillo), probables inhibidores de la germinación.

Las semillas germinadas fueron puestas en contacto por un período de 20 minutos con la suspensión de bacterias cosechadas en fase exponencial (longitud de onda: 650 nm; densidad óptica: 0,600), y previamente lavadas con medio de Albersheim (157) carente de ácido glutámico. Finalmente las semillas fueron puestas sobre medio Crone contenido en tubos de 25 x 2 cm (20 ml de medio por tubo).

Se iluminó con tubos "Growth-lux" con ciclos de 14 horas de iluminación y 10 horas de oscuridad a temperatura ambiente. A partir de los 15 días se investigó la presencia de nódulos.

Composición del medio de Crone

A) Macronutrientes:

ClK	10,0 gr
SO ₄ Ca	2,5 gr
SO ₄ Mg	2,5 gr
(PO ₄) ₂ Ca ₃	2,5 gr
PO ₄ Fe	2,5 gr

Estas sales se trituraron en mortero y de la mezcla se agregó 5 gr por litro de medio.

B) Micronutrientes:

SO ₄ Zn . 7H ₂ O	5,4 gr
Cl ₂ Mn . 4H ₂ O	16,2 gr
BO ₃ H ₃	12,6 gr
SO ₄ Cu . 5H ₂ O	5,4 gr
SO ₄ Fe . 7H ₂ O	1,6 gr
Cl ₂ Co . 2H ₂ O	1,6 gr

Estas sales se trituraron en mortero y de la mezcla se agregó 2 mg por litro de medio.

Agar	8 gr/litro de medio
pH	6,5

El pH bajó a valores de 5,8 ó 6 luego de esterilizar. Se recuperó el pH indicado mediante el agregado de 100 ul de HONa 1 N por cada litro de medio.

III.2 OBTENCION DE POLISACÁRIDOS

El exopolisacárido se aisló y purificó a partir de sobrenadantes de cultivos de fase exponencial. Se siguió la técnica descrita por Slonecker y Jeanes (227).

A partir de sobrenadantes libres de células se obtuvo una fracción cruda de polisacáridos mediante una serie de precipitaciones (4 a 5) con alcohol 66% en presencia de ClK al 1% (p/v). El precipitado fue disuelto en agua, dializada contra agua destilada y liofilizado. En el material precipitado no se detectaron proteínas medidas por el método de Lowry (236).

El glucano producido por éstas y otras cepas de Rhizobium es precipitado por esta técnica a volúmenes de alcohol que varían entre 4 y 10 según los autores (228,229).

III.3 SISTEMA DE INCUBACION IN VITRO

III.3.1 Incubación estándar

Las incubaciones se realizaron en un medio que contenía 10.000 pmoles de buffer Tris-ClH pH 8.2, 1.200 pmoles de Cl_2Mg , los nucleótido-azúcares utilizados fueron $UDP(^{14}C)GlcA$ (1.000 pmoles) y $UDP-Glc$ (25.000 pmoles), salvo que se especifique otra cosa. La cantidad de proteína presente como preparado enzimático fue de 0,8 a 1,2 mg en un volumen final de 140 μ l.

La mezcla se incubó a la temperatura de $10^{\circ}C$ durante 1 hora, salvo que se indique otra cosa. Finalmente, la incubación se detuvo agregando 1 ml de buffer 70 mM Tris-ClH pH:8,2/5 mM EDTA. Se agitó con vórtex, y se centrifugó 5 minutos a 5.000 rpm a una temperatura no mayor de $4^{\circ}C$. En el sobrenadante se investigó la presencia de polisacárido como se indica más adelante, y el precipitado se lavó dos veces más con 1 ml de buffer 70 mM Tris-ClH pH 8,2 cada vez. Estos lavados eliminan el exceso de precursor radiactivo que no reaccionó y sus productos de ruptura en caso de que los hubiera.

El precipitado se extrajo tres veces con $ClH_3C:CH_3OCH:H_2O$ (1:2:0,3) (230), la primera vez con 200 μ l y las dos restantes con 100 μ l. A los extractos combinados se los llamó "Extracto 1203", y en ellos se investigó la presencia de prenil-fosfoazúcares.

III.3.2 Investigación de la presencia de polisacárido en los sobrenadantes

III.3.2.1 Método A: Análisis por cromatografía en papel

Sobrenadantes de incubaciones realizadas en presencia de los nucleótido-azúcares indicados fueron sometidos a hidrólisis ácida suave (ClH 0,01 N, 100°C, 10 min). Este procedimiento se realizó para provocar la ruptura de los nucleótido-azúcares utilizados como sustratos durante la incubación y posteriormente presentes en los sobrenadantes. Seguidamente, el material hidrolizado fue dializado contra agua destilada durante una noche a una temperatura de 4°C.

El contenido de la bolsa de diálisis se trasvasó a un tubo y se llevó a seco con evaporador rotatorio. Se agregó 100 ul de agua destilada, se agitó con vórtex, se centrifugó 1 min a 5.000 rpm y finalmente se cromatografió en papel Whatman 3 MM cosido a Whatman N°1 utilizando el solvente F.

III.3.2.2 Método B: Precipitación con polisacárido carrier no radioactivo

Sobrenadantes de incubaciones realizadas con los nucleótido-azúcares indicados fueron centrifugados a 10.000 rpm durante 5 min. Se tomó con pipeta Pasteur el sobrenadante y se liofilizó.

Se agregaron al liofilizado alícuotas de 100 ul de agua hasta completar 500 ul. Se agregó 100 ul de una solución de exopolisacárido de *R. trifolii* cepa NA-30 (1 ug/ml). Se agitó con vórtex, se llevó a 1% en CLK, y se agregaron 1.200 ul de etanol 96%. Se agitó con vórtex y posteriormente se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos. Se obtuvo un precipitado (P_1) y un sobrenadante (S_1). Se repitió la operación 6 veces más lavando el P_1 y precipitando cada uno de los sobrenadantes. Se obtuvieron de este modo 7 sobrenadantes (S_1 a S_7) y 7 precipitados (P_1 a P_7). Se midió radiactividad en cada uno de los sobrenadantes y en el precipitado final (P_7).

III.4 TRATAMIENTOS DEGRADATIVOS

III.4.1 Hidrólisis ácida suave de lípido-azúcares

Las muestras de "Extracto 1203" se concentraron hasta casi sequedad bajo corriente de nitrógeno. Luego se agregó 0,5 ml de agua y ácido clorhídrico hasta una concentración final de 0,01 N ó 0,1 N según se indique, calentándose a 100°C durante 10 min. Luego de transcurrido este período, se separó el exceso de ácido a presión reducida en evaporador rotatorio, para lo cual se llevó a seco y se resuspendió dos veces con 200 ul de agua cada vez.

III.4.2 Hidrólisis ácida parcial o total de oligo o polisacáridos

Las muestras llevadas a seco bajo corriente de nitrógeno ó a presión reducida en evaporador rotatorio se disolvieron en ClH 1 N. Los tubos se cerraron a la llama y se calentó a 100°C durante el tiempo que se indica en cada caso. Se dejó enfriar y, luego de abrir el tubo, el extracto acuoso se llevó a seco bajo presión reducida. Finalmente se disolvió en agua y se procesó como se indica en cada caso. Otras condiciones de hidrólisis ácida sobre distintos compuestos se detallan particularmente.

III.4.3 Reducción catalítica

Se realizó según la forma descripta por Pont Lezica y col. (231) con ligeras modificaciones. El platino se preparó a partir de una solución acuosa de hexacloroplatinato de amonio y exceso de borohidruro de sodio.

El precipitado de platino catalítico se lavó con agua, se dejó decantar y luego de separar el sobrenadante se llevó a seco en evaporador rotatorio. Finalmente se guardó bajo "solvente 1203".

Cuando fue necesario utilizar el platino, se separó el "solvente 1203", se agregó "Extracto 1203" y se hizo burbujear una corriente de hidrógeno durante 10 minutos, y con intensidad suficiente como para mantener el platino en suspensión. Como fuente de hidrógeno se utilizó un aparato de Kipp, o indistintamente un tubo comercial. En el caso del aparato de Kipp se utilizaron granallas de zinc y una mezcla de H_2SO_4 cc: H_2O (1:8 v/v) (251).

Transcurridos 10 minutos de reacción, se centrifugó el material durante 2 minutos a 5.000 rpm, se separó el sobrenadante y se lavó el platino con dos alícuotas de 100 ul de agua. Se reunieron los lavados con el primer sobrenadante y se llevó a seco bajo presión reducida. Finalmente se continuó como se

indica en cada caso.

III.4.4 Deacilación de oligosacáridos

Las muestras llevadas a seco bajo presión reducida se disolvieron en 200 μ l de NaOH 60 mM y se dejaron 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se finalizó agregando una punta de espátula de resina Dowex 50 x 8 (H^+). Se agitó con vórtex, se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se lavó la resina 2 veces con 200 μ l de agua y se combinaron los sobrenadantes. Finalmente se llevó a seco bajo presión reducida.

III.4.5 Reducción con borohidruro

Se efectuó en la forma descrita por García y col. (201). La muestra a ser reducida se disolvió en 200 μ l de agua, se agregaron 5-10 mg de BH_4Na y se dejó una noche a temperatura ambiente. La reacción se detuvo pasando la mezcla de reacción por una columna de resina Dowex 50 x 8 (H^+) (100 x 0,4 mm), tantas veces como fuese necesario para obtener un valor de pH:3,5. Durante esta operación se destruye el exceso de borohidruro y se eliminan los cationes. Finalmente la solución fue llevada a seco a presión reducida y el ácido bórico fue eliminado con metanol.

III.4.6 Reducción del grupo carboxilo en oligosacáridos que contienen ácido glucurónico

El grupo carboxilo del ácido glucurónico presente en oligosacáridos fue reducido al grupo alcohol utilizando el método de Taylor y Conrad (232), modificado por Couso y col. (204). La muestra llevada a seco se disolvió en 0,3 ml de metanol al 33%, se agregaron 10 mg de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Sigma Chemical) y se ajustó a pH:4,7 (aparente) con ClH 0.1 N, utilizando verde de bromocresol como indicador.

Se dejó 2 horas a temperatura ambiente, controlando a intervalos el valor del pH, agregando ClH en caso que fuera necesario. Luego se agregaron 10 mg de BH_4Na y se dejó toda la noche a temperatura ambiente.

La reacción se detuvo con el agregado de resina Dowex 50 x 8 (H^+) para destruir el exceso de borohidruro y eliminar el sodio. La solución fue llevada a seco bajo presión reducida y el ácido bórico fue eliminado con metanol.

El producto reducido se separó de la EDC por cromatografía en papel Whatman 3 MM cosido a papel Whatman n°1. Se utilizó el solvente D y se dejó desarrollar durante 48 horas.

III.4.7 Permetilación

Se realizó por el método de Hakomori (233), según lo describen Sandford y Conrad (234), con algunas modificaciones. El método utiliza metilsulfinilanión para generar el alcóxido de mono, oligo o polisacáridos antes de agregar al agente metilante (ioduro de metilo).

Reactivos

- . Dimetilsulfóxido (DMSO):

El DMSO (Fluka A.G.) se agitó en presencia de H_2Ca a $40^\circ C$ durante 30 hs y se destiló a presión de 20 mm de Hg aproximadamente. Se recibió el material destilado en balón con H_2Ca y se trasvasó a un frasco cuya tapa se cubrió con "parafilm".

- . Hidruro de sodio (HNa):

Se utilizó HNa Sigma sin aceite mineral. Se conserva en desecador al vacío.

- . Ioduro de metilo:

Se utilizó marca Fluka A.G. Se conserva en heladera a $4-8^\circ C$. La tapa del frasco se cubrió con "parafilm".

- . Preparación del Dimetilsulfinilanión (DMSA):

Se preparó un baño de vaselina a $65-68^\circ C$, cuidando de mantener una temperatura homogénea mediante agitación magnética.

Se sumergió en el baño la mitad inferior de un tubo con salida lateral y se hizo circular una corriente de nitrógeno proveniente de un tubo comercial conectado a un frasco lavador (que contenía ácido sulfúrico cc).

Pasados 15 minutos, se introdujeron 15 ml de DMSO en el tubo con salida lateral, una barrita magnética menor que la del baño de vaselina y aproximadamente 750 mg de HNa. Resultó de suma importancia efectuar esta operación con rapidez, cuidando de no hidratar ni el dispositivo ni los reactivos. Para esto, previamente se calculó la capacidad de una espátula-cuchara agregándose finalmente un ligero exceso de HNa.

Luego de dos horas de reacción (hasta el desarrollo de un color verdoso), la suspensión se centrifugó a temperatura ambiente. El sobrenadante (DMSA) se transvasó a un tubo, se agregó una capa de vaselina líquida, se tapó con tapón de goma y se cubrió con "parafilm". Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se conservó a -20°C . La estabilidad del reactivo varía entre un mes y un año.

III.4.7.1 Permetilación de mono u oligosacáridos

La muestra se llevó a seco en tubo cónico de 2 mililitros de capacidad y se dejó durante una noche al vacío en pistola secadora.

Al abrir el dispositivo se colocó un algodón en la entrada de aire. Por cada miligramo de muestra se agregó 1 ml de DMSO (nunca menos de 0,2 ml). Se ultrasonizó en un aparato modelo Sonifier W 140 con potencia mediana en tres períodos de 2 min con 1 min de intervalo entre períodos. Previamente, se lavó la punta del aparato con agua destilada y luego con tres alícuotas de DMSO contenidas en sendos tubos. No se secó la punta con ningún elemento de género o papel. En otro tubo con salida lateral que previamente había estado durante 15 min bajo corriente de N_2 , se agregaron el DMSO (1 ml) conteniendo la muestra en suspensión y el DMSA (1 ml). Se dejó reaccionar a temperatura ambiente bajo corriente de N_2 , manteniendo agitación magnética.

Luego de dos horas, si el oligosacárido era neutro, o de 6 horas si era cargado negativamente, se agregó un volumen de yoduro de metilo y se continuó agitando durante dos horas más. Para añadir este reactivo se sumergió una porción del tubo de reacción en baño de hielo-agua y el yoduro de metilo se agregó rápidamente en pequeñas alícuotas tratando de no interrumpir la agitación.

La reacción se detuvo agregando 2 ml de agua, se agitó con vórtex y la solución se extrajo 3 veces con 2 ml de cloroformo. Las fases clorofórmicas reunidas se lavaron 3-4 veces con 6 ml de agua cada vez, se transfirieron a un tubo de 13 x 100 mm y se llevaron al mínimo volumen bajo corriente de N_2 . El

aspecto final del material es el de un jarabe.

Hidrólisis del material permetilado

Al tubo que contenía la muestra se le agregaron 0,4 ml de ClH 1 N y se homogeneizó con un pulso de ultrasonido utilizando para ello la punta más delgada del aparato. Luego de dicha operación se formó una suspensión opaca. Se cerró el tubo a la llama y el material se hidrolizó a 100°C durante 4 horas. Pasado este período, se centrifugó 1 minuto a 10.000 rpm, se tomó el sobrenadante, y se separó el exceso de ácido a baja presión. Finalmente, el producto se tomó con agua para su análisis posterior.

III.4.7.2 Permetilación de polisacáridos

Se realizó por el mismo procedimiento empleado para oligosacáridos con las modificaciones que se indican:

- a) El polisacárido se ultrasonicó en DMSO durante 15 minutos. El vial cónico se semisumergió en baño de agua-hielo protegiendo la entrada de microgotas con un trozo de papel aluminio.
- b) La formación de alcóxido con DMSA se realizó durante 18-24 horas.
- c) Una vez detenida la reacción de metilación, el polisacárido se dializó exhaustivamente contra agua destilada y luego se liofilizó.

Hidrólisis del material permetilado

El polisacárido permetilado se disolvió en ácido fórmico 90%. El tubo se cerró a la llama y se calentó a 100°C durante 1 hora. El ácido se eliminó llevando a seco varias veces en evaporador rotatorio. Al residuo final se agregaron con 2 ml de ácido sulfúrico 0,25 M y se calentó a 100°C durante 16 horas en tubo cerrado a la llama. El ácido se eliminó pasando la solución por una columna (7 x 0,5 cm) de resina Dowex (forma CO₃H⁻) controlándose el pH (5 ó 6). Se concentró en evaporador rotatorio, el residuo se tomó con agua y se cromatografió en placa delgada.

III.5 METODOS ANALITICOS

Los azúcares se dosaron por el método del fenol-sulfúrico (235), usando glucosa como patrón.

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry (236), usando albúmina de suero bovino como patrón.

III.6 TRATAMIENTOS ENZIMATICOS

III.6.1 Tratamiento con fosfatasa alcalina

La muestra llevada a seco se resuspendió en buffer Tris-ClH 50 mM-pH 8.2, se agregaron 2 ul de una suspensión de enzima de E. coli (2,5 M en sulfato de amonio, Sigma) y se llevó a un volumen final de 0,1 ml. Se incubó 1 hora a 30°C. La reacción se detuvo con dos volúmenes de etanol y luego de centrifugar durante 5 minutos a 5.000 rpm, se analizó el sobrenadante como se indica en cada caso.

III.6.2 Tratamiento con beta-glucuronidasa de intestino de caracol (glusulasa)

La glusulasa de intestino de caracol (*Helix pomatia*) fue preparada en el laboratorio según lo describe De Stevens (237). Se utilizó en todos los casos la cantidad de 10 ul de la preparación, con lo cual se observó muy buena actividad.

La reacción se realizó en buffer 0,1 M de acetato de sodio pH:4,5 en un volumen total de 100 ul. Se incubó durante una noche a 37°C. La reacción se detuvo con dos volúmenes de etanol, se centrifugó y se analizó el sobrenadante como se indica en cada caso.

III.6.3 Tratamiento con beta-glucuronidasa comercial

Se utilizaron 60 unidades de beta-glucuronidasa bovina (Sigma, tipo I) en buffer 0,1 M, acetato de sodio pH 4,5, en un volumen total de 0,1 ml. Se incubó a 37°C durante una noche. La reacción se detuvo con dos volúmenes de etanol. Se centrifugó y se analizó el sobrenadante como se indica en cada caso.

III.6.4 Tratamiento con beta-glucosidasa comercial

La muestra fue incubada con 0.25 mg de proteína de beta-glucosidasa de almendras (Miles Laboratories), en buffer acetato de sodio 20 mM-pH 4.8, a una temperatura de 37°C durante 20 minutos. El volumen final fue de 0.1 ml. La reacción se detuvo con dos volúmenes de etanol. Se centrifugó y se analizó el sobrenadante según se indica.

III.6.5 Tratamiento con pirofosfatasa inorgánica

La pirofosfatasa inorgánica fue preparada por la Lic. Susana Raffo como describe Kunitz (238), hasta el fraccionamiento con etanol inclusive. La muestra llevada a seco se resuspendió en buffer Tris-ClH 50 mM pH:3,2, MgCl₂ 2 mM, y se agregaron 0,64 unidades de pirofosfatasa inorgánica en un volumen total de

0,1 ml. Se incubó a 37°C durante 2 horas y se detuvo la reacción con dos volúmenes de etanol. Luego de centrifugar se analizó el sobrenadante como se indica en cada caso.

Cuando los tiempos de reacción excedieron las dos horas, las incubaciones se realizaron en atmósfera de tolueno.

III.7 CROMATOGRAFIAS

III.7.1 Cromatografías en columnas de DEAE-celulosa

Se utilizaron columnas de 1,2 x 60 cm, que fueron desarrolladas según el método de Dankert y col (239). Como solvente de elución, se utilizó metanol 99% y después de 100 ml se conectó un gradiente lineal de 500 ml de acetato de amonio en metanol 99% (de 0 a 2 M). Las fracciones colectadas fueron de 3 ml.

La solución 2 M de acetato de amonio se preparó a partir de droga recristalizada de metanol. Para ello, se disolvió la droga en metanol caliente contenido en un vaso de precipitados, y posteriormente se sumergió el vaso en un baño de agua-hielo.

III.7.2 Cromatografía en columnas de geles

Se utilizó Bio Gel P₂ (200-400 mesh) en una columna de 0,7 x 114 cm, equilibrada con 0,1 M acetato de piridina pH:5,0. Se colectaron fracciones de 0,5 ml con una velocidad de flujo de 0,1 ml/min.

Los volúmenes de exclusión total y de inclusión total se determinaron por las posiciones de elución de dextrano azul (4 mg) y de cloruro de cobalto (200 umoles), respectivamente. Se incluyeron estándares no radioactivos de estaquiosa (2 umoles),

rafinosa (10 umoles), sacarosa (5 umoles) y glucosa (20 umoles), los cuales fueron detectados por el método de fenol-sulfúrico (235) en 100 ul de cada fracción.

La medida de radioactividad fue realizada sobre alícuotas variables de cada fracción. Las magnitudes de dichas alícuotas dependieron de la cantidad de muestra radiactiva y las mismas se especifican en cada caso.

III.7.3 Cromatografías y electroforesis en papel

Se utilizó papel Whatman N°1 y se emplearon los siguientes solventes:

- A) Etanol 96% - Amoníaco (7/3) (v/v) (240).
- B) Acetato de piridina 1,2 M, pH:6,5 (201).
- C) Butanol-piridina-agua (6/4/3) (v/v) (241).
- D) Isopropanol-ácido acético-agua (27/4/9) (v/v) (242).
- E) Molibdato de sodio 0,1 M-ácido sulfúrico hasta pH:5 medido con electrodo de vidrio (243).
- F) Etanol-ácido acético-acetato de amonio 1 M (75/25/4) (v/v) (240).
- G) Nitrometano-ácido acético-etanol-agua sat. de ácido bórico (8:1:1:1) (v/v) (244).

Con el solvente A se utilizó la técnica ascendente.

Las electroforesis se realizaron como lo señalan García y col. (201). Normalmente se efectuaron a voltaje constante y se aplicaron 1.000 volts (20 volts/cm) durante 180 minutos. Con el solvente B se aplicaron en algunas ocasiones 2.000 volts (40 volts/cm) durante 90 min, observándose para los compuestos de nuestro interés las mismas separaciones que en las condiciones originales. Con este solvente se utilizaron como estándares Glc, AMP, UMP, y GlcA no radioactivos.

Para la ubicación de los azúcares reductores se utilizó el nitrato de plata alcalino (245). La ubicación de los nucleótidos se determinó por su absorbancia a la luz ultravioleta. Los compuestos con grupo fosfato fueron ubicados con el reactivo de molibdato (246).

Con el solvente E se utilizó como estándares una mezcla de maltooligosacáridos que se preparó como describen Behrens y Tábora (247):

Preparación de maltooligosacáridos

En un frasco de Erlenmeyer de 500 ml de capacidad se colocaron 150 mg de amilosa de papa. Se agregaron 30 ml de ácido sulfúrico 0,1 M y se dejó en baño María durante 1 hora. Se agregaron 150 ml más del ácido y se continuó hidrolizando durante 10 minutos más. Se dejó enfriar y con agitación magnética se llevó a neutralidad mediante el agregado puntas de espátula de CO_3Ba .

Una vez neutralizada, la mezcla se centrifugó y el sobrenadante se concentró en evaporador rotatorio para provocar la precipitación de sales (solubilidad de CO_3Ba 0,028 g/l). El último sobrenadante se diluyó 10 veces y se pasó por una columna de resina MB3 Amberlite (forma acetato). El percolado se concentró hasta 6 ml. La masa de material a sembrar se decidió teniendo en cuenta la capacidad del papel utilizado en cada cromatografía, considerando los siguientes valores:

Whatman N°1 hasta 1 $\mu\text{mol/cm}$

Whatman 3 MM hasta 4 $\mu\text{mol/cm}$

III.7.4 Cromatografía en placa delgada (TLC)

Se utilizaron placas de silicagel Merck "Kieselgel 60" y se emplearon como solventes:

H) Benceno-acetona-amoniaco-agua (50/200/1,35/1) (248).

I) Benceno-acetona-amoniaco (50/200/1,35).

El solvente I constituye una modificación del H y fue desarrollado en nuestro laboratorio con el objeto de mejorar la separación de los derivados 2,3,4 Tri-O-Metil-Glc y 3,4,6 Tri-O-Metil-Glc entre sí. Los Tri-O-Metil-derivados no radiactivos fueron preparados en nuestro laboratorio a partir de los disacáridos: celobiosa, nigerosa, genciobiosa y kojibiosa o soforosa. Cuando no fue posible obtener nigerosa, el derivado

trimetilado 2,4,6 Tri-O-metil-Glc se obtuvo por permetilación de nigerano (1→3, 1→4) (Koch-light). En este último caso, el material se trató como se describe para el caso de polisacáridos.

Para la ubicación de los azúcares metilados se vaporizó la placa con una solución de ácido sulfúrico 5% en etanol y se calentó la placa a 140°C durante 5 minutos (252).

La radioactividad en electroforogramas y cromatogramas en papel o placa delgada se detectó con un radiocromatógrafo Packard modelo 7201.

Los compuestos radioactivos en solución se midieron con la solución de Bray (249) o con una mezcla que contenía 4 gramos de omnifluor (New England Nuclear) en un litro de tolueno en contadores de centelleo Packard Tricarb modelos 2002 y 2003.

La mezcla de omnifluor en tolueno se utilizó para medir (^{14}C) en trozos de papel provenientes de cromatografías o electroforesis. Luego de contado cada papel, se lavó tres veces con tolueno para quitar el exceso de material de centelleo y tres veces con éter etílico para eliminar el tolueno y poder así eluir las sustancias medidas.

Las alícuotas de las fracciones provenientes de columnas de DEAE-celulosa fueron medidas en mezclas de Bray preparadas con PPO y dimetil POPOP en vez de omnifluor, con el objeto de disminuir el "quenching".

III.7.5 Cromatografía en columna de boranos

Se utilizó una pipeta Pasteur (6 cm x 0,8 cm) empaquetada con Affi-Gel 601, producto consistente en una matriz de Bio-Gel sobre la que se encuentran covalentemente unidos grupos de ácido borónico (Pierce Chemical Company). Se eluyó con ácido fórmico 0.1 M y se colectaron fracciones de 1 ml. Se utilizaron como estándares fríos deoxi-D-ribosa y D-ribosa, los cuales fueron detectados por el método de fenol-sulfúrico (235), en 100 ul de cada fracción. El material radioactivo se midió con solución de Bray (249), habiendo concentrado previamente cada fracción hasta un volumen de 50 ul. Se utilizó para este ensayo trisacárido d(¹⁴C)GlcA (3.800 cpm).

III.8 OBTENCION DE COMPUESTOS RADIOACTIVOS

III.8.1 Preparación de nucleótido-azúcares

Los nucleótido-azúcares fueron preparados por Marta Eirin, Susana Raffo y Marta Bravo.

UDP(¹⁴C)Glc fue preparado a partir de glucosa uniformemente marcada (Amersham Searle 200-300 Ci/mol de actividad específica), siguiendo la técnica descrita por Thomas (250), con diversas adaptaciones.

Beta(³²P)UDP-Glucosa fue preparado a partir de (³²P)PO₄H₃ (Amersham Searle), como lo describe Couso (133).

UDP(¹⁴C)GlcA fue preparado a partir de UDP(¹⁴C)Glc (New England Nuclear), 200-300 Ci/mol) como lo describe Couso (133).

III.8.2 Otros compuestos radioactivos

(1-¹⁴C)acetil-CoA (AE: 55,9 Ci/mol) y ácido fosfo-enol (1-¹⁴C) pirúvico (AE: 12,4 Ci/mol) como sal de ciclohexilamonio fueron obtenidos de New England Nuclear y de Amersham Searle, respectivamente.

IV.0 RESULTADOS

IV.A ESTUDIOS IN VIVO

Como adelantáramos (Introducción, sección 1.5), distintas especies de Rhizobios pueden producir exopolisacáridos acídicos (EPS) con la misma estructura de restos glicosídicos.

Este es el caso de los EPSs producidos por *Rhizobium trifolii* cepa NA-30, *Rhizobium leguminosarum* 128 C-63, *Rhizobium leguminosarum* 128 C-53 y muy probablemente también *Rhizobium trifolii* ATCC 14479. Un esquema parcial de la estructura de la unidad repetitiva de dichos EPS se muestra en la Figura 15.

Se realizaron estudios con las cepas mencionadas a fin de determinar, en cada caso, el tiempo de duplicación, la producción de EPS, su composición y la capacidad de nodulación.

IV.A.1 Cultivo de las cepas

Con el objeto de determinar los tiempos de duplicación, se realizaron curvas de crecimiento para cada cepa.

Los resultados (Tabla III) muestran que las cepas elegidas se comportan como se describe en la literatura para el caso de los Rhizobios llamados de crecimiento rápido.

TABLA III

TIEMPOS DE DUPLICACION DE LAS CEPAS ESTUDIADAS

Cepa	Tiempo de duplicación (horas)
Rhizobium trifolii NA-30	4
Rhizobium trifolii ATCC 14479	8
Rhizobium leguminosarum 128 C-53	4
Rhizobium leguminosarum 128 C-63	6

TABLA III: Se utilizó el medio de cultivo que describe Albersheim en las condiciones que se detallan en Materiales y Métodos (secciones III.1.1 y III.1.2). Se realizaron curvas de crecimiento para cada cepa y se determinó el tiempo de duplicación en cada caso.

IV.A.2 Producción de exopolisacárido

La producción de EPSs se estudió en los sobrenadantes de cultivos de fase exponencial.

En cada caso, se cosechó el EPS por precipitación de los sobrenadantes con Etanol/ClK. Como se mencionó anteriormente, los glucanos cíclicos producidos por los Rhizobios precipitan con mayores proporciones de etanol que la utilizada (228,229).

El material se reprecipitó 2 a 3 veces, se dializó y finalmente se liofilizó. Dicho material liofilizado fue denominado "exopolisacárido crudo", y en el mismo no se detectaron proteínas por el método de Lowry (236).

Los resultados se muestran en la Tabla IV. Se observa que las cepas de *Rhizobium trifolii* NA-30 y de *Rhizobium leguminosarum* 128 C-53 producen la mayor cantidad de exopolisacárido crudo.

En el caso de *Rhizobium trifolii* cepa ATCC 14479, los cultivos en placa mostraban la presencia de dos tipos de colonias: chicas y grandes ("Ch" y "G"). Dado que las colonias "G" tenían aspecto mucoide y producían la mayor proporción de exopolisacárido crudo, se realizó el ensayo con esta subpoblación (resultados no mostrados).

TABLA IV

PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDO

CEPA	EXOPOLISACARIDO CRUDO (mg/mg húmedo)
Rhizobium trifolii NA-30	1,34
Rhizobium trifolii ATCC 14479-G	0,057
Rhizobium leguminosarum 128 C-53	1,02
Rhizobium leguminosarum 128 C-63	0,13

TABLA IV: En cada caso, se preparó exopolisacárido como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como miligramos de polisacárido crudo por miligramos de células húmedas.

IV.A.3 Composición de los EPSs de las cepas utilizadas

Con el objeto de verificar la composición en azúcares de los EPS acídicos producidos por cada cepa, se procedió al estudio de los mismos mediante hidrólisis ácida total y posterior análisis por electroforesis y cromatografía en papel.

Como era de esperar, en todos los casos se observó la presencia de los monosacáridos Glc, Gal y GlcA. También se detectaron compuestos de menor movilidad, posiblemente oligosacáridos producidos por hidrólisis incompleta del respectivo EPS. En todos los casos, se observaron los mismos componentes y no fueron analizados con mayor detalle.

En los casos de *Rhizobium trifolii* NA-30, *Rhizobium leguminosarum* 123 C-53 y 128 C-63, también se determinó la presencia de piruvato mediante análisis por cromatografía en papel.

Además, pero solo en el caso de *Rhizobium trifolii* NA-30, se determinó la presencia de O-acetilo en una relación estequiométrica de 1 mol cada 8 moles de hexosa unida en enlace glicosídico (Tabla 7).

TABLA V

COMPOSICION DE LOS EPSs DE LAS CEPAS UTILIZADAS

Cepa	Monosacáridos				Oligosacáridos	Pir	O-Acetilo
	Glc	GlcA	Gal	Otros			
R.trifolii NA-30	+	+	+	-	+	+	+
R.trifolii ATCC 14479-G	+	+	+	-	+	ND	ND
R.leguminosarum 128C-53	+	+	+	-	+	+	ND
R.leguminosarum 128C-63	+	+	+	-	+	+	ND

TABLA V: En cada caso, el material liofilizado fue hidrolizado en ampolla cerrada con ClH 1N a 100°C durante 24 horas. Terminada la hidrólisis, se separó el exceso de ácido a baja presión, se agregaron 200 ul de amoníaco y se llevó a seco bajo corriente de nitrógeno. Se realizó dicha operación con el objeto de convertir glucuronolactona en ácido glucurónico. Los materiales fueron analizados por electroforesis y cromatografía en papel (utilizando el buffer B y el solvente C, respectivamente).

Pir: piruvato, el cual fue revelado (aunque pobremente) con el reactivo de nitrato de plata alcalino (245). La determinación de acetato se realizó con el reactivo de hidroxilamina, según describe Hestrin (222). ND: no determinado.

IV.A.4 Nodulación

Con cada una de las cepas mencionadas, se realizaron ensayos de nodulación. Los resultados muestran que en las condiciones elegidas, solamente nodula bien *Rhizobium trifolii* cepa NA-30 (Tabla IV bis). Con *Rhizobium trifolii* ATCC-14479-G, los resultados fueron erráticos.

TABLA VI

CAPACIDAD DE NODULACION DE LAS CEPAS

Cepa	Número de nódulos/plántula
<i>Rhizobium trifolii</i> NA-30	5-8
<i>Rhizobium trifolii</i> ATCC 14479-G	n.d.
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 128 C-53	ninguno
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 128 C-63	ninguno

TABLA VI: Se realizó el ensayo como se describe en Materiales y Métodos (sección III.1.6). A partir de los 15 días de inoculadas las plántulas, se investigó la presencia de nódulos. n.d.: nodulación dudosa.

IV.B ESTUDIOS IN VITRO

Mencionamos previamente (sección II.0) que en sistemas similares, fue establecido que en las etapas intermedias de la biosíntesis del respectivo EPS, participan prenil-fosfo-azúcares como precursores inmediatos.

Con el objeto de emprender un estudio similar en nuestro caso, se investigó si de las cepas de Rhizobios mencionadas (sección IV.A), se podían obtener preparados enzimáticos capaces de producir la síntesis in vitro del EPS y/o de sus intermediarios.

Los sistemas enzimáticos de síntesis de EPSs están probablemente asociados a membranas, sin duda organizados espacialmente de modo que la biosíntesis secuencial sea posible y que el EPS maduro pueda ser secretado hacia el exterior de la célula. Considerando esta noción y dada la experiencia que había en nuestro laboratorio, se utilizaron preparados enzimáticos consistentes en células permeabilizadas con EDTA/Tris.

IV.B.1 Ensayos preliminares de incorporación de radioactividad a distintas fracciones

IV.B.1.1 Transferencia de radioactividad a partir de UDP(¹⁴C)GlcA

Atendiendo a la estructura propuesta para la unidad repetitiva del polisacárido cuya biosíntesis se investiga (Fig. 15), pareció razonable utilizar los nucleótido-azúcares precursores capaces de proveer los azúcares respectivos: UDP-Glc y UDP-GlcA, uno de ellos radioactivo.

Los preparados enzimáticos obtenidos como se detalla en Materiales y Métodos (sección III.1.3) se incubaron utilizando UDP(¹⁴C)GlcA como precursor radioactivo, en presencia de UDP-Glc no marcado.

Se utilizó este precursor radioactivo en primer término porque se consideró que era más específico, dado que distintas especies de Rhizobios, además del EPS en estudio, producen glucanos cuyo precursor es UDP-Glc (263).

Se estudió la incorporación de radioactividad al "extracto 1203" (para detectar síntesis de prenil-fosfo-azúcares), y al precipitado de células y al sobrenadante acuoso del lavado (para detectar síntesis de EPS).

No se detectó incorporación de radioactividad a los precipitados de células ni a los lavados acuosos, con ninguno de

FIGURA 15

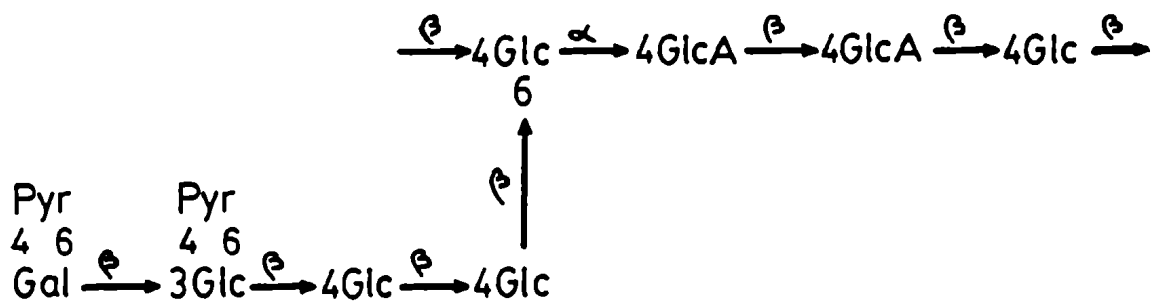


Figura 15: ESTRUCTURA PROPUESTA PARA LA UNIDAD REPETITIVA DE LOS EPSs DE *Rhizobium trifolii* NA-30 Y *Rhizobium leguminosarum* CEPAS 128C-53 Y 128C-63 (157).

Tomado de Albersheim P. (157). No se incluyen restos O-acilos.

los métodos ensayados (sección III.3.2), en ninguna de las condiciones estudiadas ni con ninguna de las cepas.

En cambio sí se encontró transferencia de radioactividad al "extracto 1203" con preparados enzimáticos provenientes de todas las cepas (Tabla VII).

Los resultados mostraron que la mayor incorporación de radioactividad a material liposoluble ("extracto 1203") fue para el preparado enzimático proveniente de *Rhizobium trifolii* cepa NA-30.

Dado que además esta cepa tenía la mayor producción de EPS crudo (sección IV.A.2) y nodulaba con facilidad (sección IV.A.4), se realizaron los estudios siguientes fundamentalmente con ella. En adelante entonces, salvo que se indique, los resultados corresponden al sistema de *Rhizobium trifolii* cepa NA-30.

Atendiendo a la estructura de la unidad repetitiva propuesta (Fig. 15), era posible esperar que la incorporación de radioactividad al "extracto 1203" proveniente de $\text{UDP}^{(14)}\text{GlcA}$ se modificara en presencia de UDP-Glc agregado a la mezcla de incubación.

En dichas condiciones, se observó una estimulación de la incorporación de radioactividad por el agregado de UDP-Glc no marcado, sugiriendo que la glucosa forma parte del (o de los)

TABLA VII

INCORPORACION DE RADIOACTIVIDAD A "Extracto 1203"

A PARTIR DE DIFERENTES PRECURSORES UTILIZANDO

PREPARADOS ENZIMATICOS DE DISTINTAS CEPAS

Exp.	Preparado		Dador	Radioactividad en Extracto 1203 (pmoles/mg proteína)
	Enzimático	Radioactivo		
1	R.trifolii NA-30	UDP(¹⁴ C)GlcA	-	21.4
2	R.trifolii NA-30	UDP(¹⁴ C)GlcA	UDP-Glc	65.6
3	R.trifolii NA-30	UDP(¹⁴ C)Glc	-	16.9
4	R.trifolii NA-30	UDP(¹⁴ C)Glc	UDP-GlcA	17.5
5	R.trifolii ATCC 14479	UDP(¹⁴ C)GlcA	UDP-Glc	6.8
6	R.legumino- sarum 128-C-53	UDP(¹⁴ C)GlcA	UDP-Glc	55.4
7	R.legumino- sarum 128-C-63	UDP(¹⁴ C)GlcA	UDP-Glc	9.3

TABLA VII: Las incubaciones fueron realizadas en condiciones estándar, según se indica (sección III.3.1), en presencia de UDP(¹⁴C)GlcA (1.000 pmoles) y de UDP-Glc (25.000 pmoles) (Exp. 1,2,5,6 y 7) o de UDP(¹⁴C)Glc (1.000 pmoles) y UDP-GlcA (25.000 pmoles) (Exp. 3 y 4).

compuestos radioactivos solubles en el "extracto 1203" (Tabla VII, experimentos 1 y 2).

IV.B.1.2 Transferencia de radioactividad a partir de UDP(¹⁴C)Glc

Se estudió entonces la transferencia de radioactividad al "extracto 1203" utilizando UDP(¹⁴C)Glc como precursor radioactivo en presencia o ausencia de UDP-GlcA.

Los resultados (Tabla VII, Exp. 3 y 4) muestran que también existe incorporación de radioactividad a material liposoluble ("extracto 1203"), a partir de este precursor. La radioactividad incorporada no fue estimulada por el agregado de UDP-GlcA exógeno. Dicha falta de estimulación fue justificada considerando que, como dijimos, las células tratadas con EDTA/Tris constituyen un preparado enzimático crudo, y por tanto contienen aceptores y/o precursores endógenos.

IV.B.1.3 Transferencia de radioactividad a partir de beta(³²P)UDP-Glc ó de beta(³²P)UDP-GlcA

Se realizaron experimentos independientes, utilizando como precursores radioactivos tanto beta(³²P)UDP-Glc como beta(³²P)UDP-GlcA. En el primer caso se obtuvieron incorporaciones razonables (Tabla VIII) (unas cuatro veces menor que con UDP(¹⁴C)Glc (Tabla VII)). Además la radioactividad presente en este extracto permaneció en el lugar de siembra cuando éste

TABLA VIII

INCORPORACION DE RADIOACTIVIDAD A "Extracto 1203"
A PARTIR DE beta(³²P)UDP-Glc o de beta(³²P)UDP-GlcA

Exp	Dador		No radioactivo		Radioactividad en Extracto 1203 (pmoles/mg prot.)
	Radioactivo (³² P)UDP-Glc (pmoles)	(³² P)UDP-GlcA (pmoles)	UDP-Glc (pmoles)	UDP-GlcA (pmoles)	
1	1.400	-	-	25.000	4.1
2	1.400	-	-	25.000	0.001
3	-	1.400	25.000	-	0.37
4	-	1.400	25.000	-	0.001

TABLA VIII: Las incubaciones fueron realizadas en las condiciones que se indican (sección III.3.1), utilizando como precursores exógenos los nucleótido-azúcares que se indican. El número de lavados acuosos fue el doble que el habitual (seis lavados en total). En el caso de los experimentos 2 y 4, la reacción se detuvo antes de agregar el precursor radioactivo. La actividad específica de ambos precursores radioactivos fue de 29 mCi/umol.

fue sometido a electroforesis en papel, lo cual indica que el δ los compuestos marcados con radioactividad proveniente de beta(^{32}P)UDP-Glc poseen una de las características de los prenil-fosfo-azúcares, pues son insolubles en el buffer utilizado (201) (Fig. 16, panel A).

En el caso del "extracto 1203" marcado con radioactividad proveniente de beta(^{32}P)UDP-GlcA, la incorporación fue unas 10 veces menor (Tabla VIII), y además la relación de la incorporación de radioactividad en el material que permaneció en el lugar de siembra en electroforesis se elevó a 100:1 a favor de (^{32}P) proveniente de beta(^{32}P)UDP-Glc, pues en el segundo de los casos la mayoría de los compuestos presentes resultaron solubles en agua y cargados negativamente (Fig. 16, panel B).

Debe mencionarse además, que la actividad específica de los (^{32}P)nucléotido-azúcares utilizados fue suficientemente elevada como para justificar la aparición de compuestos raros, aunque, como vimos, dichos compuestos solo pudieron observarse en el caso del "extracto 1203" marcado con radioactividad proveniente de beta(^{32}P)UDP-GlcA.

Estos resultados sugirieron que la glucosa ocupa el extremo reductor en por lo menos uno de los oligosacáridos sintetizados in vitro (véase más adelante), y que efectivamente está unida a un lípido mediante por lo menos un resto fosfato.

FIGURA 16

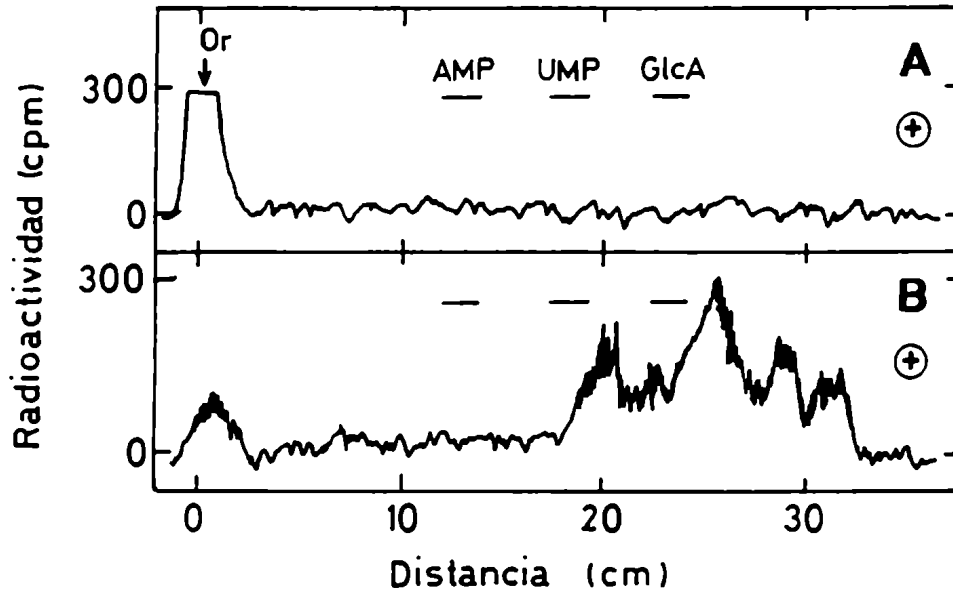


Figura 16: ELECTROFORESIS DEL "Extracto 1203" MARCADO CON RADIOACTIVIDAD PROVENIENTE DE beta(³²P)UDP-Glc ó de beta(³²P)UDP-GlcA

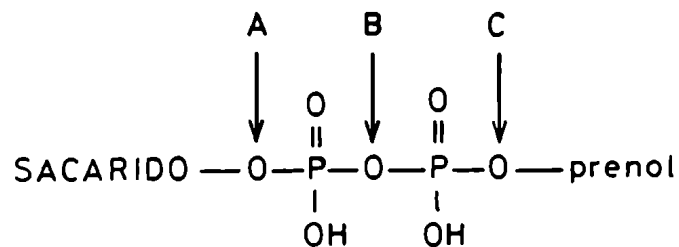
"Extracto 1203" (21.350 dpm), obtenido utilizando como precursor radiactivo beta(³²P)UDP-Glc (Tabla VIII, Exp. 1) ó beta(³²P)UDP-GlcA (Tabla VIII, Exp. 3) fue sometido sin ningún tratamiento previo a electroforesis en papel Whatman N° 1, a 1.000 volts durante 3 horas, utilizando el solvente B (paneles A ó B, respectivamente).

IV.B.2 Propiedades de los compuestos extraíbles con "solvente 1203"

Como vimos en secciones anteriores, los compuestos radioactivos presentes en el "extracto 1203" incorporaron radioactividad proveniente tanto de de UDP(¹⁴C)Glc, UDP(¹⁴C)GlcA o de beta(³²P)UDP-Glc. Con el objeto de caracterizarlos, se estudiaron algunas de sus propiedades químicas, para ver si poseían características conocidas de prenil-fosfo-azúcares, y, en caso de tratarse de más de un compuesto, proceder a su fraccionamiento.

IV.B.2.1 Labilidad en medio ácido suave

Una propiedad de los prenil-fosfo-azúcares es su labilidad a la hidrólisis ácida suave, para dar fundamentalmente oligosacáridos libres (201):



Tomado de M.A. Dankert y N.H. Behrens (264).

A y C: uniones lábiles a pH:2, 10 min, 100°C (ClH).
B: unión lábil a pH:1, 10 min, 100°C (ClH). En medio alcalino suave se produce el éster fosfórico cíclico del correspondiente sacárido siempre que el hidroxilo del C₂ del azúcar que ocupa el extremo reductor esté en posición "cis" respecto del fosfato más cercano (201).

Como ya se mencionó, el "extracto 1203" marcado con ^{32}P (proveniente de $\beta\text{-}^{32}\text{P}\text{UDP-Glc}$), analizado por electroforesis en papel, mostró que la radioactividad permanecía en el lugar de siembra, como era de esperar para prenil-fosfo-azúcares, los cuales son insolubles en el solvente utilizado (Fig. 16, panel A). El "extracto 1203" marcado con radioactividad proveniente de $\text{UDP}(^{14}\text{C})\text{GlcA}$ analizado intacto por el mismo criterio, reprodujo ese resultado (Fig. 17, panel A). En cambio, sometido a un tratamiento ácido suave ($\text{pH}:2$, 10 min, 100°C), este material libera un producto soluble en agua que, por el criterio empleado, se resolvió en por lo menos cuatro componentes negativamente cargados: a, b, c' y x (Fig. 17, panel B).

Similares resultados se obtuvieron cuando se analizó el perfil de la electroforesis en experimentos realizados utilizando $\text{UDP}(^{14}\text{C})\text{Glc}$ como precursor radioactivo. En este caso, la principal diferencia consistió en la presencia de un componente neutro (N), además de los ya nombrados a, b, c' y x (Fig. 17, panel C).

Como comentamos anteriormente, *Rhizobium trifolii*, además del polisacárido en estudio, libera un/os glucano/s extracelular/es, luego la formación de compuestos neutros fue atribuida a este último (sección IV.B.3.1 y ref. 263). Por análisis posteriores en cromatografía en papel, utilizando el solvente D, se estableció la ausencia de glucosa libre en dicho componente

FIGURA 17

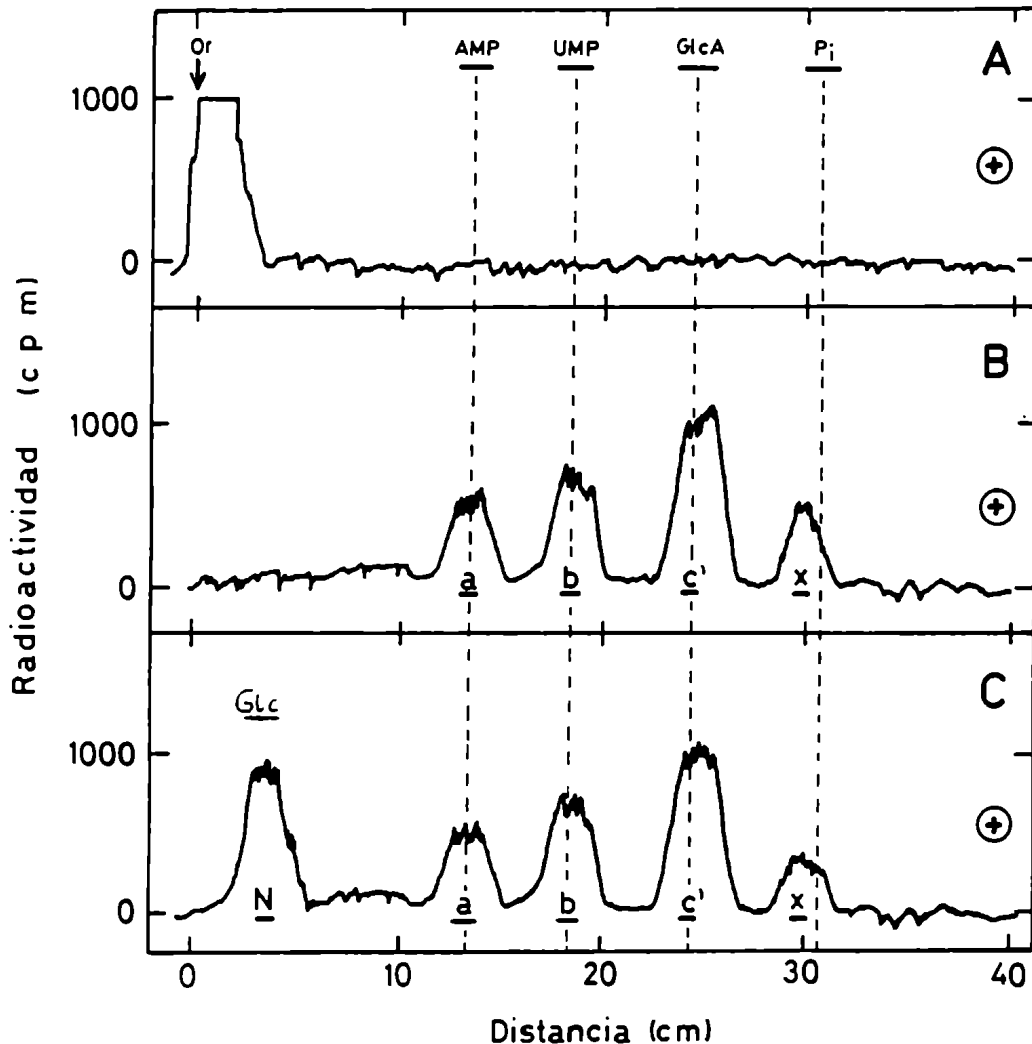


Figura 17: LABILIDAD EN MEDIO ACIDO SUAVE DE LOS COMPUESTOS RADIOACTIVOS PRESENTES EN "Extracto 1203"

Panel A: "Extracto 1203" (7.200 cpm) con radioactividad proveniente de $\text{UDP}(^{14}\text{C})\text{GlcA}$, obtenido como se indica en la Tabla VII (Exp. 2), fue electroforetizado intacto en buffer B a 1.000 volts durante 3 horas sobre papel Whatman N°1.

Panel B: Otra alícuota del mismo extracto (12.400 cpm) se sometió a hidrólisis ácida suave en ácido clorhídrico 0.01 N a 100°C durante 10 minutos. Se separó el exceso de ácido a baja presión y el material hidrolizado se electroforetizó como en el caso anterior.

Panel C: "Extracto 1203" (15.700 cpm) con radioactividad proveniente de $\text{UDP}(^{14}\text{C})\text{Glc}$ (véase Tabla VII, Exp. 4), se trató como el el caso que se muestra en el Panel B y se electroforetizó en idénticos sistemas y condiciones. AMP: 5'adenosina monofosfato; UMP: 5'uridina monofosfato; GlcA: ácido glucurónico; Pi: fosfato inorgánico; Glc: glucosa

neutro (resultados no mostrados).

IV.B.2.2 Labilidad en medio alcalino suave

Muchos prenil-difosfo-azúcares son lábiles en medio alcalino suave (amoníaco 30%, temperatura ambiente), y por este tratamiento, producen fosfodiésteres cíclicos del respectivo oligosacárido. La reacción ocurre cuando el oxhidrilo del C₂ del azúcar que ocupa el extremo reductor está en posición "cis" respecto del fosfato (201). Paladini y Leloir ya habían descripto que el UDP-Glc sufre una descomposición similar (240).

Los prenil-fosfo-azúcares que poseen un solo fosfato no dan esta reacción, posiblemente porque la unión del fosfato al isopreno es estable en las condiciones mencionadas y requieren tratamientos algo más fuertes (HONa 0,1 N, 64°C, en n-propanol, 70% de ruptura en 90 min (201)).

En nuestro caso, se estudió la labilidad en medio alcalino suave de los compuestos radioactivos extraíbles con "extracto 1203". Para ello, se cromatografió el extracto en el solvente alcalino A, que en muchos casos permite además investigar la resolución cromatográfica de los productos, si los hay. En este sistema, los prenil-monofosfato-azúcares, que no se descomponen, migran prácticamente con el frente del solvente (201).

Los resultados muestran dos componentes: (¹⁴C)1° y (¹⁴C)2°, ambos con poca movilidad, sugiriendo que hubo degrada-

ción (Fig. 18).

Para ver si los compuestos correspondientes a los picos $(^{14}\text{C})1^\circ$ y $(^{14}\text{C})2^\circ$ poseían fosfato unido en enlace fosfodiéster, se eluyeron del papel y se los sometió a electroforesis directa o bien posterior a un tratamiento con fosfatasa alcalina.

Los resultados obtenidos con el pico $(^{14}\text{C})2^\circ$ (marcado tanto con $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ como con $(^{14}\text{C})\text{GlcA}$) sometido a electroforesis con o sin tratamiento previo con fosfatasa alcalina, mostraron un componente de movilidad $R_{\text{GlcA}} = 1,21$, (Fig. 19, paneles B y A, respectivamente). Dicha movilidad resultó idéntica a la del compuesto x (Fig. 17, paneles B y C).

Si en cambio el material correspondiente al pico $(^{14}\text{C})2^\circ$ era sometido a hidrólisis ácida suave y luego tratado con fosfatasa alcalina, se obtenía un único compuesto de menor movilidad de $R_{\text{GlcA}} = 1,08$ (Fig. 19, panel C).

Claramente, el tratamiento ácido abrió un éster fosfórico cíclico formado durante el tratamiento alcalino para producir el oligosacárido-2-P. La fosfatasa alcalina pudo entonces actuar para dar P_i (indetectable con esta marcación), y el oligosacárido libre, cuya movilidad ($R_{\text{GlcA}} = 1,08$) resultó idéntica a la del compuesto c' obtenido por tratamiento ácido suave del "extracto 1203" (Figs. 17, paneles B y C). El compuesto x (Fig. 17, paneles B o C), tratado con ácido suave y posterior-

FIGURA 18

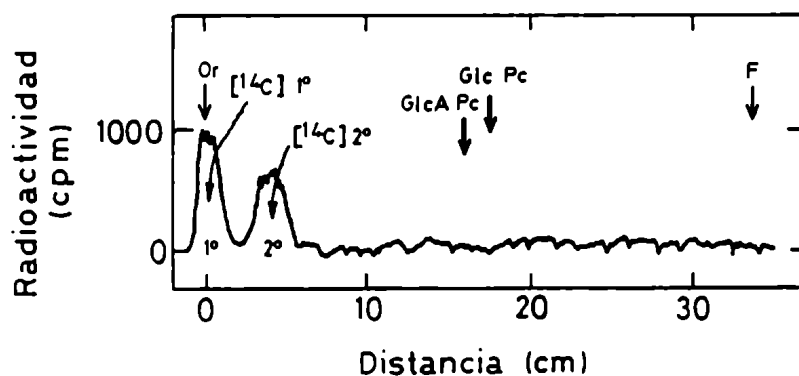


Figura 18: LABILIDAD AL ALCALI SUAVE DE LOS COMPUESTOS RADIOACTIVOS PRESENTES EN "Extracto 1203"

"Extracto 1203" (10.200 cpm), obtenido como se muestra en la Tabla VII (Exp. 2, radioactividad proveniente de UDP(¹⁴C)GlcA) se analizó por cromatografía ascendente en papel Whatman N° 1 durante 18 horas, utilizando el solvente A. GlcA-P_c: glucurónico fosfato cíclico; Glc-P_c: Glucosa-fosfato cíclico.

FIGURA 19

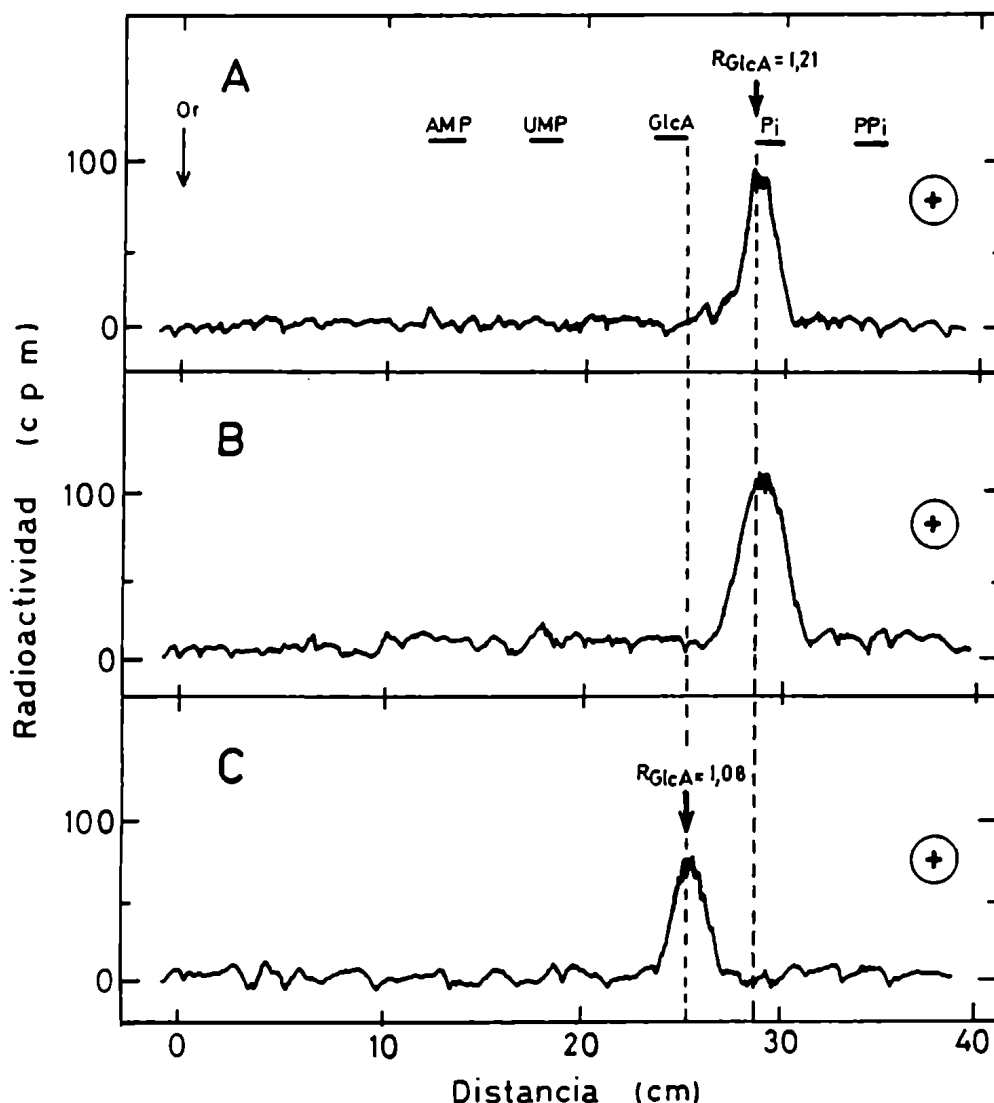


Figura 19: CARACTERIZACION PRELIMINAR DE OLIGOSACARIDOS FOSFODIESTERES CICLICOS

Material correspondiente al pico (^{14}C) 2 de la Fig. 18 (4.600 cpm) se eluyó del papel y se dividió en tres alícuotas que fueron tratadas del siguiente modo:

Panel A: Se electroforetizó tal cual en buffer B a 1.000 volts durante 3 horas sobre papel Whatman N°1.

Panel B: Se incubó con fosfatasa alcalina como se describe en Materiales y Métodos, y luego se sometió a electroforesis como en el caso anterior.

Panel C: Se sometió a hidrólisis en ácido clorhídrico 0.1 N a 100°C durante 5 minutos, se separó el exceso de ácido a baja presión, luego se trató con fosfatasa alcalina como se describe en Materiales y Métodos, y finalmente se sometió a electroforesis como en los casos anteriores.

mente con fosfatasa alcalina, también originó un único compuesto de igual movilidad (R_{GlcA} : 1.08, resultados no mostrados). Este resultado indicó que el compuesto x era un derivado cíclico del componente de R_{GlcA} : 1.08.

El material del pico (^{14}C)1° (marcado tanto con (^{14}C)Glc como con (^{14}C)GlcA) sometido a idéntico tratamiento y análisis, luego de defosforilación, produjo los compuestos b y c' (no mostrado).

Estos resultados indican que los materiales correspondientes a los picos (^{14}C)1° y (^{14}C)2° son oligosacáridos fosfodiésteres cíclicos, los cuales por defosforilación producen oligosacáridos de menor movilidad electroforética, e idéntica a la de los compuestos b y c'. Este último, al originarse tanto a partir de (^{14}C)1° como de (^{14}C)2° hizo sospechar que tal vez encubriera a dos compuestos. No se pudo detectar el éster fosfórico del compuesto a.

Asimismo, la labilidad en medio alcalino suave de los compuestos radioactivos extraíbles en "extracto 1203" sugiere que dichos oligosacáridos están unidos a la porción lipofílica (muy probablemente un prenol) a través de un puente difosfato.

IV.8.2.3 Fraccionamiento del material soluble en el "extracto 1203"

Otro modo de estudiar los compuestos radioactivos extraídos con "extracto 1203" fue fraccionar el mismo en columnas de DEAE-celulosa para soluciones lipofílicas. Dicho método había sido desarrollado por Dankert y colaboradores, para estudiar la síntesis del Antígeno-O en Salmonella (véase sección III.7.1), y se había utilizado previamente en nuestro laboratorio con los sistemas de Xanthomonas campestris (196) y Acetobacter xylinum (201).

Se emplearon "extractos 1203" con radioactividad proveniente de UDP(¹⁴C)GlcA, de UDP(¹⁴C)Glc y de beta(³²P)UDP(¹⁴C)Glc (Figs. 20,21 y 22, respectivamente). Puede observarse que los perfiles de elución prácticamente se superponen, distinguiéndose dos componentes mayoritarios, que eluyen a una concentración de acetato de amonio de 1 M (pico I) y de 1,4 M (pico II).

A juzgar por este criterio, en los tres casos, el grueso de la radioactividad está asociada al mismo grupo de compuestos. Las altas molaridades necesarias para eluir los dos componentes mayoritarios (picos I y II) coinciden con lo esperado, atendiendo a la densidad de carga existente en la unidad repetitiva del polisacárido cuya biosíntesis se investiga (Fig. 15, página 116).

FIGURA 20

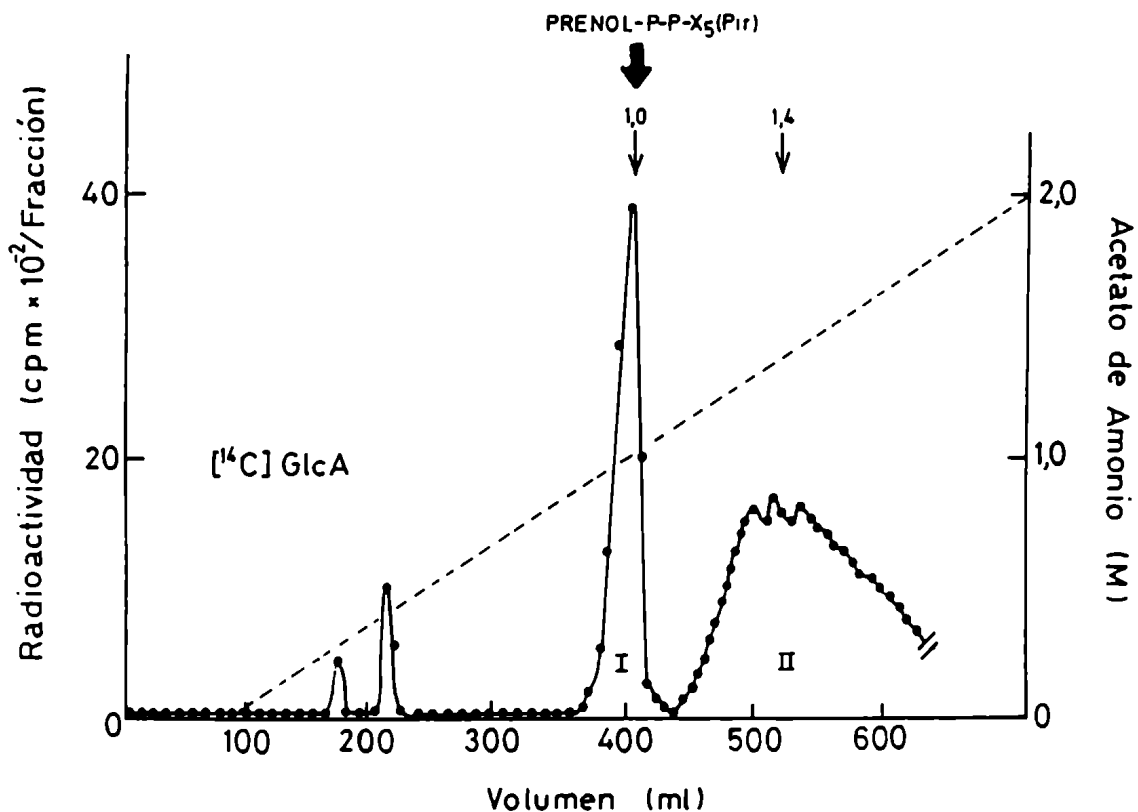


Figura 20: FRACCIONAMIENTO DEL MATERIAL RADIOACTIVO PRESENTE EN "Extracto 1203" EN COLUMNA DE DEAE-Cel.: radioactividad proveniente de UDP(¹⁴C)GlcA

"Extracto 1203" marcado con radioactividad proveniente de UDP(¹⁴C)GlcA (obtenido como en el caso de la Tabla VII, Exp. 2, 64.700 cpm) fue cromatografiado en columna de DEAE-celulosa para soluciones lipofílicas (sección III.7.1). Se colectaron fracciones de 3 ml y se midió radioactividad en 0.75 ml de cada fracción. La flecha llena indica la posición de elución de un prenil-difosfato-pentasacárido piruvilado de *Xanthomonas campestris* (prenil-P-P-X₅-Pir), eluído en una columna análoga (221).

FIGURA 21

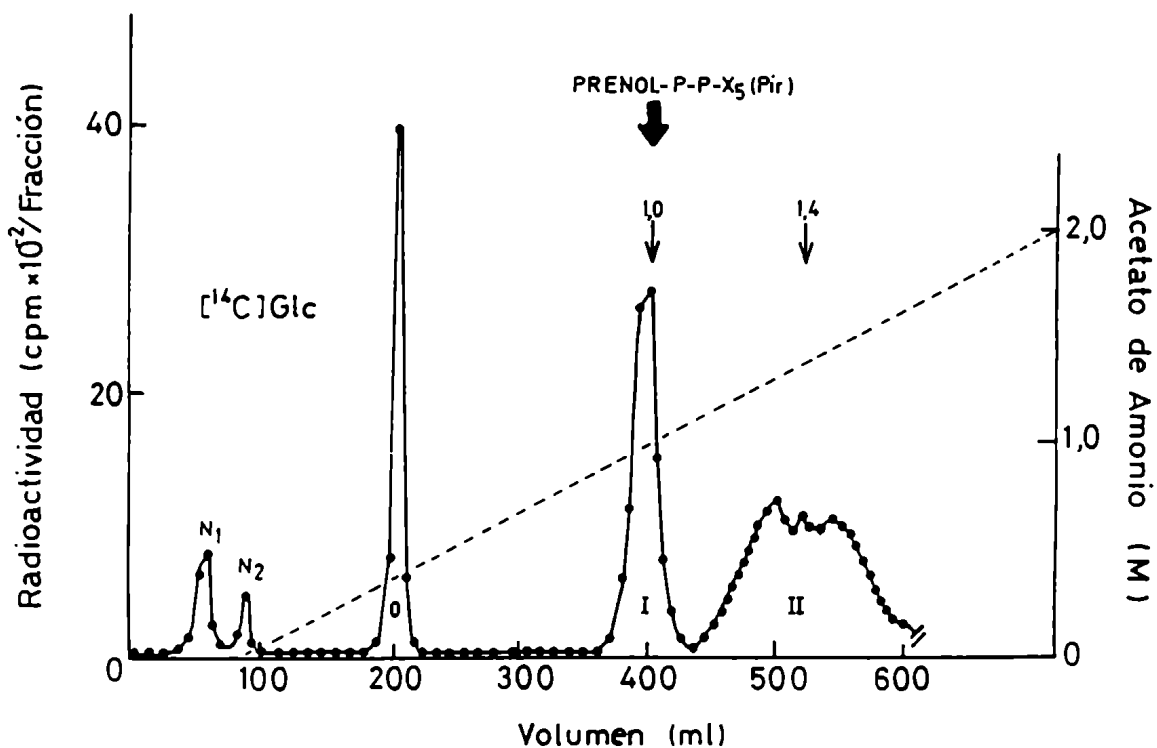


Figura 21: FRACCIONAMIENTO DEL MATERIAL RADIOACTIVO PRESENTE EN "Extracto 1203" EN COLUMNA DE DEAE-cel.: radioactividad proveniente de UDP(^{14}C)Glc

"Extracto 1203" marcado con radioactividad proveniente de UDP(^{14}C)Glc (obtenido como en el caso de la Tabla VII, Exp. 4, 74.700 cpm) fue cromatografiado en idénticos sistemas y condiciones que en el caso de la Fig. 20.

FIGURA 22

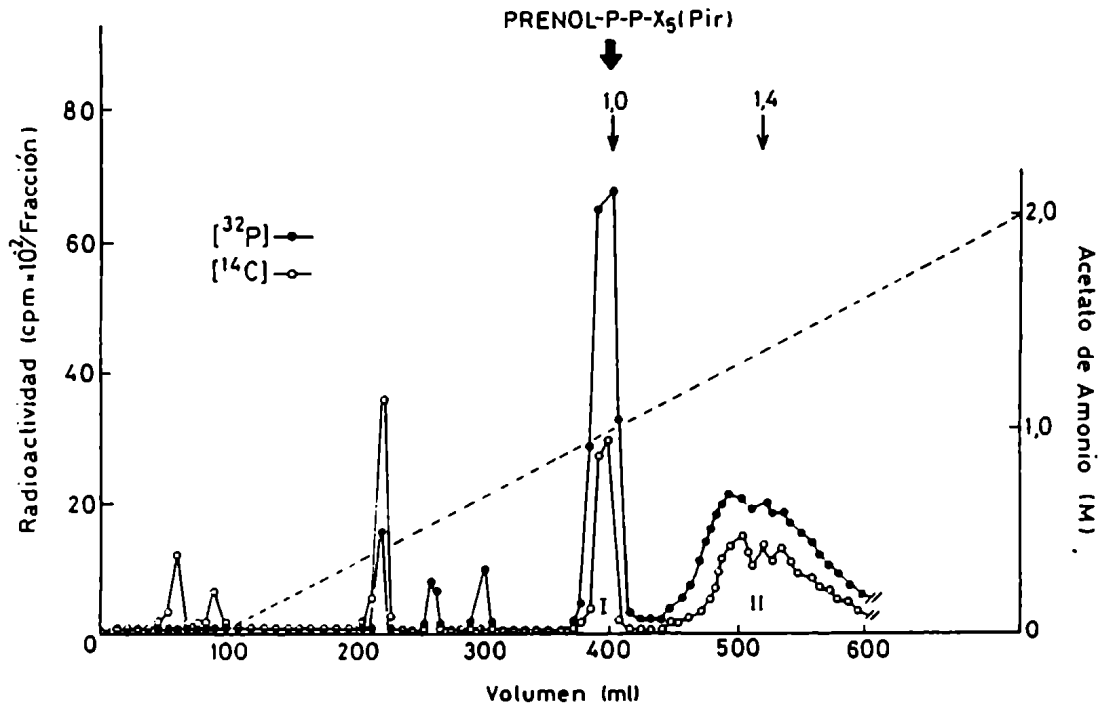


Figura 22: FRACCIONAMIENTO DEL MATERIAL RADIOACTIVO PRESENTE EN "Extracto 1203" EN COLUMNA DE DEAE-celulosa: radioactividad proveniente de beta(³²P)-UDP-(¹⁴C)Glc

El "Extracto 1203" (294.000 cpm en ¹⁴C y 252.000 dpm en ³²P), fue preparado en una incubación estándar, según se indica (sección III.7.1), pero utilizando esta vez como precursor radioactivo beta(³²P)UDP(¹⁴C)Glc (1.060 pmoles totales, AE en ³²P: 1.680 uc/umol, y AE en ¹⁴C: 243 uc/umol) y en presencia de UDP-GlcA (25.000 pmoles). El extracto intacto fue cromatografiado en idénticos sistemas y condiciones que en los casos que se muestran en las Figs. 20 y 21. Se colectaron fracciones de 3 ml. Se midió radioactividad en alícuotas de 0,75 ml de cada fracción utilizando los programas apropiados para cada marca en un contador de centelleo líquido Beckman modelo LS 8100.

IV.8.3 Estudios con oligosacáridos liberados por hidrólisis ácida suave

Como vimos en la sección anterior, el fraccionamiento del "extracto 1203" en columnas de DEAE-celulosa produjo solamente dos fracciones mayoritarias (picos I y II). Lamentablemente, dicho procedimiento presentaba el inconveniente de que los compuestos de nuestro interés se eluían con gran cantidad de sales, lo cual dificultaba su estudio posterior.

Vimos también (sección IV.B.2.1) que luego del tratamiento ácido del "extracto 1203", el análisis por electroforesis discriminaba al menos cuatro componentes negativamente cargados: a, b, c' y x (Fig. 17 B y C). Dada la inconveniencia mencionada con el análisis por DEAE-celulosa y la ventaja resolutive de la electroforesis en papel, se decidió fraccionar los oligosacáridos por este último procedimiento. Para asegurar la remoción de fosfato, se los trató con fosfatasa alcalina.

Se obtuvieron oligosacáridos marcados indistintamente con $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ o con $(^{14}\text{C})\text{GlcA}$.

IV.8.3.1 Fraccionamiento por electroforesis

Se prepararon "extractos 1203" con radioactividad proveniente de $\text{UDP}(^{14}\text{C})\text{GlcA}$ ó $\text{UDP}(^{14}\text{C})\text{Glc}$, luego se trataron con ácido suave y posteriormente con fosfatasa alcalina. Finalmente,

y de manera independiente para cada marcación, los oligosacáridos fueron aislados por electroforesis en papel.

Es necesario señalar que experimentos realizados en idénticas condiciones pero utilizando distintas partidas de enzimas no siempre produjeron los mismos compuestos.

En el perfil habitual (Fig. 23), se obtuvieron tres componentes: a, b y c'. Sus proporciones pudieron variar con la partida de enzima utilizada y en algunos casos a y b pudieron estar ausentes.

Los perfiles obtenidos fueron idénticos para ambas marcas, a excepción nuevamente de la presencia de un pico neutro (N) en el caso de oligosacáridos marcados con (^{14}C)Glc, ausente para el caso de oligosacáridos marcados con (^{14}C)GlcA (Fig. 23, paneles A y B, respectivamente). Habíamos mencionado (secciones IV.B.2.1 y IV.B.3.1) que *Rhizobium trifolii*, además del exopolisacárido en estudio, produce un/os glucano/s extracelular/es y que la formación de compuestos neutros fue atribuida a este/estos último/s. Es necesario mencionar que empleando esta técnica (tratamiento ácido del "extracto 1203", defosforilación y aislamiento por electroforesis en papel), no se observó el compuesto x, el cual había sido caracterizado como un oligosacárido fosfodiéster cíclico.

Los resultados (Fig. 23, paneles A y B) muestran la ausencia del oligosacárido fosfodiéster cíclico de movilidad

FIGURA 23

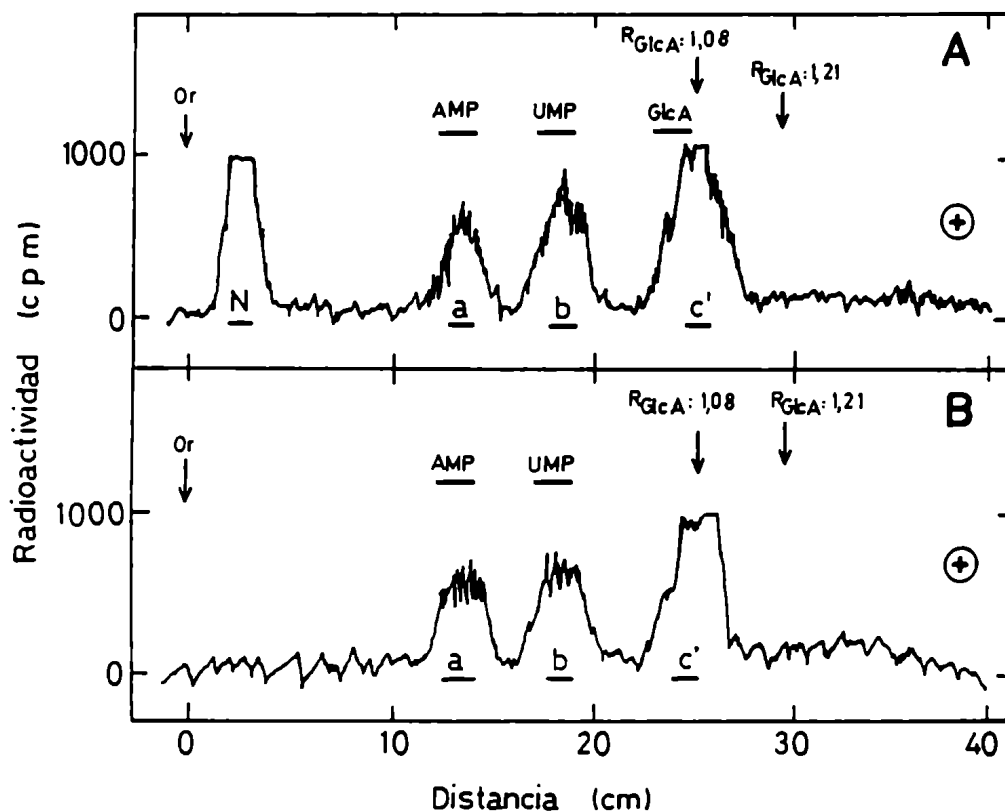


Figura 23: ELECTROFORESIS DE LOS COMPUESTOS RADIOACTIVOS LIBERADOS POR HIDROLISIS ACIDA SUAVE DEL "Extracto 1203"

Panel A: "Extracto 1203" (27.400 cpm) con radioactividad proveniente de UDP(¹⁴C)Glc (1.000 pmoles) obtenido en presencia de UDP-GlcA (25.000 pmoles), fue sometido a hidrólisis en ácido clorhídrico 0.01 N a 100°C durante 10 minutos. Se eliminó el exceso de ácido a baja presión y se trató con fosfatasa alcalina como se describe en Materiales y Métodos. Finalmente, el material se electroforetizó sobre papel Whatman N°1 a 1.000 volts durante 3 horas utilizando el solvente B.

Panel B: "Extracto 1203" (18.300 cpm) con radioactividad proveniente de UDP(¹⁴C)GlcA (1.000 pmoles) y obtenido en presencia de UDP-Glc (25.000 pmoles) fue tratado y analizado como en el caso anterior.

$R_{GlcA} = 1,21$ (compuesto x de la Fig. 17), que convenientemente tratado con fosfatasa alcalina, produjo el componente c' de movilidad $R_{GlcA} = 1,08$ (véase también las figuras 17, paneles B y C; y 19, panel C).

Dicho componente c' presentaba la característica de ser mayoritario, ya fuera marcado tanto con $(^{14}C)GlcA$ como con $(^{14}C)Glc$, y por su movilidad electroforética parecía ser no muy grande. Con el objeto de conocer el tamaño aparente, todos estos compuestos fueron analizados por filtración en columnas de geles.

IV.B.3.2 Fraccionamiento por filtración en columnas de geles

Los componentes a y b filtrados en columnas de Bio-Gel P₂ se comportaron como compuestos puros, sus volúmenes de elución fueron ligeramente diferentes y correspondieron al tamaño esperado para octasacáridos (Figs. 24 y 25, respectivamente). En cambio, el componente c' se resolvió en dos compuestos: el compuesto c, cuyo tamaño aparente fue ligeramente mayor al de b, y el compuesto d, el cual eluyó inmediatamente antes que el trisacárido rafinosa utilizado como estándar (Fig. 26). Estos resultados fueron idénticos para los oligosacáridos a, b o c', con marca en $(^{14}C)Glc$.

FIGURA 24

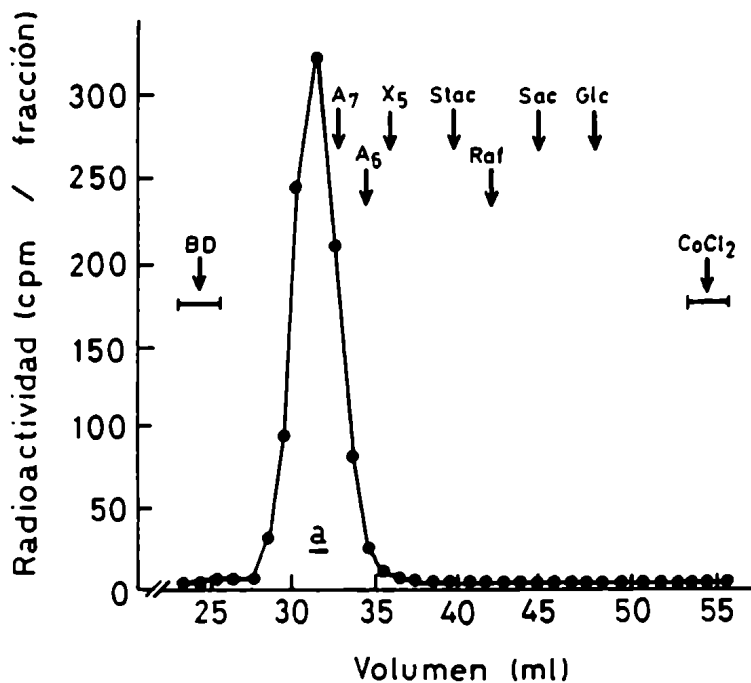


Figura 24: FILTRACION DEL COMPONENTE a EN COLUMNA DE Bio-Gel P₂

Componente a con marca en (¹⁴C)GlcA (2.900 cpm), eluido del papel del pico homónimo (Fig. 23B), fue cromatografiado en columna de Bio-Gel P₂ como se describe en Materiales y Métodos. Las flechas indican los volúmenes de elución de los siguientes estándares: glucosa (Glc), sacarosa (Sac), rafinosa (Raf), estaquirosa (Stac), pentasacárido de Xanthomonas campestris (X₅) (64,221); hexasacárido de Acetobacter xylinum (A₆) y heptasacárido de Acetobacter xylinum (A₇) (203,204).

FIGURA 25

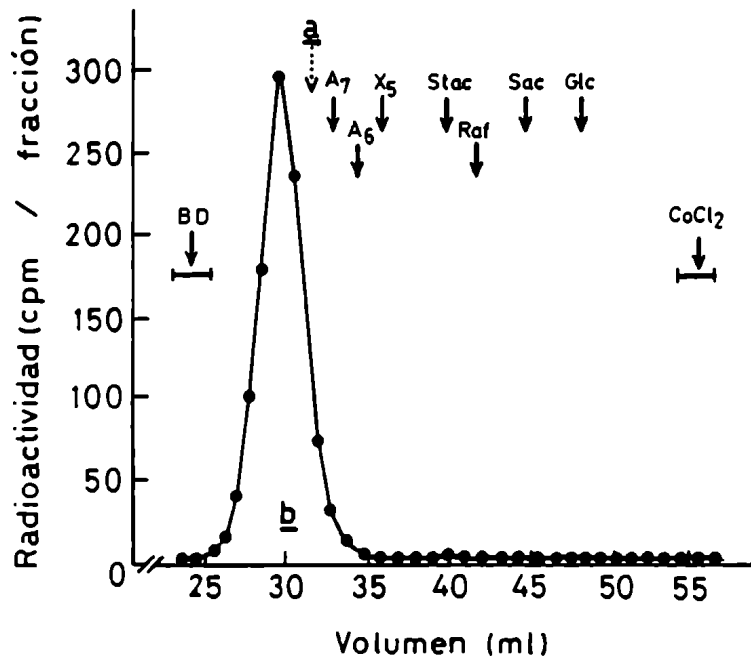


Figura 25: FILTRACION DEL COMPONENTE b EN COLUMNA DE Bio-Gel P₂

Componente b con marca en (¹⁴C)GlcA (2.700 cpm) eluído del papel del pico homónimo (Fig. 23B), fue cromatografiado como en el caso anterior (Fig. 24). Las flechas llenas indican los mismos estándares que en el caso mostrado en la Fig. 24. La flecha de líneas de puntos indica el volumen de elución del compuesto a con marca en (¹⁴C)GlcA ó en (¹⁴C)Glc.

FIGURA 26

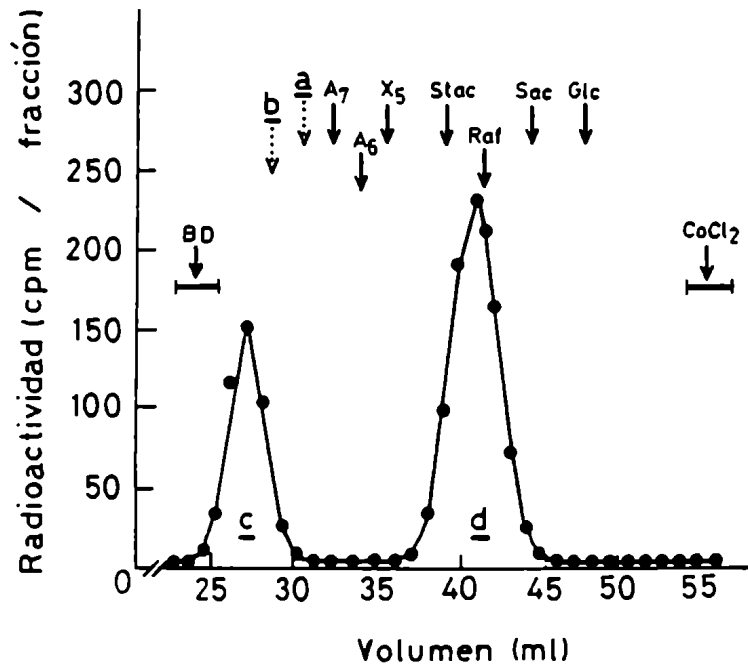


Figura 26: FILTRACION DEL COMPONENTE c' EN COLUMNA DE Bio-Gel P₂

Componente c' con marca en (¹⁴C)GlcA (4.100 cpm), eluído del papel del pico homónimo (Fig. 23B), fue cromatografiado como en los casos anteriores (ver Fig. 24). Las flechas de líneas de puntos indican los volúmenes de elución de los compuestos a y b con marca en (¹⁴C)GlcA ó en (¹⁴C)Glc.

IV.8.3.3 Oligosacáridos obtenidos a partir de las fracciones I y II de las columnas de DEAE-celulosa

Se realizaron experimentos con el objeto de comprender la relación existente entre las dos fracciones mayoritarias aisladas en columnas de DEAE-celulosa (picos I y II, Figs. 20, 21 y 22), y los oligosacáridos defosforilados aislados por electroforesis en papel (picos a, b y c', Fig. 23, paneles A y B).

Para ello, los materiales correspondientes a los picos I y II fueron independientemente desalados y luego sometidos a hidrólisis ácida a fin de liberar las porciones sacarídicas del lípido. Para asegurar la remoción de fosfato, se trataron con fosfatasa alcalina. Finalmente, los oligosacáridos provenientes de cada pico fueron analizados por electroforesis en papel.

Los resultados (Fig. 27) muestran que el material radioactivo proveniente del pico I produjo un solo compuesto y con la movilidad de c': $R_{G1cA} = 1,08$ (panel A). Dicho compuesto, filtrado en columnas de geles, eluyó en una posición idéntica a la del compuesto d (no mostrado).

El material proveniente del pico II, luego del tratamiento ácido, liberó una mezcla de oligosacáridos que, por electroforesis en papel, se resolvió en los compuestos a, b, y un tercer compuesto que también tuvo la movilidad del c' (panel B). Estos tres compuestos, filtrados en columnas de geles, eluyeron

FIGURA 27

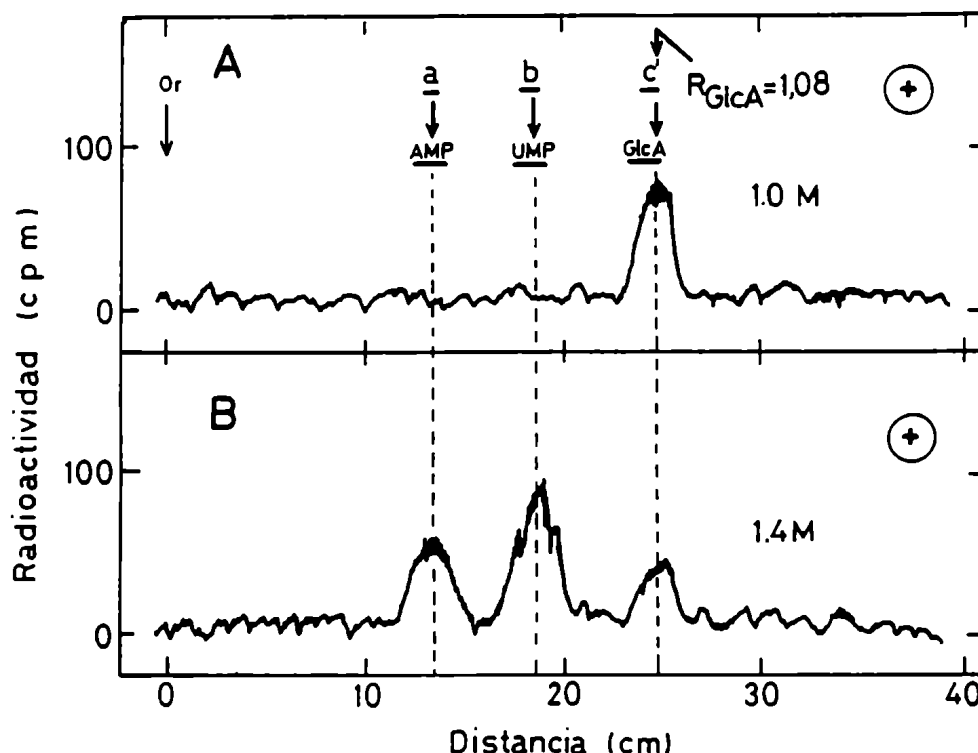


Figura 27: OLIGOSACARIDOS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS PICOS I Y II (columnas de DEAE-celulosa)

Los materiales correspondientes a los picos I y II que se muestran (Fig. 20) fueron tratados de la siguiente forma. Se empaquetó una columna con resina Dowex 50 x 8/H⁺ equilibrada en metanol 99% que contenía el doble de la resina calculada para cada pico (4,6 gramos y 6,7 gramos de acetato de amonio en los picos I y II, respectivamente). Luego de filtrar ambas fracciones, se separó el metanol y parte del acético liberado en evaporador rotatorio conectado a una bomba de vacío de agua, y posteriormente se sometió cada fracción a hidrólisis ácida en ClH 0.1 N a 100°C durante 5 minutos. Se llevó a seco para eliminar el ácido, y seguidamente, el material se trató con fosfatasa alcalina como se describe (sección III.6.1), y se electroforetizó sobre papel Whatman 3 MM a 1.000 volts durante un período de 3 horas, utilizando el solvente B. Los compuestos radioactivos fueron eluidos del papel y se sometieron a una nueva electroforesis en iguales condiciones que la anterior, pero utilizando esta vez papel Whatman N°1 (Panel A: fracción 1 M, pico I. Panel B: fracción 1.4 M, pico II). Las flechas indican las movilidades de los componentes a, b ó c con marca en (¹⁴C)GlcA ó en (¹⁴C)Glc.

en las posiciones esperadas para los oligosacáridos a, b y c, respectivamente (no mostrado).

Atendiendo a la alta concentración de sales (1.4 M) necesaria para eluir el compuesto c (cuando aún está unido a lípido), sin duda dicho oligosacárido posee mayor carga que el compuesto d, el cual (unido a lípido) se eluye a una concentración salina menor (1 M).

IV.B.4 Caracterización del compuesto d

Habíamos dicho anteriormente que los productos obtenidos por incubación in vitro variaban según el preparado enzimático utilizado (sección IV.B.2.1).

Dicha conclusión se obtuvo al observar que los componentes a, b y c' fraccionados por electroforesis en papel luego del tratamiento del "extracto 1203" con ácido suave, se presentaron en diferente proporción, y en ocasiones a y b pudieron estar ausentes. No obstante esta variación, el componente c' fue mayoritario con todos los preparadas enzimáticos utilizados y con cualquiera de las marcaciones empleadas ((¹⁴C)Glc o (¹⁴C)GlcA).

Por otra parte, el componente c' analizado por filtración en columna de geles se resolvió en el oligosacárido c (cuyo volumen de elución fue ligeramente mayor que un octasacárido), y el oligosacárido d (el cual eluyó con el tamaño aparente de un trisacárido) (sección IV.B.2.2).

El componente d resultó así el más pequeño de los compuestos obtenidos y se lo eligió entonces para iniciar la caracterización de los oligosacáridos sintetizados in vitro.

IV.B.4.1 Composición del compuesto d

Acerca del compuesto d, sabíamos que:

- Cuando este oligosacárido estaba aún unido al lípido, se eluía de una columna de DEAE-celulosa a una concentración 1 M de acetato de amonio. A esta concentración eluye también un pentasacárido-difosfato-prenol de *Xanthomonas campestris* utilizado como estándar y que posee dos restos carboxilo (sección IV.B.1.2.3).
- La marcación de los compuestos radioactivos solubles en "extracto 1203" con radioactividad proveniente de beta(³²P)UDP-Glc pero no de beta(³²P)UDP-GlcA, era un fuerte indicio de que el extremo reductor del (o de los) oligosacárido/s era glucosa (sección IV.B.1.1). Esta presunción estaba además reforzada por el aislamiento de oligosacáridos fosfodiésteres cíclicos marcado con (¹⁴C) proveniente de UDP(¹⁴C)Glc (sección IV.B.1.2.2). Asimismo, pudo demostrarse también la incorporación conjunta de (¹⁴C) y (³²P), mediante el fraccionamiento por columna de DEAE-celulosa del "extracto 1203" obtenido utilizando como precursor radioactivo beta(³²P)UDP(¹⁴C)Glc (sección IV.B.1.2.3, Fig. 22).

- Se marcaba con (^{14}C)Glc o con (^{14}C)GlcA y su movilidad electroforética en buffer B (R_{GlcA} : 1,08), hacía suponer un tamaño no muy grande (sección IV.B.2.1).
- Por filtración en columna de geles, eluía con el tamaño aparente de un trisacárido (sección IV.B.2.2).

Faltaba confirmar la presencia de glucosa en el extremo reductor del compuesto d y caracterizar además los otros componentes del mismo.

IV.B.4.1.1 Extremo reductor del compuesto d

Hidrólisis ácida total del compuesto d, obtenido con radioactividad proveniente de UDP(^{14}C)Glc, produjo glucosa como único compuesto radioactivo. No se detectó galactosa por cromatografía en papel utilizando el solvente d (no mostrado). Con el objeto de confirmar que por lo menos parte de la glucosa ocupaba el extremo reductor, se procedió como se describe a continuación.

Se preparó el compuesto d utilizando para ello como precursor radioactivo UDP-Glc doblemente marcado en (^{32}P) y (^{14}C), y el extracto obtenido se fraccionó en columna de DEAE-celulosa (Fig. 22). Se procedió de este modo para tener la certeza de que el oligosacárido en estudio se había construido desde el extremo reductor y no era consecuencia de un alargamiento de un monosacárido u oligosacárido aceptor endógeno.

El material correspondiente al pico I (Fig. 22) fue desalado e hidrolizado en medio ácido suave. La muestra se trató posteriormente con fosfatasa alcalina y se sometió a una primera electroforesis en papel, lo cual permitió visualizar dos componentes, aunque pobremente resueltos debido a la abundante cantidad de sales presentes (no mostrado).

Los componentes aislados fueron eluidos y, de manera independiente, sometidos a una segunda electroforesis en el mismo sistema.

Los resultados de la segunda electroforesis mostraron también dos únicos productos: uno de ellos resultó indistinguible del componente d (Fig. 28, panel A) y otro cuya movilidad coincidió con la del estándar interno de Pi (Fig. 28, panel B).

El componente d (Fig. 29, panel A) fue eluido del papel y analizado por filtración en columna de geles: como era de esperar eluyó inmediatamente antes que el trisacárido rafinosa utilizado como estándar (no mostrado).

El material se redujo entonces con BH_4Na . La muestra se sometió luego a hidrólisis ácida total y finalmente se analizó el producto por electroforesis en papel. Se utilizó como solvente buffer molibdato de sodio, un sistema que permite separar con toda claridad glucosa de sorbitol.

Los resultados (Fig. 29, panel A) muestran que el grueso de la radioactividad comigró con el estándar interno de

FIGURA 28

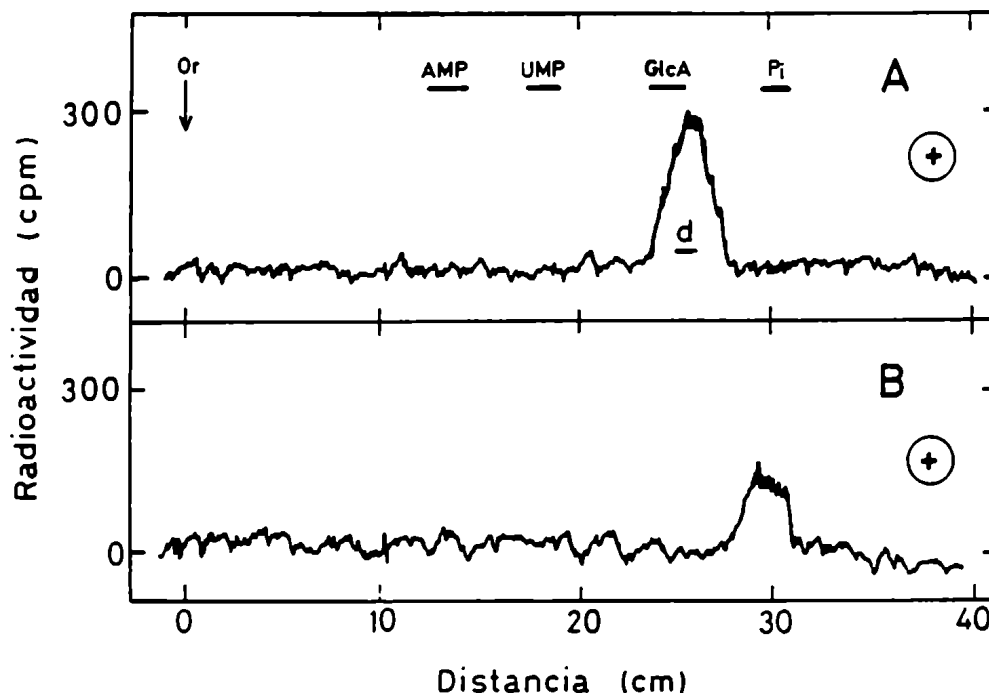


Figura 28: ANALISIS DEL PICO I DOBLEMENTE MARCADO CON (^{32}P) y (^{14}C).

El material correspondiente al pico I que se muestra en la Fig. 22 fue tratado de la siguiente manera. Se empaquetó una columna con resina Dowex 50 x 8/ H^+ equilibrada en metanol 99%, que contenía el doble de la resina calculada (4,6 gramos de acetato de amonio en el pico I). Luego de filtrar la fracción, se separó el metanol y parte del ácido acético en evaporador rotatorio conectado a una bomba de vacío de agua y posteriormente se sometió a hidrólisis ácida en ClH 0,1 N a 100°C durante 5 minutos. Se llevó a seco con el fin de eliminar el ácido, luego se trató con fosfatasa alcalina como se describe (sección III.6.1), y se electroforetizó sobre papel Whatman 3 MM a 1.000 voltios durante un período de 3 horas utilizando el solvente B (no mostrado). Los compuestos radioactivos fueron eluidos del papel y, de manera independiente, se sometieron a una nueva electroforesis en iguales condiciones que la anterior pero utilizando esta vez papel Whatman N°1 (paneles A y B).

FIGURA 29

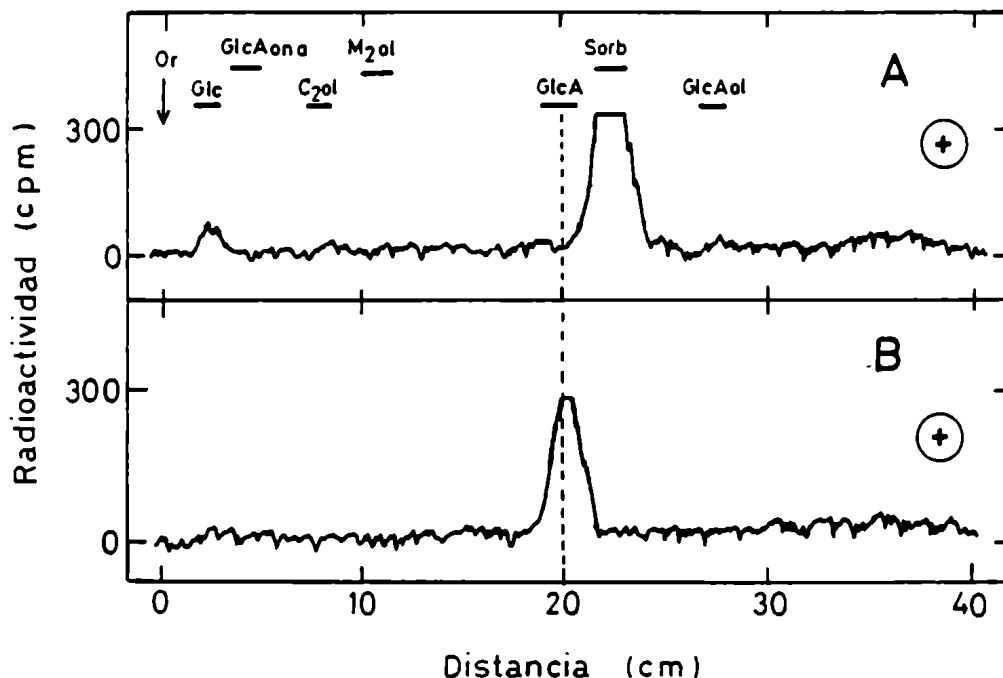


Figura 29: EXTREMO REDUCTOR Y COMPOSICION DEL compuesto d.

Panel A: El material correspondiente al pico d con marca en (¹⁴C)Glc (6.900 cpm) (Fig. 28, panel A) fue reducido con BH₄Na durante una noche. Se agregó resina Dowex H⁺ 50 x 8 hasta pH:3.5, y el borato se separó con metanol. Posteriormente, el material reducido se sometió a hidrólisis total en ClH 1 N a 100°C durante 24 horas. Seguidamente, se separó el exceso de ácido a baja presión y finalmente la muestra se sometió a electroforesis sobre papel Whatman N° 1 durante 2 1/2 horas utilizando el solvente E.

Panel B: Se preparó compuesto d con marca en (¹⁴C)GlcA (4.270 cpm) y luego se redujo con BH₄Na durante 1 noche. Se separó el exceso de BH₄Na como en el caso anterior, y luego la muestra se trató con glucosidasa según se indica (sección III.6.2). Finalmente, el material se sometió a electroforesis en idéntico sistema y condiciones que en el caso anterior.

sorbitol. El pequeño pico en la zona del estándar de glucosa no resultó significativo, y podría indicar reducción incompleta.

Los resultados de esta sección permiten concluir que el trisacárido d posee una sola glucosa y que ésta ocupa el extremo reductor.

IV.B.4.1.2 Presencia de restos glucurónicos en el compuesto d

IV.B.4.1.2.1 Caracterización de ácido glucurónico

En el punto anterior, demostramos que la única glucosa que posee el trisacárido d, ocupa su extremo reductor. Con el objeto de caracterizar los otros componentes de dicho oligosacárido, se preparó el trisacárido d con radioactividad proveniente de UDP(¹⁴C)GlcA, se redujo con BH₄Na, y se estudió la composición del trisacárido reducido mediante digestión con glusulasa de intestino de caracol y subsecuente análisis del material digerido por electroforesis en papel.

Al proceder de este modo, contábamos además con una contraprueba del experimento que venimos de analizar (Fig. 29, panel A): si, como vimos, el extremo reductor era glucosa, no debía aislarse (¹⁴C)glucuronitol.

La glusulasa fue preparada en nuestro laboratorio y consiste en una mezcla de enzimas glicolíticas, entre ellas una con actividad de beta-glucuronidasa. Se decidió utilizar la digestión enzimática, debido a que la degradación química podía producir compuestos neutros cuya caracterización resultó dificultosa. Mediante análisis por cromatografía en papel, utilizando el solvente D, pudo determinarse que dichos compuestos neutros tenían diferente comportamiento que un estándar de xilosa (no mostrado).

Decíamos entonces que, luego de la digestión con glucosidasa, la muestra se analizó por electroforesis en papel: se obtuvo un solo compuesto cuya movilidad coincidió con la del estándar interno de ácido glucurónico. No se detectó (^{14}C)Glucuronitol (Fig. 29, panel B).

Los resultados de esta sección, conjuntamente con los de la sección anterior, permiten concluir que el compuesto d posee por lo menos un resto glucurónico, y además una única glucosa, la cual ocupa el extremo reductor.

IV.B.4.1.2.2 Reducción del compuesto $d(^{14}\text{C})\text{GlcA}$ a un compuesto neutro

Con el fin de continuar la caracterización del compuesto d, se redujo dicho compuesto a uno neutro. Para ello, se preparó compuesto d con marca en (^{14}C)GlcA, se esterificó con EDC/metanol (EDC: 1-etil-3-(3 dimetil-amino-propil) carbodiimida) y posteriormente se sometió a reducción con BH_4Na . Así, el o los restos carboxilo afectados se transforman en alcoholes, y el azúcar en la hexosa neutra correspondiente.

Luego de la reducción, el producto se analizó por electroforesis en papel, donde se comportó como un único compuesto neutro (Fig. 30), y por lo tanto diferente al compuesto no reducido (de R_{GlcA} : 1,08). Una alícuota de compuesto neutro, fue sometida a hidrólisis ácida total, y los productos se analizaron

FIGURA 30

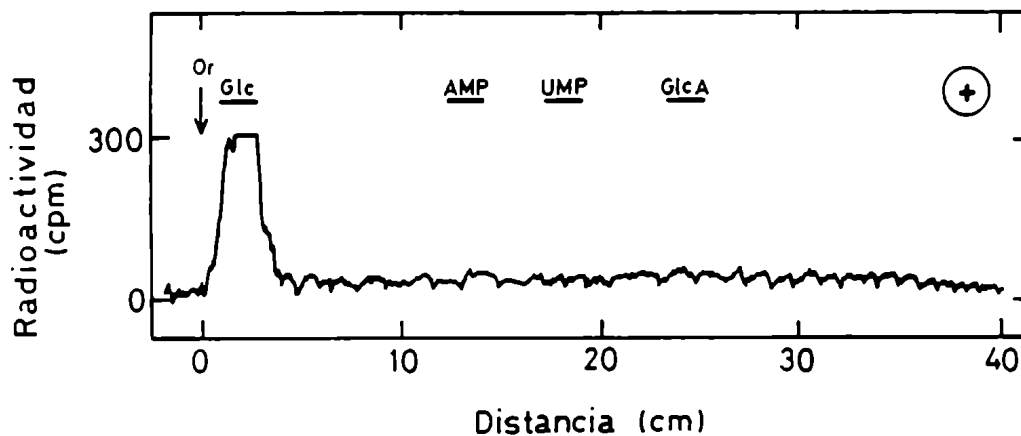


Figura 30: ELECTROFORESIS DEL COMPUESTO $d(^{14}\text{C})\text{GlcA}$ REDUCIDO

El compuesto $d(^{14}\text{C})\text{GlcA}$ (3.400 cpm) fue totalmente reducido en sus grupos carboxílicos con EDC/metanol/ BH_4Na , según se detalla (sección III.4.6) durante un período de 14 horas. Posteriormente, el material se electroforetizó sobre papel Whatman N°1 a 1.000 voltios durante un período de 3 horas, utilizando el solvente 3.

por cromatografía en papel: se observó un único compuesto cuya movilidad resultó ser la del estándar interno de glucosa (Fig. 31). No se detectaron otros azúcares neutros, descartando así la posible conversión de GlcA a GalA o ManA, por ejemplo.

Con el objeto de verificar el tamaño del compuesto reducido, otra alícuota se analizó por filtración en columna de geles: como era de esperar, se obtuvo un único compuesto que eluyó inmediatamente antes que el trisacárido rafinosa utilizado como estándar (Fig. 32). Esta posición resultó idéntica a la del compuesto d sin reducir.

Asimismo, dicho compuesto neutro analizado por cromatografía en placa delgada, también se comportó como un producto único cuya movilidad resultó indistinguible de la de un estándar interno de celotriitol: $\text{Glc} \xrightarrow{\beta} 4\text{Glc} \xrightarrow{\beta} 4\text{Glc}$ (Fig. 33, panel A).

Todos estos resultados reforzaron la idea de que el compuesto d era un trisacárido, y que los enlaces glicosídicos eran beta, $1 \rightarrow 4$, pues el maltotriitol tiene movilidad diferente (Fig. 33, panel A). Por otra parte, la sensibilidad a la glucosidasa (Fig. 29, panel B) ya sugería una configuración beta. Asimismo, el trisacárido d(^{14}C)GlcA, reducido en sus grupos carboxilos con EDC/metanol/ BH_4Na fue completamente digerido con beta-glucosidasa, y por este tratamiento produjo un único compuesto radioactivo: (14)Glucosa (Fig. 33, paneles B y C).

FIGURA 31

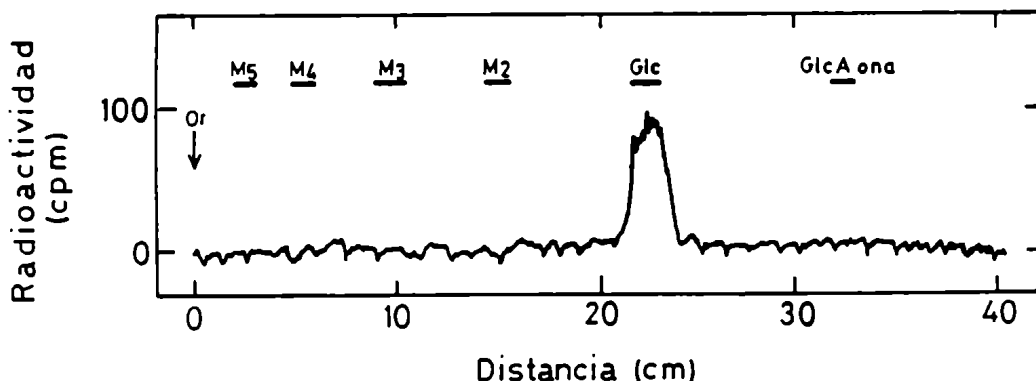


Figura 31: CROMATOGRAFIA DEL PRODUCTO DE HIDROLISIS TOTAL DEL COMPUESTO NEUTRO (obtenido por reducci3n del compuesto d(¹⁴C)GlcA).

El compuesto neutro (Fig. 30), fue eluido del papel y una alícuota del mismo (1.700 cpm) se sometió a hidrólisis ácida total en ClH 1 N a 100°C durante 24 horas. Luego se separó el exceso de ácido a baja presión utilizando un evaporador rotatorio y el producto se analizó por cromatografía en papel Whatman N° 1 durante 36 horas, utilizando el solvente D. Maltopentosa (M₅), maltotetrosa (M₄), maltotriosa (M₃), maltosa (M₂), glucosa (Glc), glucuronolactona (GlcAona).

FIGURA 32

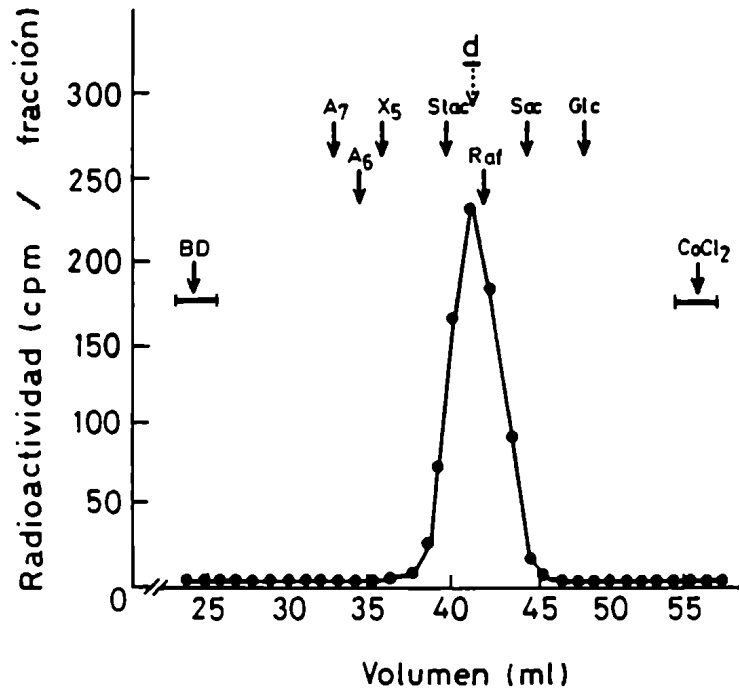


Figura 32: FILTRACION POR Bio-Gel P₂ DEL COMPUESTO NEUTRO OBTENIDO POR REDUCCION DEL trisacárido d(¹⁴C)GlcA.

El compuesto neutro (Fig. 30) fue eluído del papel, y una alícuota del mismo (1.700 cpm) fue filtrada en columna de Bio-Gel P₂ (sección III.7.2). Se midió la totalidad de cada fracción (0.5 ml), previamente concentrada hasta un volumen de 50 ul. Las flechas indican los volúmenes de elución de los siguientes compuestos: estaquirosa (Stac), trisacárido d (d), rafinosa (Raf), sacarosa (Sac) y glucosa (Glc).

FIGURA 33

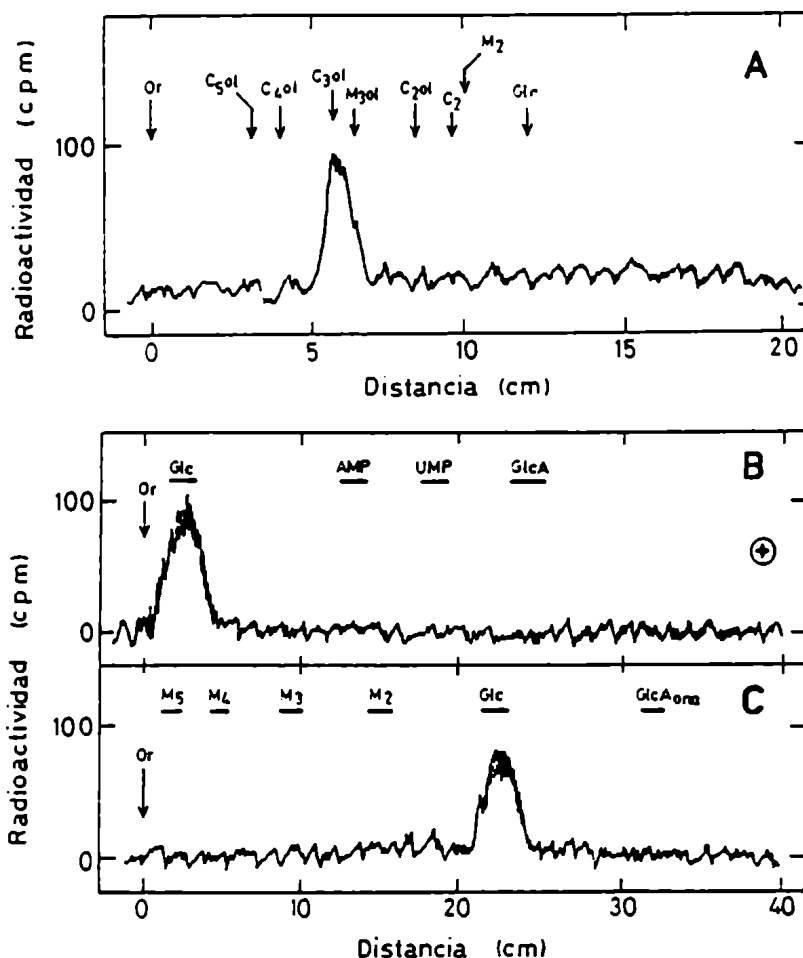


Figura 33: CROMATOGRAFIA EN PLACA DELGADA DEL TRISACARIDO NEUTRO OBTENIDO POR REDUCCION DEL compuesto d(¹⁴C)GlcA Y ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE DIGESTION CON beta-GLUCOSIDASA DEL TRISACARIDO REDUCIDO

Panel A: El compuesto neutro (Figura 30) fue eluido del papel y una alícuota del mismo (1.100 cpm) fue cromatografiada intacta en placas de TLC "Kieselgel 60" Merck, utilizando el solvente J. Celopentitol (C₅ol), celotetritol (C₄ol), maltotritol (M₃ol), celotritol (C₃ol), celobiitol (C₂ol), celobiosa (C₂) y maltosa (M₂).

Panel B: Otra alícuota del compuesto d(¹⁴C)GlcA completamente reducido (1.270 cpm) se trató con beta-glucosidasa según se detalla (sección III.6.4). Finalmente, el material radioactivo se electroforetizó sobre papel Whatman N° 1 a 1.000 volts durante un período de 3 horas, utilizando el solvente B.

Panel C: El material correspondiente al pico que se muestra (esta figura, panel B) fue eluido del papel y analizado por cromatografía en papel Whatman N° 1 durante 36 horas, utilizando el solvente D. Glucuronolactona (GlcAona).

Nota: Los experimentos aquí mostrados fueron realizados en colaboración con la Dra. Nora Iñón de Iannino.

IV.B.4.1.3 Número de restos glucurónicos en el compuesto d:
reducción parcial del compuesto d(¹⁴C)GlcA

Demostramos previamente que el trisacárido d(¹⁴C)GlcA posee ácido glucurónico (sección IV.B.4.1.2.1) y que por reducción del (los) grupo(s) carboxilo(s) produjo un trisacárido neutro (sección IV.B.4.1.2.2) que luego de hidrólisis ácida total originó (¹⁴C)glucosa como único compuesto radioactivo (sección IV.B.4.1.2.2).

Con el objeto de determinar el número de restos glucurónicos presentes en el compuesto d, se preparó dicho oligosacárido con marca en (¹⁴C)GlcA, y el mismo se sometió a reducción parcial de los grupos carboxilos. Esto se logró tratando el producto esterificado en presencia de EDC con BH₄Na a distintos tiempos. Los productos fueron analizados por electroforesis en papel, y la fracción reducida durante un período de 3 horas permitió aislar tres compuestos: uno neutro (es decir, el producto de reducción total), otro que conservó la movilidad original de R_{GlcA}: 1,08 (compuesto no reducido), y un tercer compuesto con movilidad intermedia entre los dos primeros de R_{UMP}: 0,76 (Fig. 34, panel A).

Se estudió la composición de este tercer compuesto (en la figura, compuesto B). Para ello, se eluyó del papel, se digirió con glucosidasa y los productos se analizaron por electroforesis utilizando idéntico sistema y condiciones que en el

FIGURA 34

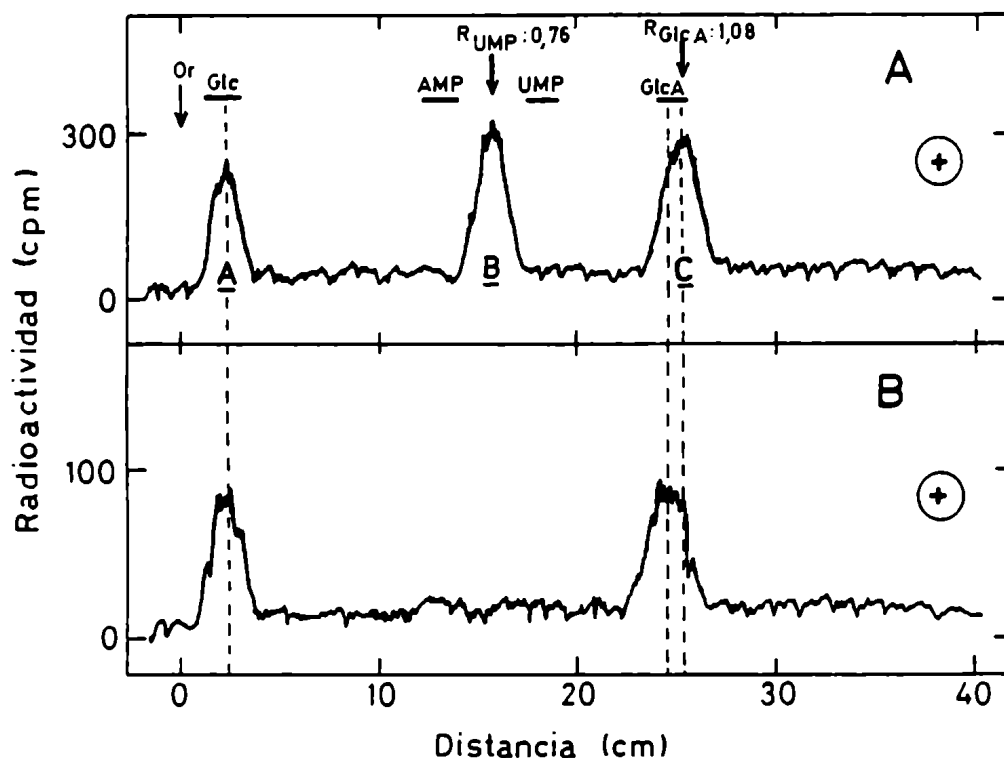


Figura 34: REDUCCION PARCIAL DEL trisacárido $d(^{14}\text{C})\text{GlcA}$

Panel A: El trisacárido $d(^{14}\text{C})\text{GlcA}$ (7.800 cpm) fue parcialmente reducido en sus grupos carboxilos con EDC/metanol/ BH_4Na , según se detalla (sección III.4.6) durante un período de 3 horas. El material se electroforesizó sobre papel Whatman N° 1 a 1.000 voltios, durante un período de 3 horas, utilizando el solvente B.

Panel B: El material correspondiente al pico B (esta figura, panel A) se eluyó del papel y se digirió con glucosidasa de intestino de caracol según se indica (sección III.6.2) durante un período de 24 horas. Finalmente, el material radioactivo se analizó por electroforesis en papel, como en el caso anterior. Glucosa (Glc), ácido glucurónico (GlcA).

Nota: Los experimentos aquí mostrados fueron realizados en colaboración con la Dra. Nora Iñón de Iannino.

caso anterior: se obtuvieron dos compuestos cuyas movilidades coincidieron con las de los estándares de glucosa y ácido glucurónico, y en relación 1:1 (Fig. 34, panel B). Dichas asignaciones fueron confirmadas por cromatografía en papel utilizando el solvente D (no mostrado).

Estos resultados mostraron claramente la existencia de solamente dos restos glucurónicos en el compuesto d. Asimismo, ya habíamos establecido que dicho compuesto posee una sola glucosa en el extremo reductor (sección IV.B.4.1.1), certificando así que se trata de un trisacárido.

IV.B.4.1.4 Posición de los enlaces en el trisacárido d

Con el objeto de determinar si el trisacárido d era lineal o ramificado, se estudió la posición de los enlaces glicosídicos mediante estudios de permetilación utilizando la técnica de Hakomori.

Resultados anteriores sugirieron que se trataba de un oligosacárido lineal con uniones beta,1→4, pues su producto de reducción total se comportaba como el estándar de celotriitol (sección IV.B.4.1.2.2).

Se estudiaron los productos permetilados del trisacárido d obtenido con marca tanto en (^{14}C)Glc como en (^{14}C)GlcA.

IV.B.4.1.4.1 Permetilación del trisacárido d con marca en (¹⁴C)Glc

Se preparó y aisló trisacárido d con marca en (¹⁴C)Glc, se permetiló, el material permetilado se hidrolizó y los productos se analizaron por cromatografía en placa delgada.

Los resultados mostraron un único compuesto metilado indistinguible de un estándar interno de 2,3,6 tri-O-Me-Glc (Fig. 35). Esto significa que la glucosa presente en el trisacárido d, la cual ocupa el extremo reductor, está sustituida en posición 4 por uno de los restos glucurónicos.

Asimismo, dado que no se aisló un derivado disustituido, este resultado es también una evidencia de que el oligosacárido d es un trisacárido lineal.

IV.B.4.1.4.2 Permetilación del trisacárido d con marca en (¹⁴C)GlcA

El trisacárido d con marca en (¹⁴C)GlcA, fue sometido a una primera permetilación. Seguidamente, se redujeron con BH₄Na los metilésteres formados. En este caso resultó innecesario el empleo de EDC/metanol (sección IV.B.4.1.2.2), con el objeto de esterificar los carboxilos previamente a la reducción.

En resumen, los dos restos glucurónicos fueron transformados en glucosa, con el alcohol del carbono 6 no permetilado.

FIGURA 35

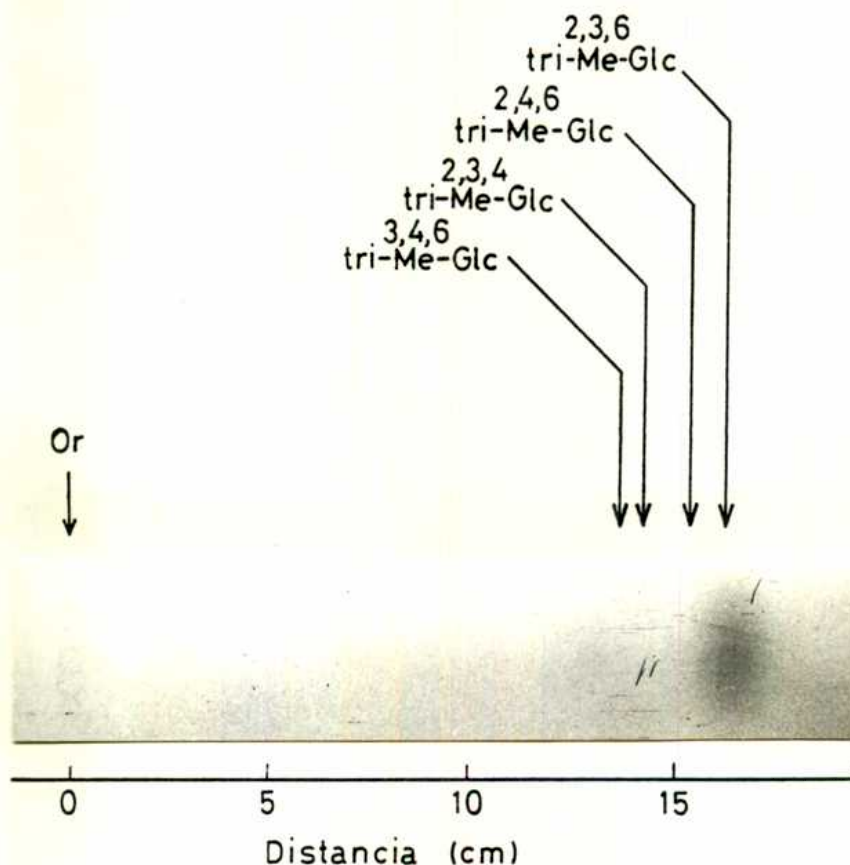


Figura 35: PERMETILACION DEL trisacárido $d(^{14}\text{C})\text{Glc}$.

El trisacárido d con marca en $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ (3.200 cpm), se permetiló según la técnica de Hakomori (ver Materiales y Métodos). El material permetilado se hidrolizó en ampolla cerrada con ClH 1 N a 100°C durante 4 horas. Se separó el exceso de ácido a baja presión en evaporador rotatorio, y finalmente el producto fue analizado por cromatografía en placas de gel de sílice Merck "Kieselgel 60". Se utilizó el solvente H y se dejó desarrollar durante 3 horas. Finalmente, el material se reveló por autorradiografía, durante un período de 21 días, utilizando película Kodak X-OMAT.

Este material se repermethyló, se hidrolizó y finalmente los productos fueron analizados por cromatografía en capa delgada.

Se siguió esta técnica pues solo se contaba con los derivados metilados de glucosa para utilizar como compuestos de referencia. Por otra parte, los derivados tri y tetra-metil-sustituídos son más fáciles de separar por cromatografía en placa delgada que los di-sustituídos. La aparición de un oxhidrilo libre en posición 6 no hubiera introducido una ambigüedad en la asignación de las distintas uniones glicosídicas, pues su origen era obviamente el carboxilo del respectivo resto glucurónico, pero su fraccionamiento habría resultado más dificultoso.

Los resultados indicaron la presencia de dos únicos productos metilados, en relación de 0,7:1. Dichos compuestos comigraron respectivamente con los estándares internos de 2,3,6 tri-0-Me-Glc, proveniente del glucurónico sustituido; y de 2,3,4,6 tetra-0-Me-Glc, proveniente del glucurónico terminal (Fig. 36).

Estos resultados confirmaron una vez más la existencia de dos restos glucurónicos en el oligosacárido d y permitieron concluir que dicho compuesto es un trisacárido lineal en el que la glucosa que ocupa el extremo reductor está sustituida en posición 4 por el primer resto glucurónico y éste, sustituido en posición 4 por el segundo resto glucurónico. Es decir, se trata del compuesto: $\text{GlcA} \rightarrow 4\text{GlcA} \rightarrow 4\text{Glc}$.

FIGURA 36

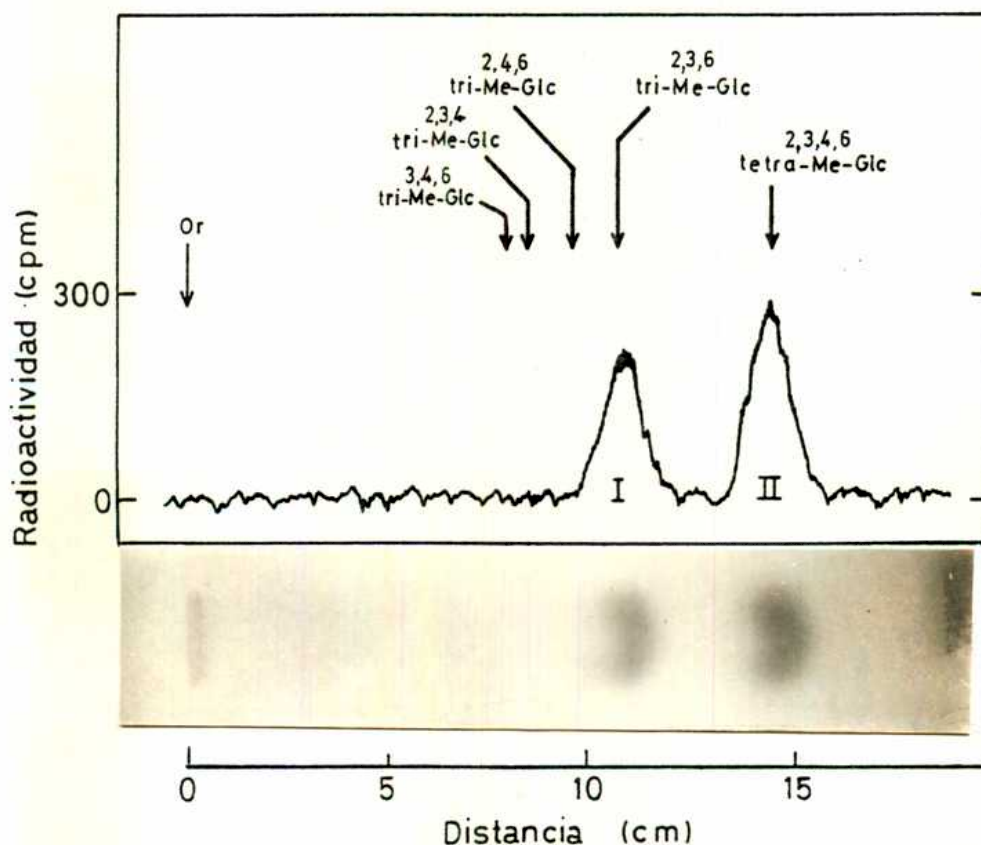


Figura 36: PERMETILACION DEL trisacárido $d(^{14}\text{C})\text{GlcA}$.

El trisacárido d con marca en $(^{14}\text{C})\text{GlcA}$ (12.400 cpm) fue permetilado según la técnica de Hakomori (sección III.4.7). El material permetilado se redujo con BH_4Na durante una noche. Se añadió resina Dowex H^+ 50 x 8 hasta $\text{pH}:3.5$, y el ácido bórico formado se eliminó con metanol a baja presión utilizando un evaporador rotatorio. El material reducido se repermetiló utilizando la técnica anterior, y luego se hidrolizó en ampolla cerrada con ClH 1 N a 100°C durante 4 horas. El producto fue analizado por cromatografía en placas de gel de sílice Merck "Kieselgel 60". Se utilizó el solvente H y se dejó desarrollar durante 2 horas y 15 minutos. Finalmente, el material se reveló por autorradiografía durante un período de 10 días, utilizando película Kodak X-OMAT.

La estructura propuesta justifica lo observado con el trisacárido d reducido tanto en sus carboxilos como en su extremo reductor: se comportaba como el trisacárido lineal celotriitol, el cual posee enlaces glicosídicos beta, 1 → 4 (sección IV.B.4.1.2.2). Por otra parte, el trisacárido d podía ser degradado por la glucosidasa, que contiene actividad de beta-glucuronidasa.

Por lo tanto, puede asegurarse la configuración beta para cada uno de los dos enlaces glicosídicos del trisacárido d. Es decir, que se trata del trisacárido:



Este compuesto es parte de la estructura propuesta para la unidad repetitiva del exopolisacárido cuyo sistema de síntesis se investiga (véase Fig. 15, página 116).

IV.B.4.2 Fraccionamiento del compuesto d en d₁ y d₂

Como vimos más arriba, el tratamiento del "extracto 1203" con ácido suave liberó una mezcla de oligosacáridos que, fraccionada por electroforesis en papel, se resolvió en los componentes a, b y c' (sección IV.B.3.1). El componente c', analizado por filtración en columna de geles, se resolvió en dos compuestos: uno de ellos (compuesto c) eluyó con el tamaño aparente de un octa o nonasacárido, y otro (compuesto d), cuyo volumen de elución resultó ligeramente mayor que el del trisacárido rafinosa utilizado como estándar (sección IV.B.3.2).

El trisacárido d pudo además obtenerse por tratamiento ácido suave del material del pico I (sección IV.B.3.3).

Dicho trisacárido resultó un compuesto homogéneo mediante la caracterización empleada más arriba (sección IV.B.4). Asimismo, el análisis de dicho componente por HPLC (del inglés: High Performance Liquid Chromatography), en buffer fosfato mostró un único pico, aunque ligeramente asimétrico (Fig. 37).

Sin embargo, el trisacárido d analizado por cromatografía en papel se resolvió en por lo menos dos compuestos: d₁ y d₂ (Fig. 38). Idénticos resultados se obtuvieron al analizar el trisacárido d obtenido a partir del material proveniente del pico I aislado en columnas de DEAE-celulosa (no mostrado).

FIGURA 37

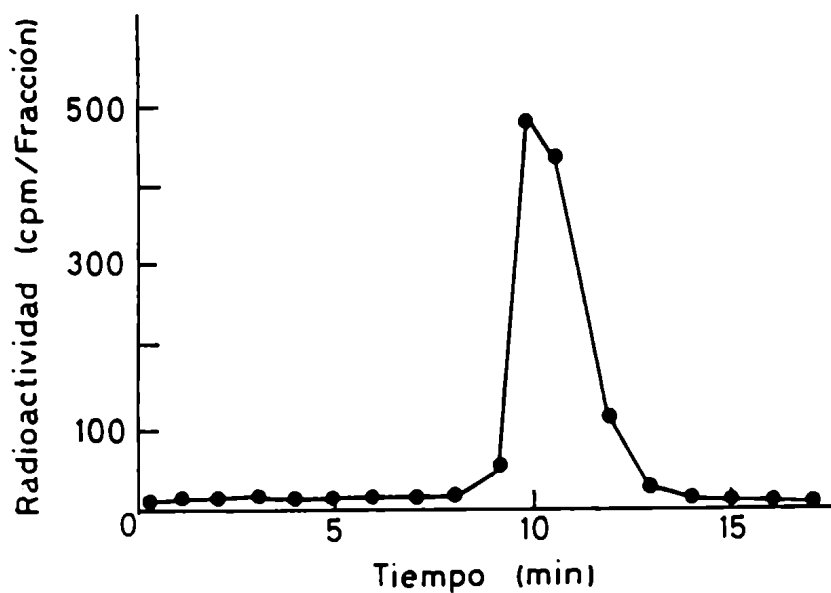


Figura 37: ANALISIS DEL componente d por HPLC.

Compuesto d marcado con (^{14}C)GlcA (2.370 cpm) fue analizado por HPLC, (del inglés: high-performance liquid chromatography), utilizando para ello una columna de Lichrosorb-NH₂ (10 u/partícula/4,6 x 20 mm), en buffer fosfato 0.1 M con un flujo de 1 ml/min. Se utilizó un colector Frac-100 Pharmacia, y se midió radioactividad en la totalidad de cada fracción (0,5 ml) utilizando solución de Bray (249).

FIGURA 38

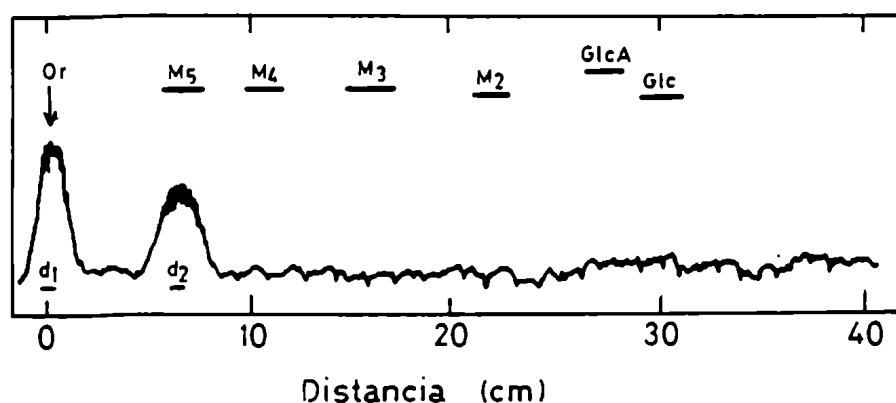


Figura 38: FRACCIONAMIENTO DEL componente d.

Compuesto d marcado con (^{14}C)GlcA (3.700 cpm) fue cromatografiado en papel Whatman N°1, utilizando el solvente D, durante un período de 3 días. Los estándares utilizados fueron: ácido glucurónico (GlcA), maltopentosa (M_5), maltotetraosa (M_4), maltotriosa (M_3), maltosa (M_2) y glucosa (Glc). La mezcla de oligosacáridos estándares fue obtenida como describen Behrens y Tábora (sección III.7.3).

IV.B.4.3 Presencia de restos acilo en el compuesto d₂

Atendiendo a los datos del grupo de Albersheim, que atribuye un resto acetilo para la unidad repetitiva del polisacárido cuyo sistema de síntesis se investiga (157), se consideró que el oligosacárido d₂ (Fig. 38) podría estar acilado.

A fin de confirmar o descartar esta hipótesis, el compuesto d₂ se eluyó del papel, se trató con álcali suave y finalmente se cromatografió en el mismo sistema.

Los resultados indicaron un cambio de movilidad, dado que pasó a comportarse como el compuesto d₁ (Fig. 39, paneles A y B). Esto sugirió que el compuesto d₂ era el homólogo acilado del d₁.

Los resultados fueron idénticos partiendo del componente d marcado con (¹⁴C)Glc (no mostrado). Asimismo, el componente d liberado por hidrólisis ácida suave del material del pico I (columnas de DEAE-celulosa, sección IV.B.2.3), también reprodujo los resultados antedichos (no mostrado).

Estos resultados indicaron además que en el preparado enzimático utilizado existían dadores endógenos de restos acilos, y las enzimas capaces de transferirlos.

FIGURA 39

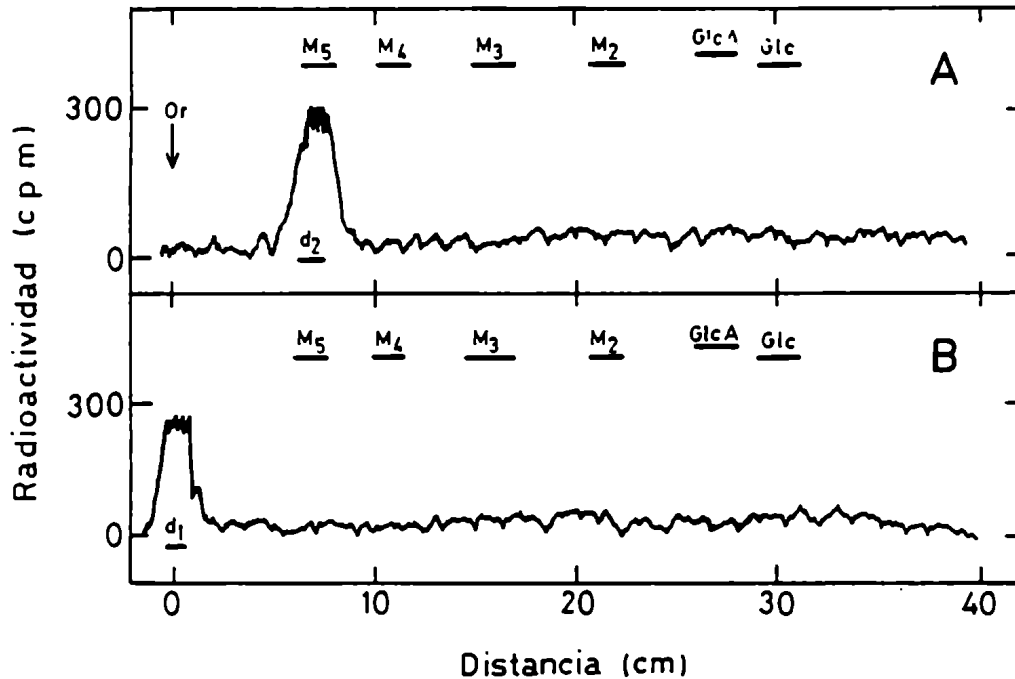


Figura 39: DEACILACION DEL compuesto d₂.

Panel A: El compuesto d₂ con marca en (¹⁴C)GlcA fue aislado como se describió previamente (Fig. 38); se eluyó del papel y una alícuota (2.100 cpm) fue cromatografiada intacta en papel Whatman N°1, utilizando el solvente D, por un período de 3 días.

Panel B: Otra alícuota (2.100 cpm) fue sometida a deacilación en medio alcalino suave. Para ello, la muestra fue solubilizada en 100 ul de HONa 60 mM. Se agitó con vórtex y se dejó a temperatura ambiente durante un período de 20 minutos. La reacción se detuvo por el agregado de resina Dowex/H⁺ 50 x 8 hasta lograr un pH ácido. Se agitó con vórtex y se realizaron 3 lavados con 200 ul de agua cada vez. Se juntaron los lavados y posteriormente la muestra se concentró en evaporador rotatorio. Finalmente, el material se cromatografió en idénticos sistemas y condiciones que para el caso anterior.

Los estándares utilizados fueron: ácido glucurónico (GlcA), maltopentosa (M₅), maltotetraosa (M₄), maltotriosa (M₃), maltosa (M₂) y glucosa (Glc).

IV.B.4.4 Naturaleza del resto acilo en el compuesto d2

Como dijimos anteriormente (Sección II.2), trabajos previos en nuestro laboratorio con *Xanthomonas campestris* permitieron demostrar que, en la biosíntesis del exopolisacárido en dicho sistema, la acetilación ocurre a nivel de prenil-fosfoazúcares, y que el dador es Acetil-CoA (216). En vista de los resultados obtenidos con el sistema de *Rhizobium trifolii* NA-30 (sección IV.B.4.3), pareció razonable emprender un estudio similar en nuestro caso.

Con el fin de verificar o descartar si existía acetilación in vitro, se incubó preparado enzimático utilizando (^{14}C)Acetil-CoA como precursor radioactivo. En estas condiciones también hubo incorporación de radioactividad a compuestos solubles en "extracto 1203". En presencia de UDP-Glc y UDP-GlcA no radioactivos, dicha incorporación se estimuló en un 60% (Tabla IX).

Los "extractos 1203" obtenidos fueron sometidos a hidrólisis ácida suave y posteriormente, el material fue tratado con fosfatasa alcalina. Finalmente, los oligosacáridos defosforilados fueron fraccionados por electroforesis en papel.

Se obtuvo un perfil idéntico al observado al fraccionar en el mismo sistema oligosacáridos marcados con (^{14}C)Glc (a excepción del pico N, Fig. 23, panel A) o con (^{14}C)GlcA (Fig. 23,

TABLA IX

INCORPORACION DE RADIOACTIVIDAD PROVENIENTE DE (¹⁴C)Acetil-CoA a "Extracto 1203"

Exp.	Radiactivo	Dador	No radiactivo	Radioactividad en extracto 1203 (pmoles/mg prot)
1	(¹⁴ C)Acetil-CoA		-	11,5
2	(¹⁴ C)Acetil-CoA		UDP-Glc + UDP-GlcA	18,4

Tabla IX: Las incubaciones fueron realizadas en condiciones estándar como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 119 uM (¹⁴C)Acetil-CoA (1-(¹⁴C)Acetil-CoA AE:56,6 Ci/mol). En el caso del experimento 2 se agregaron además como precursores no radiactivos UDP-Glc (25.000 pmoles) y UDP-GlcA (25.000 pmoles).

FIGURA 40

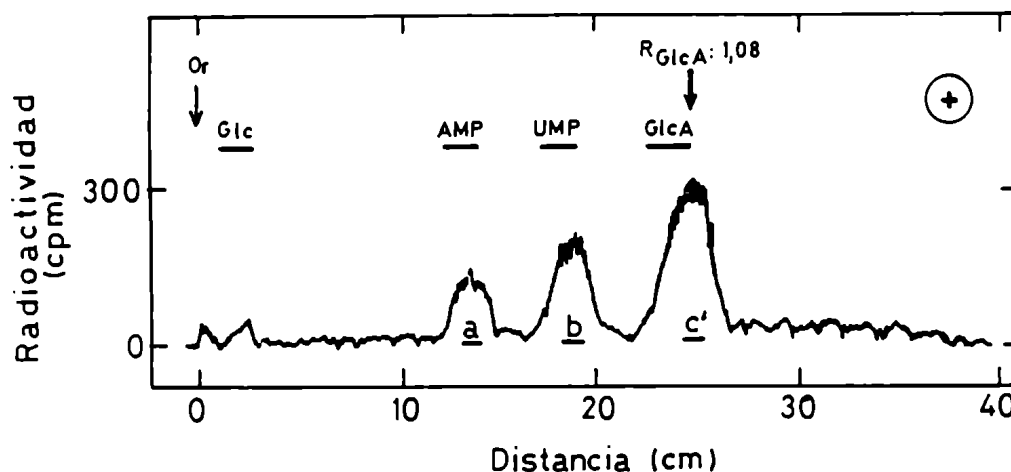


Figura 40: ELECTROFORESIS EN PAPEL DE OLIGOSACARIDOS MARCADOS CON (¹⁴C)Acetato.

"Extracto 1203" marcado con radioactividad proveniente de (¹⁴C)Acetil-CoA (7.100 cpm), obtenido como se indica (Tabla IX, Exp. 1 ó 2), fue sometido a hidrólisis ácida suave en ClH 0.01 N a 100°C durante 10 minutos, y posteriormente se trató con fosfatasa alcalina como se indica en Materiales y Métodos. Finalmente, el material se electroforetizó sobre papel Whatman N°1 a 1.000 volts durante 3 horas utilizando el solvente B.

panel B). Es decir que también por éste criterio, la radioactividad incorporada al "extracto 1203" proveniente de (^{14}C)Acetil-CoA y liberada por tratamiento ácido suave estuvo asociada a los mismos componentes: a, b y c' (Fig. 40).

El perfil que se muestra (Fig. 40), fue obtenido indistintamente a partir de "extractos 1203" provenientes de incubaciones realizadas con o sin el agregado de nucleótido-azúcares exógenos, aunque, como dijimos, la incorporación de radioactividad proveniente de (^{14}C)Acetil-CoA se estimuló en presencia de UDP-Glc y UDP-GlcA. Estos resultados indican una vez más la existencia de precursores y aceptores endógenos presentes en los preparados enzimáticos utilizados.

El material correspondiente al pico c' (Fig. 40), se analizó por filtración en columna de geles. Los resultados muestran que se resolvió en dos compuestos: uno de ellos eluyó con un volumen aparente idéntico al compuesto c obtenido con marca tanto en (^{14}C)Glc como en (^{14}C)GlcA (Fig. 41, pico c(^{14}C)Acetilo), y otro resultó indistinguible del componente d obtenido con marca tanto en (^{14}C)Glc como en (^{14}C)GlcA (Fig. 41, pico d(^{14}C)Acetilo).

Es necesario señalar que la diferencia entre los volúmenes de elución de los compuestos d₁ y d₂ es mínima, y solo fue posible fraccionarlos por cromatografía en papel (véase sección IV.B.4.2).

FIGURA 41

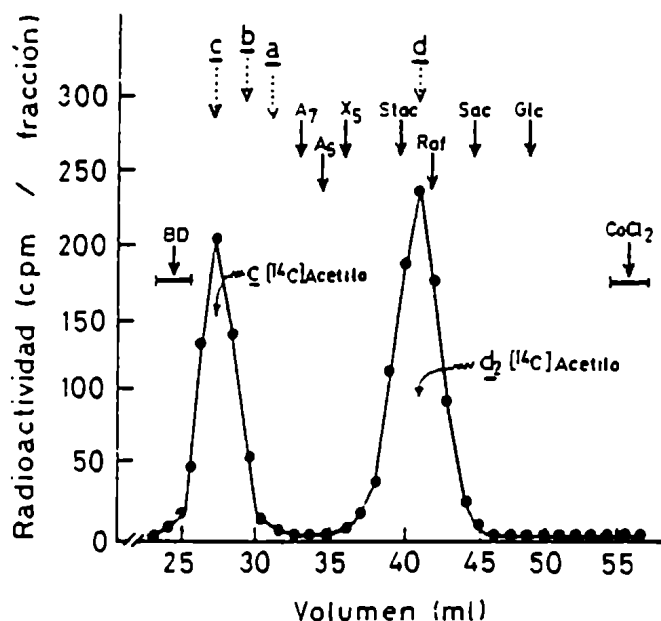


Figura 41: FRACCIONAMIENTO DEL componente c' MARCADO CON (^{14}C)Acetilo.

El material correspondiente al pico c' (Fig. 40, 3.400 cpm) fue cromatografiado en columna de Bio-Gel P_2 (sección III.7.2). Los estándares indicados con las flechas llenas son los mismos que en el caso mostrado previamente (Fig. 24). Las flechas de líneas de puntos indican las posiciones de elución de los compuestos a, b, c y d marcados tanto en (^{14}C)Glc como en (^{14}C)GlcA.

FIGURA 42

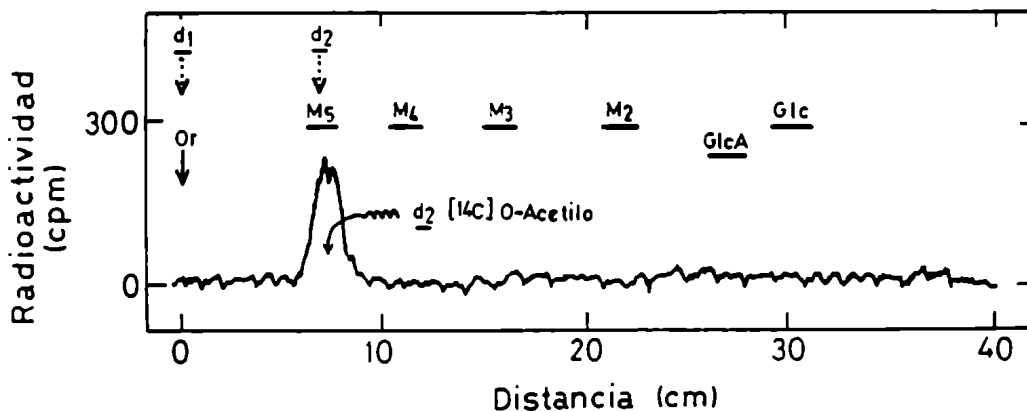


Figura 42: CARACTERIZACION DEL compuesto d₂ (^{14}C)O-Acetilo.

Material correspondiente al pico d (^{14}C)Acetilo (2.100 cpm), fue cromatografiado en papel Whatman N° 1, utilizando el solvente D, durante un período de 3 días. Las flechas de líneas de puntos indican las posiciones de los compuestos d₁ y d₂ marcados tanto en (^{14}C)Glc como en (^{14}C)GlcA.

Por el momento, nos ocuparemos solamente del pico d(¹⁴C)Acetilo. El análisis de los picos a(¹⁴C)Acetilo, b(¹⁴C)Acetilo y c(¹⁴C)Acetilo, se desarrollará más adelante (sección IV.B.6).

El material correspondiente al pico d(¹⁴C)Acetilo (Fig. 41) se analizó por cromatografía en papel: se obtuvo un único compuesto indistinguible del oligosacárido d₂ obtenido con marca tanto en (¹⁴C)Glc como en (¹⁴C)GlcA, es decir, el derivado acilado del trisacárido d₁, confirmando así que el resto acilo presente en d₂ es un acetilo (Fig. 42).

IV.B.4.5 Posición del resto O-Acetilo en el trisacárido d₂

Consideramos que un modo de estudiar el problema era aprovechar la diferencia entre los trisacáridos d₁ y d₂ (la presencia del resto O-Acetilo en d₂) y someterlos a digestión con glucosidasa (sección IV.B.4.1.2.1, Fig. 30), con la idea de que dicha diferencia resultaría en una degradación enzimática diferencial.

Si esto era así, en cada caso los productos finales de digestión serían diferentes. De esta manera, mediante el análisis de dichos productos, si alguno de ellos estaba acetilado,

podríamos definir la posición o bien acotar la posición del resto 0-acetilo en el trisacárido d₂.

IV.B.4.5.1 Degradación enzimática del trisacárido d₁

El trisacárido d₁ marcado con (¹⁴C)GlcA degradado con glucosidasa fue digerido hasta monosacáridos: toda la radioactividad comigró con el estándar interno de ácido glucurónico (Fig. 43, paneles A y B).

Asimismo, el trisacárido d₁ obtenido con marca en (¹⁴C)Glc y sometido a idéntico tratamiento, produjo un único compuesto radiactivo: (¹⁴C)Glucosa (Fig. 44, paneles A y B).

FIGURA 43

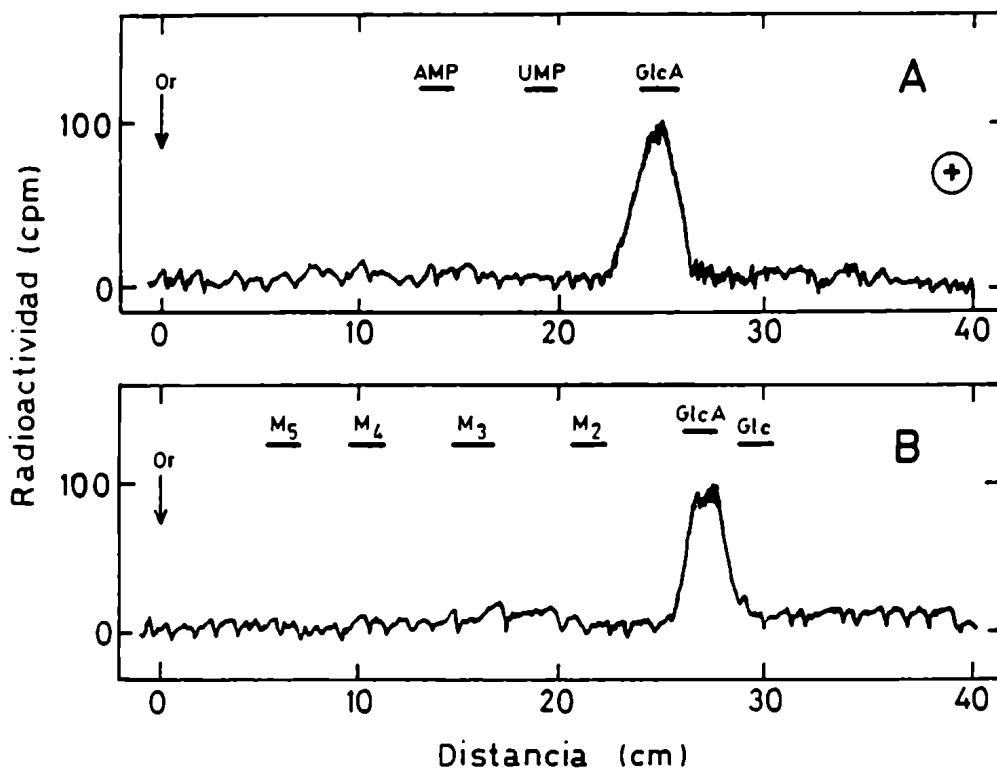


Figura 43: DIGESTION CON GLUSULASA DEL trisacárido $\underline{d}_1(^{14}\text{C})\text{GlcA}$.

El trisacárido \underline{d}_1 con marca en $(^{14}\text{C})\text{GlcA}$ (2.200 cpm) fue tratado con glusulasa de intestino de caracol durante 24 horas según se indica (sección III.6.2). El producto fue sometido a electroforesis sobre papel Whatman N° 1 a 1.000 volts durante 3 horas, utilizando el solvente B (panel A). El material correspondiente al pico que se muestra en el panel A fue eluído del papel y cromatografiado durante 3 días en papel Whatman N° 1, utilizando el solvente D (panel B). Se utilizaron los siguientes estándares: 5'adenosina-monofosfato (AMP), 5'uridina-monofosfato (UMP), ácido glucurónico (GlcA), maltopentosa (M_5), maltotetrosa (M_4), maltotriosa (M_3), maltosa (M_2) y glucosa (Glc).

FIGURA 44

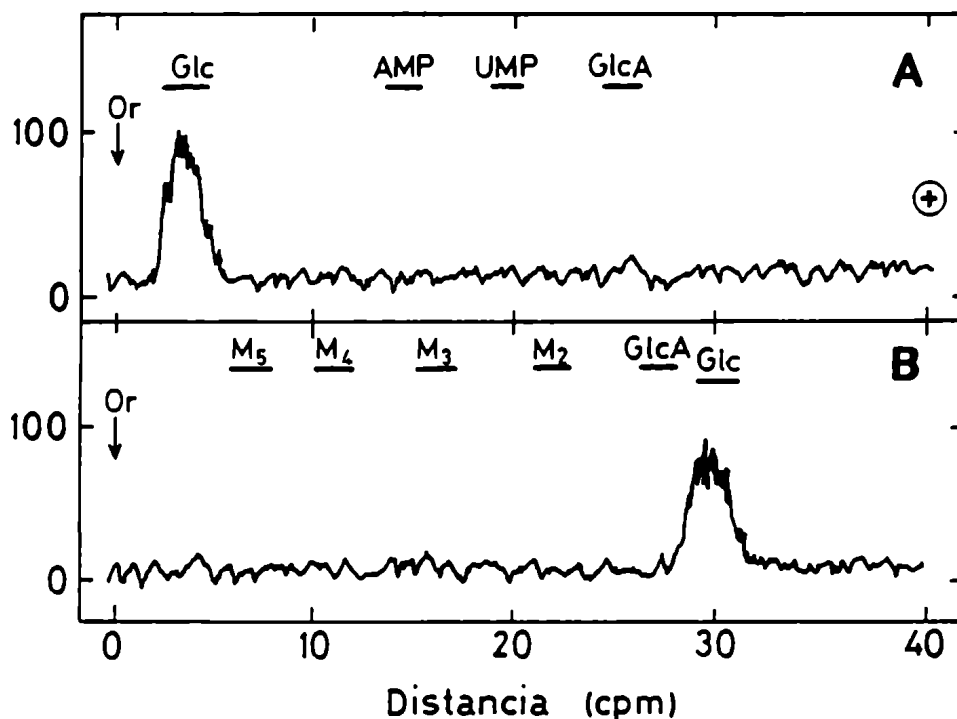


Figura 44: DIGESTION CON GLUSULASA DEL trisacárido $d_1(^{14}\text{C})\text{Glc}$.

Trisacárido d_1 con marca en $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ (2.370 cpm) fue tratado con glucosulasa de intestino de caracol durante 24 horas según se indica (sección III.6.2). El producto fue sometido a electroforesis sobre papel Whatman N° 1 a 1.000 voltios durante 3 horas, utilizando el buffer B (panel A). El material correspondiente al pico que se muestra en el panel A fue eluido del papel y cromatografiado durante 3 días en papel Whatman N° 1, utilizando el solvente D (panel B). Los estándares utilizados fueron los mismos que para el caso mostrado previamente (Fig. 43, panel B).

IV.B.4.5.2 Degradación enzimática del trisacárido d_2

Como vimos previamente (sección anterior), el trisacárido d_1 tratado con glucosidasa, fue digerido completamente: si partíamos del trisacárido $d_1(^{14}\text{C})\text{GlcA}$ se visualizaba únicamente $(^{14}\text{C})\text{GlcA}$, y si el compuesto inicial era el trisacárido $d_1(^{14}\text{C})\text{Glc}$, se obtenía $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ como único producto radioactivo.

Se preparó trisacárido $d_2(^{14}\text{C})\text{GlcA}$ y se sometió a digestión con glucosidasa. Se observó que la preparación enzimática también actuó sobre dicho sustrato, pero a diferencia del caso anterior, los productos de digestión del trisacárido d_2 aislados por electroforesis en papel fueron diferentes: uno de ellos, denominado compuesto e , presentó una movilidad R_{UMP} : 0,85 (Fig. 45, panel A), y otro resultó indistinguible del estándar de ácido glucurónico (Fig. 45, panel A, pico g).

El material correspondiente al pico g (Fig. 45), analizado por cromatografía en papel utilizando el solvente D, también se comportó como ácido glucurónico (Fig. 46). Como se muestra, también fue posible obtener el compuesto e con marca tanto en $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ (Fig. 45, panel B) como en $(^{14}\text{C})\text{Acetilo}$ (Fig. 45, panel C).

FIGURA 45

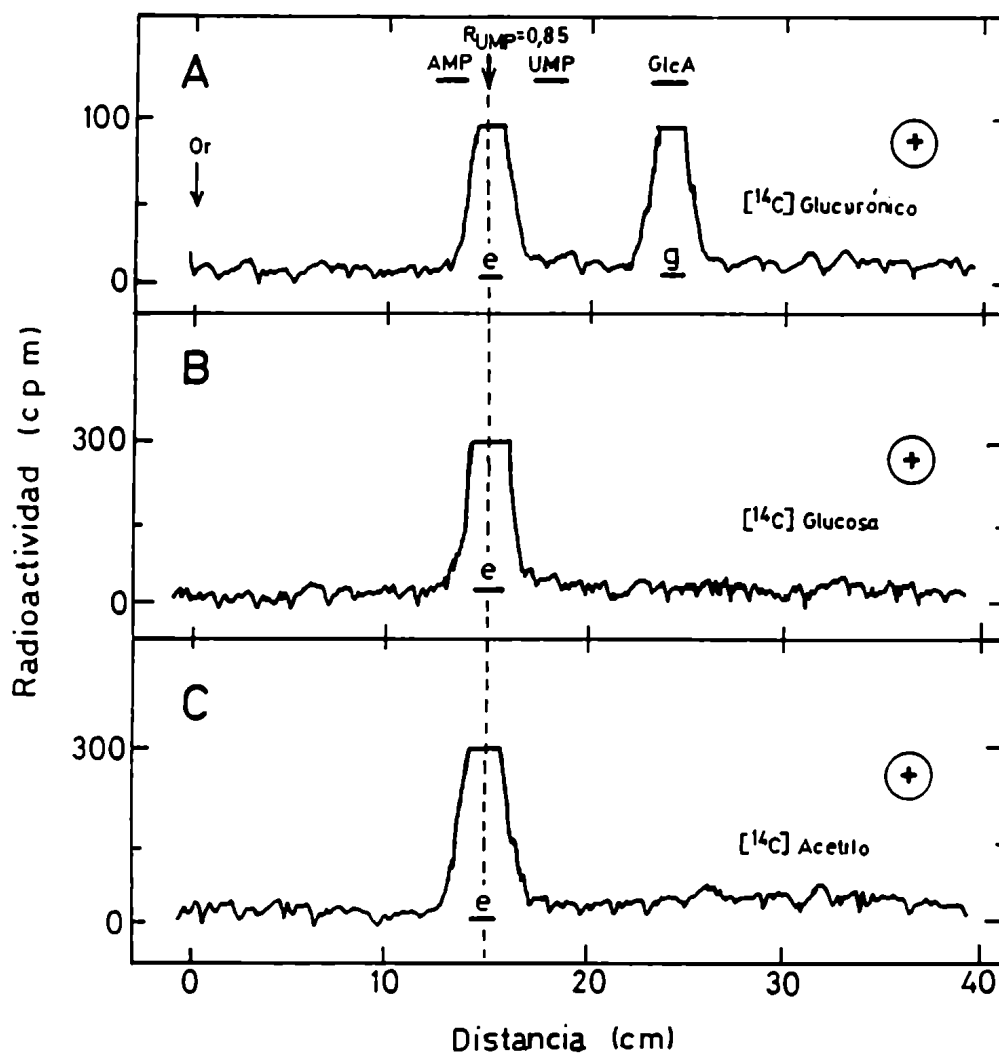


Figura 45: DIGESTION CON GLUSULASA DEL trisacárido d₂.

El trisacárido d₂ con marca en (¹⁴C)GlcA (panel A, 5.300 cpm), o (¹⁴C)Glc (panel B, 3.100 cpm), o (¹⁴C)O-Acetilo (panel C, 3.100 cpm) fue digerido con glucosulasa de intestino de caracol según se indica (sección III.6.2) durante 22 horas. Posteriormente, y de manera independiente para cada marca, los productos fueron sometidos a electroforesis sobre papel Whatman N° 1 a 1.000 volts durante 3 horas, utilizando el buffer B.

FIGURA 46

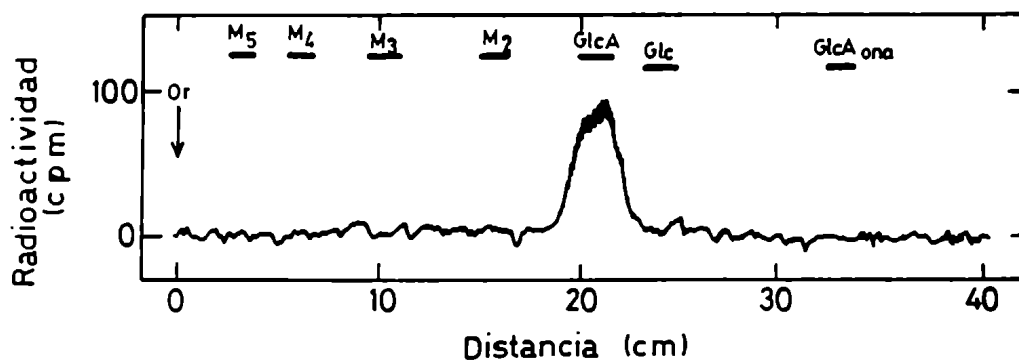


Figura 46: ANALISIS DEL compuesto g.

El compuesto g (2.100 cpm, Fig. 45, panel A) fue eluido y analizado por cromatografía en papel Whatman N°1, durante 3 días, utilizando el solvente D.

Maltopentosa (M₅), maltotetrosa (M₄), maltotriosa (M₃), maltosa (M₂), ácido glucurónico (GlcA) y glucosa (Glc).

IV.B.4.5.3 Análisis del compuesto e

Los materiales correspondientes a cada uno de los picos e (Fig. 45; paneles A, B y C) fueron eluidos del papel y se procedió a su caracterización.

El compuesto e(¹⁴C)GlcA sometido a deacilación en medio alcalino suave, rindió un único producto, el cual, analizado por cromatografía en papel utilizando el solvente D, cambió su migración respecto del compuesto original: mientras el compuesto intacto migró con R_{Glc} : 0,9 (Fig. 47, panel A), luego del tratamiento deacilante perdió movilidad y pasó a migrar en la zona del estándar de maltotriosa (Fig. 47, panel B). A este segundo compuesto (desacetilado) se lo denominó compuesto e₁.

Por otra parte, se mezclaron los materiales correspondientes al compuesto e con marcas tanto en (¹⁴C)GlcA, (¹⁴C)Glc, como en (¹⁴C)-O-Aceto (véase Fig. 45). A este material, con las tres marcas, se lo denominó "Fracción e" y se procedió a su análisis por cromatografía en papel utilizando solvente D: se comportó como un compuesto homogéneo de R_{Glc} : 0,9 (Fig. 48). Es decir, que también por este criterio resultó indistinguible del compuesto e.

Con el objeto de conocer el tamaño del compuesto homogéneo denominado "Fracción e", el mismo se eluyó del papel y se sometió a filtración en columna de geles: por este criterio,

FIGURA 47

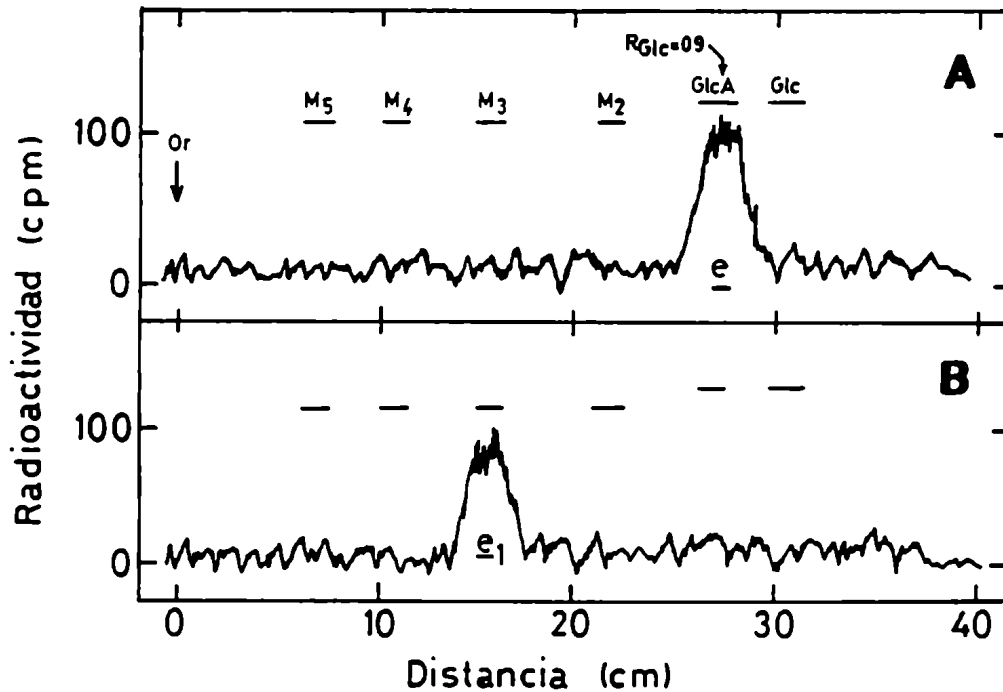


Figura 47: DESACETILACION DEL compuesto e.

El compuesto e con marca en (^{14}C)GlcA (2.870 cpm) fue dividido en dos alícuotas iguales, las cuales fueron tratadas como se indica a continuación.

Panel A: Una alícuota se cromatografió intacta en papel Whatman N° 1 durante 3 días, utilizando el solvente D.

Panel B: Otra alícuota se trató con HONa 60 mM durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se continuó como se indicó previamente (véase Fig. 39, panel B) y finalmente, la muestra se cromatografió en idéntico sistema y condiciones que en el caso anterior (esta figura, panel A).

FIGURA 48

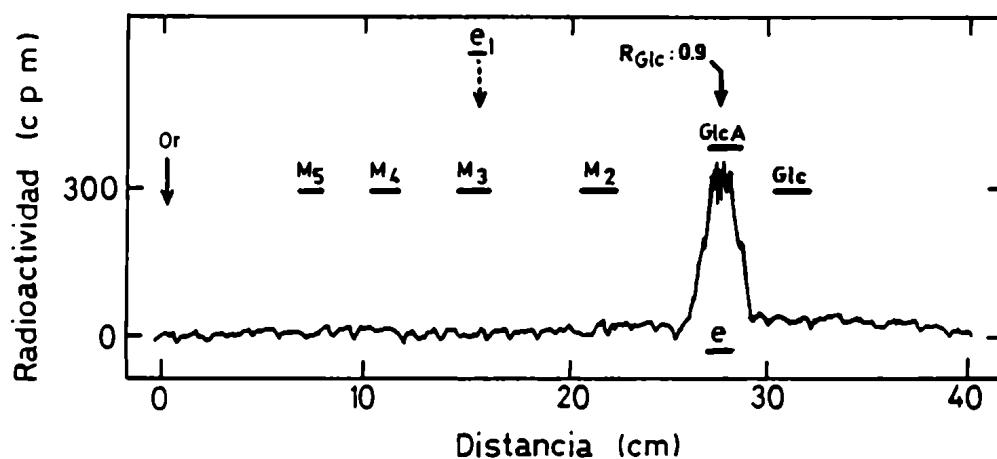


Figura 48: ANALISIS DE LA "fracción e".

El material correspondiente a la "fracción e" (3.230 cpm totales, 1.170 cpm en $(^{14}\text{C})\text{Glc}$, 1.030 cpm en $(^{14}\text{C})\text{GlcA}$, y 1.100 cpm en $(^{14}\text{C})\text{-O-Aceto}$) fue cromatografiado en papel Whatman N° 1 durante 3 días, utilizando el solvente D. La flecha de líneas de puntos indica la posición de migración del compuesto e₁.

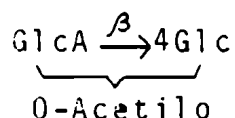
también se comportó como un compuesto único y eluyó inmediatamente antes que el estándar del disacárido sacarosa (Fig. 49).

Los resultados de esta sección (IV.B.4.5.3), permiten concluir que la presencia del resto O-Acetilo en el trisacárido acetilado d₂, constituye un bloqueo a la degradación del mismo por la glucosidasa, lo cual origina un producto final acetilado: el disacárido e.

Habiendo demostrado previamente que:

- 1) El compuesto d₂ es el trisacárido $\text{GlcA} \xrightarrow{\beta} 4\text{GlcA} \xrightarrow{\beta} 4\text{Glc}$ acetilado (IV.B.4.4).
- 2) El trisacárido d₂ digerido con glucosidasa libera cantidades iguales de ácido glucurónico y del compuesto e (sección IV.B.4.5.2).
- 3) El compuesto e pudo obtenerse marcado tanto con (¹⁴C)GlcA, como con (¹⁴C)Glc o con (¹⁴C)-O-Acetilo (sección IV.B.4.5.2).
- 4) El tamaño aparente del compuesto e, estimado por filtración en columna de geles, es ligeramente mayor a un disacárido (esta sección, Fig. 50).

Se concluye que el compuesto e es el disacárido:



y que e₁ es el mismo disacárido no acetilado.

Por lo tanto, es posible acotar la posición del resto O-Acetilo en el trisacárido d₂, al disacárido que ocupa su extremo reductor, es decir:

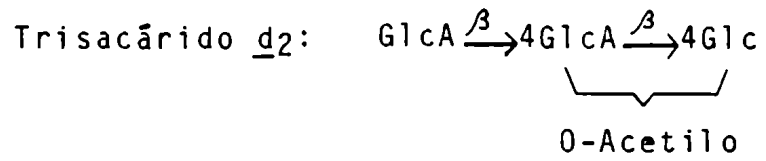
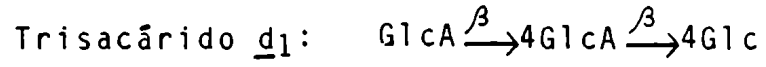


FIGURA 49

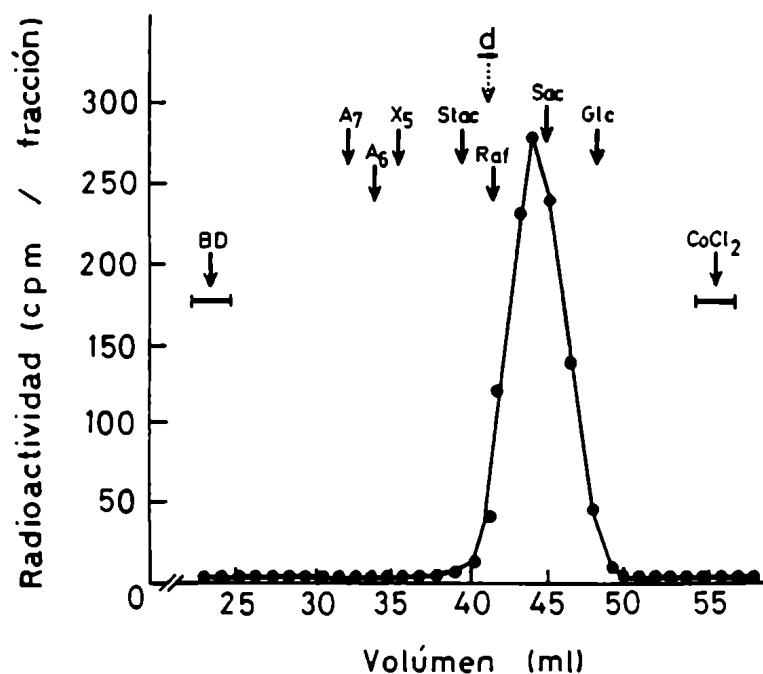


Figura 49: FILTRACION POR Bio-Gel P₂ DEL compuesto e.

El material correspondiente a la "fracción e" (Figura 48) fue eluido del papel y cromatografiado en columna de Bio-Gel P₂ según se indica (sección III.7.2). Las flechas indican los volúmenes de elución de los siguientes estándares: estaquirosa (Stac), trisacárido d (d), rafinosa (Raf), sacarosa (Sac) y glucosa (Glc).

IV.B.5 Presencia de uniones difosfato

Vimos previamente que era posible transferir radioactividad proveniente de beta(^{32}P)UDP-Glc a "Extracto 1203" (Tabla VI), y que los compuestos radioactivos mayoritarios de dichos extractos fraccionados por columnas de DEAE-celulosa resultaron idénticos a los obtenidos con radioactividad proveniente tanto de UDP(^{14}C)Glc como de UDP(^{14}C)GlcA (sección IV.B.2.3, Figs. 20, 21 y 22).

Es decir que, hasta ese grado de análisis, las marcas de (^{32}P), (^{14}C)Glc y (^{14}C)GlcA se encontraban asociadas al mismo grupo de compuestos.

Asimismo, habíamos demostrado que los compuestos radioactivos presentes en "Extracto 1203", obtenidos utilizando UDP(^{14}C)Glc como precursor radioactivo, eran lábiles en medio alcalino suave, y por este tratamiento produjeron oligosacáridos fosfodiésteres cíclicos. Este resultado era un indicio de que la porción sacarídica estaba unida al lípido mediante un puente pirofosfato (sección IV.B.2.2).

Con el objeto de realizar un estudio comparativo, se obtuvieron dichos oligosacáridos fosfodiésteres cíclicos, marcados esta vez con (^{32}P).

IV.B.5.1 Labilidad en medio alcalino suave del material marcado con (^{32}P) proveniente de $\text{beta}(^{32}\text{P})\text{UDP-Glc}$

Se preparó "Extracto 1203" con radioactividad proveniente de $\text{beta}(^{32}\text{P})\text{UDP-Glc}$, y posteriormente, el material radioactivo se cromatografió en el solvente alcalino A, un sistema que, como dijimos, permite además investigar la resolución cromatográfica de los productos (sección IV.B.2.2, Fig. 19).

Se obtuvieron dos compuestos: $(^{32}\text{P})1^\circ$ y $(^{32}\text{P})2^\circ$ (Fig. 50). Este perfil resultó análogo al obtenido con oligosacáridos fosfodiésteres cíclicos marcados con (^{14}C) (véase Fig. 18).

La similitud de los perfiles obtenidos con "Extracto 1203" preparados utilizando como precursor radioactivo UDP-Glc marcado tanto con (^{14}C) como con (^{32}P) , permitió confirmar que efectivamente la primera reacción de síntesis consiste en la transferencia de glucosa-1-P a un P-lípido aceptor presente en el preparado enzimático utilizado.

IV.B.5.2 Confirmación de la unión difosfato: aislamiento de (^{32}P) Pirofosfato

Dijimos en la sección anterior que la posibilidad de obtener fosfodiésteres cíclicos de oligosacáridos sugería la

FIGURA 50

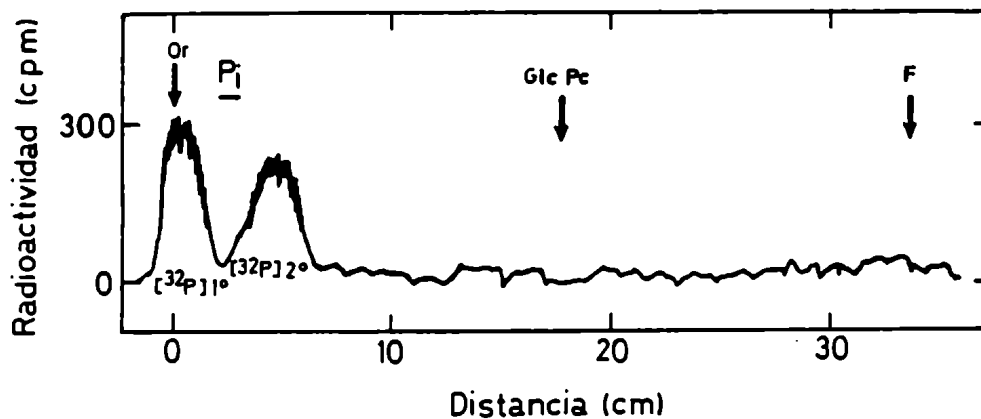


Figura 50: CROMATOGRAFIA EN SOLVENTE ALCALINO "A" DE LOS PRODUCTOS DE INCORPORACION OBTENIDOS CON RADIOACTIVIDAD PROVENIENTE DE beta(^{32}P)UDP-Glc

El "extracto 1203" (7.300 cpm) obtenido como se indicó previamente (Tabla VIII, exp. 1) se analizó por cromatografía ascendente en papel Whatman N° 1 durante 18 horas, utilizando el solvente A. Glucosa-fosfodiéster-cíclico (GlcPc).

presencia de un puente difosfato entre la porción oligosacáridica y el lípido. Para verificarlo, se realizó el siguiente experimento.

Se preparó material utilizando beta(³²P)UDP-Glc y UDP-GlcA no radioactivo como precursor. El extracto obtenido se sometió a hidrólisis ácida suave durante cinco minutos y, finalmente, los productos se analizaron por electroforesis en papel. En estas condiciones, los prenil-difosfato-azúcares no solo liberan el oligosacárido (indetectable en este caso por no ser radioactivo) sino que también producen cantidades variables de Pi y P_{Pi} (201).

Los resultados muestran que el extracto intacto permanece en el origen de siembra (Fig. 51, panel A), mientras que el hidrolizado produce dos componentes con movilidades de Pi y P_{Pi} (Fig. 51, panel B, picos 1p y 3p, respectivamente), y un componente minoritario no caracterizado (Fig. 51, panel B, pico 2p).

La identidad del material proveniente del pico 3p fue confirmada por tratamiento con pirofosfatasa inorgánica (enzima muy específica) y subsecuente electroforesis en el mismo sistema: toda la radioactividad fue convertida en (³²P)-fosfato inorgánico.

Estos resultados confirman que el primer azúcar de la porción sacarídica está unido a un aceptor lipídico mediante un

punte difosfato. Además, el aceptor lipídico está fosforilado y provee uno de los fosfatos del puente; el otro fosfato es el cedido por el UDP-Glc.

Finalmente, la labilidad al tratamiento ácido exhibida por la unión fosfato-aceptor lipídico, sugiere que este último se trata de un preno1 alílico (201).

FIGURA 51

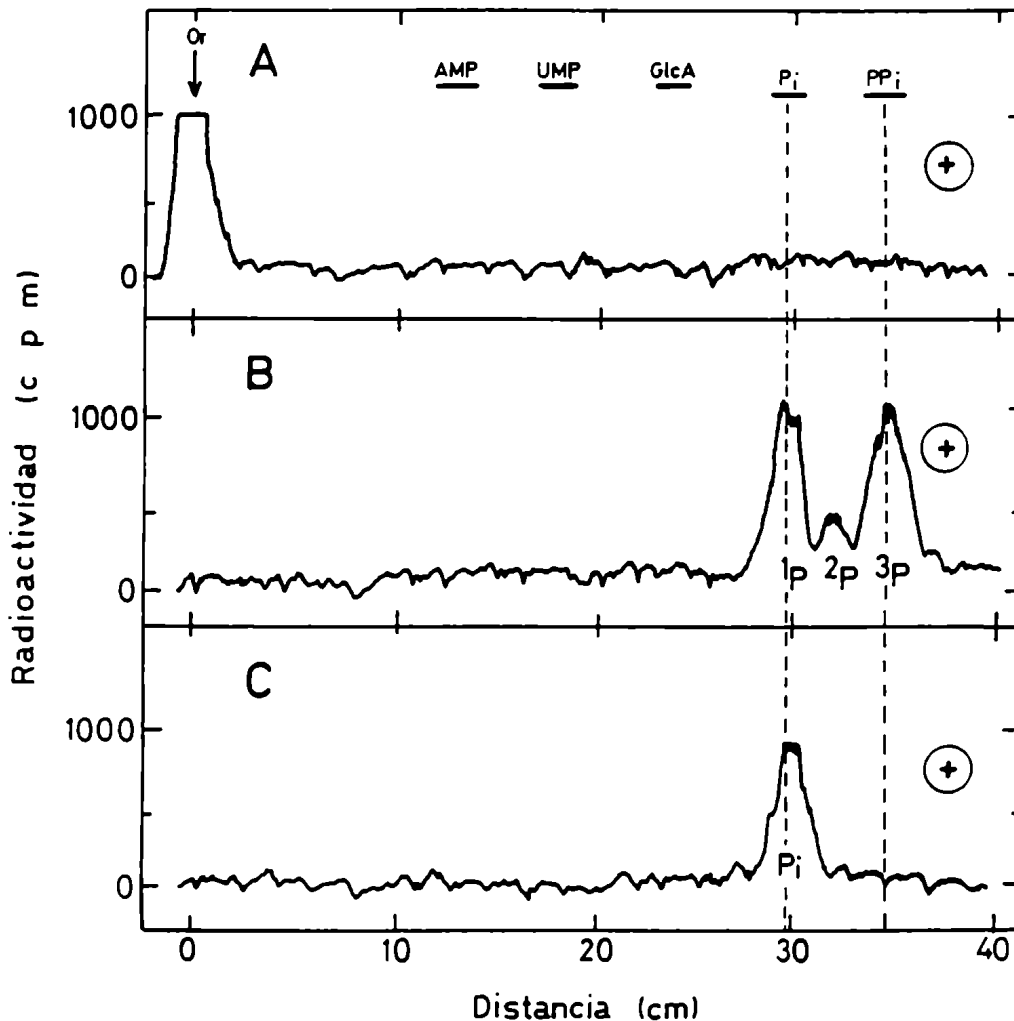


Figura 51: AISLAMIENTO DE (^{32}P)Pirofosfato

Panel A: Una alícuota del "extracto 1203" (12.350 dpm), marcado con radioactividad proveniente de beta(^{32}P)UDP-Glc (Tabla VIII, exp. 1) fue electroforetizada intacta sobre papel Whatman N° 1, a 1.000 voltios durante 3 horas, utilizando el buffer B.

Panel B: Otra alícuota (21.350 dpm) se sometió a hidrólisis ácida suave en ClH 0.01 N a 100°C durante 5 minutos. Se separó el exceso de ácido a baja presión utilizando un evaporador rotatorio y cuidando no calentar el tubo con la muestra durante dicha operación, dado que el pirofosfato es inestable en medio ácido caliente (74). Finalmente, el material se electroforetizó como en el caso anterior.

Panel C: El material correspondiente al pico 3_p (panel B) se eluyó del papel y se trató con pirofosfatasa inorgánica según se indica (sección III.6.5), y luego se electroforetizó como en los casos anteriores.

IV.B.6 Caracterización de los oligosacáridos a, b y c

IV.B.6.1 Interrelación entre los oligosacáridos a, b y c

Además de los trisacáridos d₁ y d₂, cuyas estructuras venimos de demostrar (sección IV.B.4), se aisló un grupo de oligosacáridos que, por electroforesis en papel, se fraccionaba en los compuestos a, b y c. Según dijimos, dichos oligosacáridos, analizados por filtración en columna de geles, eluyeron en la zona esperada para octa o nonasacáridos (sección IV.B.3.2). Por este criterio, sus tamaños relativos resultaron en el orden c b a (véase Figs. 24,25 y 26).

Asimismo, mediante análisis por electroforesis en papel, ésta también fue la relación de sus respectivas cargas específicas (véase Fig. 23, paneles A y B).

Por otra parte, la diferencia del volumen de elución del compuesto c respecto del b y de éste respecto del a, resultó semejante a la observada en el caso de un pentasacárido piruvilado de *Xanthomonas campestris* (X₅-Pir), respecto de su derivado no piruvilado (X₅), utilizados como estándares (Fig. 52). Estos resultados sugirieron que los tres compuestos (a, b y c) podrían ser un mismo oligosacárido con distinto grado de piruvilación.

El compuesto c, el de mayor tamaño y carga aparentes, fue sometido entonces a condiciones de hidrólisis en las que se liberan grupos cetil-pirúvicos sin afectar las uniones glicosídicas (265).

FIGURA 52

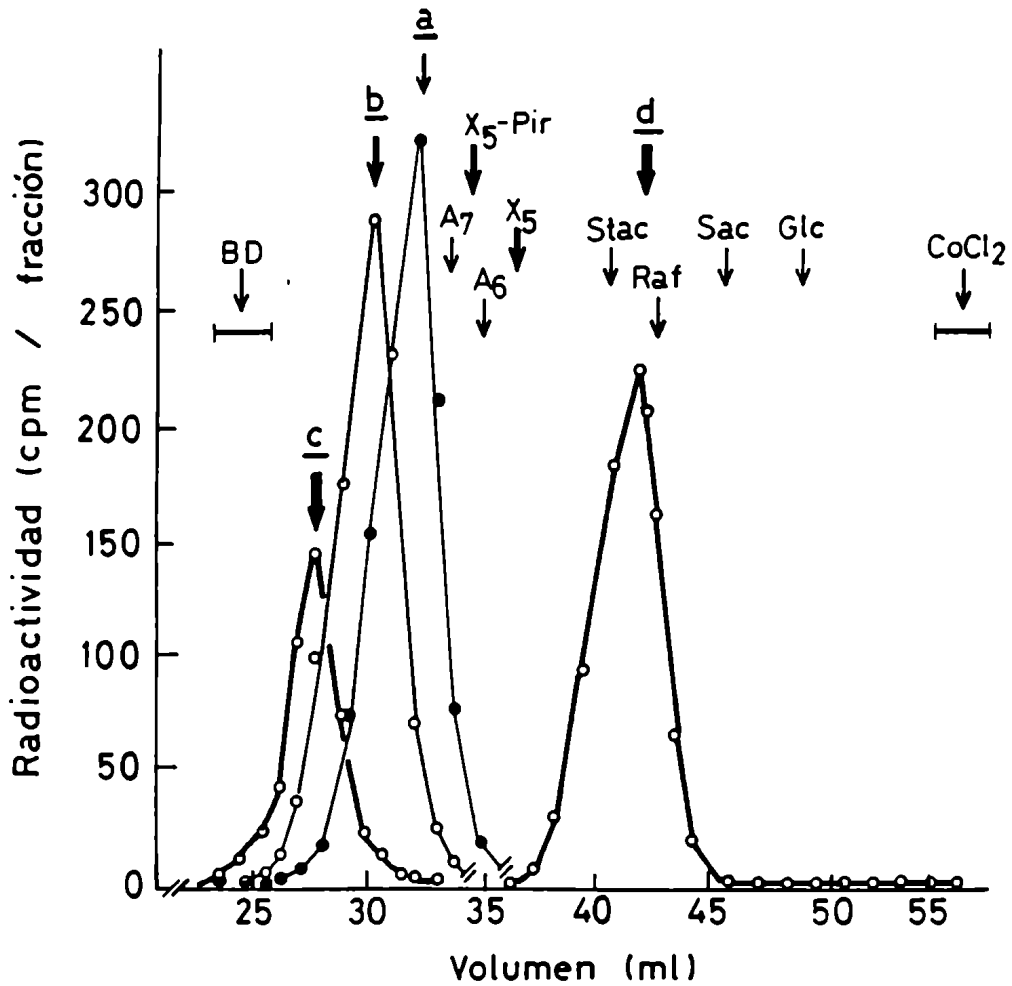


Figura 52: FILTRACION EN Bio-Gel P₂ de los oligosacáridos a, b, c y d.

Esta figura no representa un solo experimento, sino la integración de los que se mostraron previamente (Figuras 24,25 y 26). X₅-Pir y X₅ fueron preparados en nuestro laboratorio (221) y también A₆ y A₇ (203,204). El resto de los estándares es igual que en los casos de las figuras mencionadas.

Se obtuvo un compuesto con la movilidad del compuesto a (Fig. 53, panel A). Dicho producto analizado por filtración en columna de geles también se comportó como un compuesto único y eluyó en una posición idéntica a la del oligosacárido a (no mostrado).

Por hidrólisis parciales en tiempos menores, el oligosacárido c originó un producto que resultó una mezcla de los oligosacáridos a, b y c, a juzgar tanto por sus movilidades electroforéticas (Fig. 53, panel B) como por filtración en Bio-Gel P₂ (no mostrado).

El oligosacárido a no se modificó por ninguno de los tratamientos antedichos. Idénticos resultados se obtuvieron al utilizar oligosacáridos a, b y c marcados con (¹⁴C)Glc (no mostrado) y sugieren que los compuestos a, b y c serían el mismo oligosacárido pero con diferente grado de piruvilación: a sería el compuesto depiruvilado, b con un grupo cetal-pirúvico y c con dos de estos grupos.

Asimismo, estos resultados indicaron además que el preparado enzimático utilizado contenía dadores de piruvato y las enzimas necesarias para transferirlo.

FIGURA 53

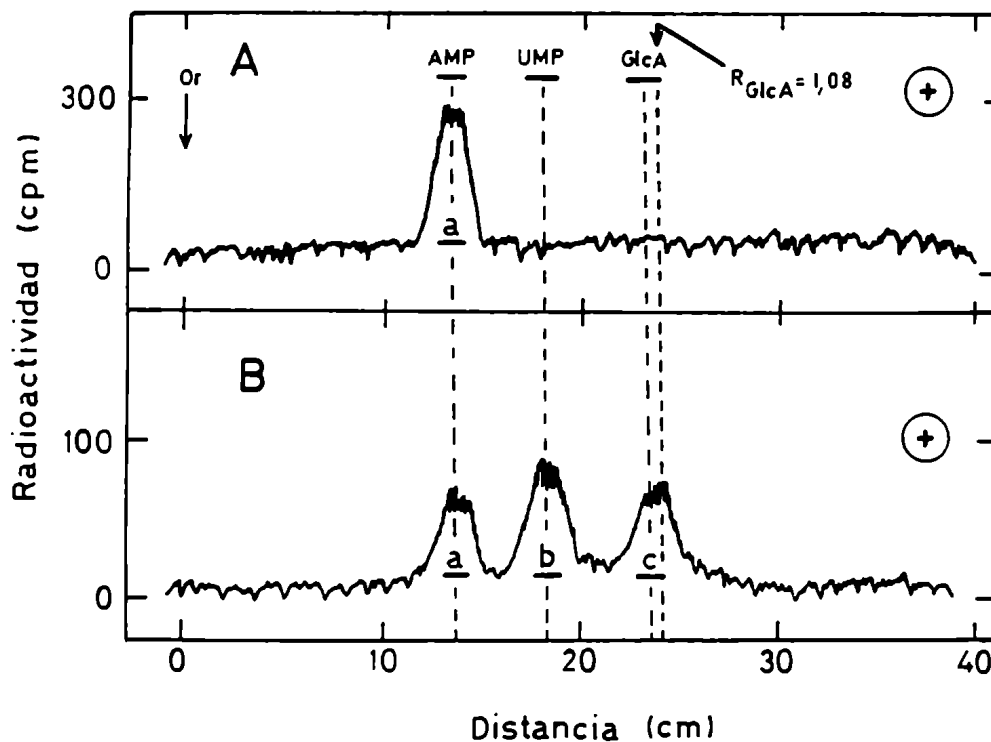


Figura 53: REMOCION DE GRUPOS CETAL-PIRUVICOS

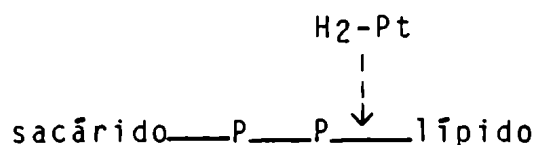
Una alícuota del compuesto c con marca en (^{14}C)GlcA (3.800 cpm), aislado por Bio-Gel P_2 (véase Fig. 26), fue sometida a hidrólisis en ClH 0.01 N a 100°C durante 90 minutos en ampolla cerrada (265). Luego se eliminó el exceso de ácido a baja presión y el material se electroforetizó sobre papel Whatman N° 1 a 1.000 voltios durante 3 horas utilizando el solvente B (panel A). Otra alícuota fue sometida a hidrólisis durante solamente 30 minutos y se procesó como en el caso anterior (panel B).

IV.B.6.2 Hidrogenación catalítica (H₂-Pt) de los compuestos radioactivos solubles en "Extracto 1203": Aislamiento de oligosacáridos piruvilados sintetizados in vitro

La interrelación entre los compuestos a, b y c sugerida en el punto anterior y lograda por una hidrólisis ácida relativamente suave, nos permitió considerar que alguno o algunos de los oligosacáridos fraccionados por electroforesis (sección IV.B.3.1) no fueran producto de síntesis in vitro, sino que quizás se produjeran durante el tratamiento ácido efectuado para liberar las porciones sacarídicas del lípido.

Si bien la técnica estándar utilizada para liberar dichas porciones sacarídicas consistió en el tratamiento del "Extracto 1203" a pH:2 por un tiempo menor al necesario para producir depiruvilación total (Fig. 53, panel A), consideramos que liberando a los oligosacáridos mediante una técnica que no afectara los grupos cetal-pirúvicos, sería posible conocer con mayor certeza el grado de piruvilación de los oligosacáridos sintetizados in vitro.

Se optó por la reducción catalítica con H₂-Pt, un procedimiento que cliva el enlace entre el pirofosfato y el lípido, siempre que éste sea un prenil alílico (201), y libera oligosacáridos pirofosforilados sin afectar a los sustituyentes no glicosídicos:



El "Extracto 1203" sometido a este procedimiento y posteriormente fraccionado por electroforesis en papel produjo tres compuestos: 1, 2 y 3 (Fig. 54, panel A).

Los tres compuestos fueron defosforilados mediante tratamiento con fosfatasa alcalina y nuevamente sometidos a electroforesis.

El material del pico 1 originó un compuesto con la movilidad del oligosacárido b (Fig. 54, panel B); el del pico 2, un compuesto de movilidad R_{G1CA}: 1,08 (Fig. 54, panel C); y el del pico 3 produjo también un compuesto con movilidad R_{G1CA}: 1,08 (Fig. 54, panel D). Cada uno de estos oligosacáridos fue filtrado por columna de Bio-Gel P₂ con el siguiente resultado: el compuesto con movilidad de b fue eluido en la posición esperada para b, confirmando así su identidad; el proveniente del pico 2 (R_{G1CA}: 1,08) se comportó como el compuesto c, y el del pico 3 (también de R_{G1CA}: 1,08) eluyó en la posición correspondiente al trisacárido d (d₁ + d₂) (resultados no mostrados).

Un comportamiento idéntico se obtuvo utilizando oligosacáridos marcados con (^{14}C)Glc, con la excepción de que además, con esta marcación, se observó el compuesto neutro ya mencionado (sección IV.B.3.1).

Estos resultados muestran claramente que, al liberar las porciones sacarídicas del lípido por reducción catalítica con $\text{H}_2\text{-Pt}$, no se obtuvo el octasacárido a, es decir, el representante libre de cetal-piruvato. Este oligosacárido sería más probablemente un artificio de técnica (debido al tratamiento ácido) que un producto de síntesis.

Debe destacarse que el hecho de que la reducción catalítica libere oligosacáridos fosforilados sugiere nuevamente, con bastante fundamento, que la porción lipídica de los compuestos radioactivos solubles en "Extracto 1203" es muy probablemente un prenol alílico (201).

FIGURA 54

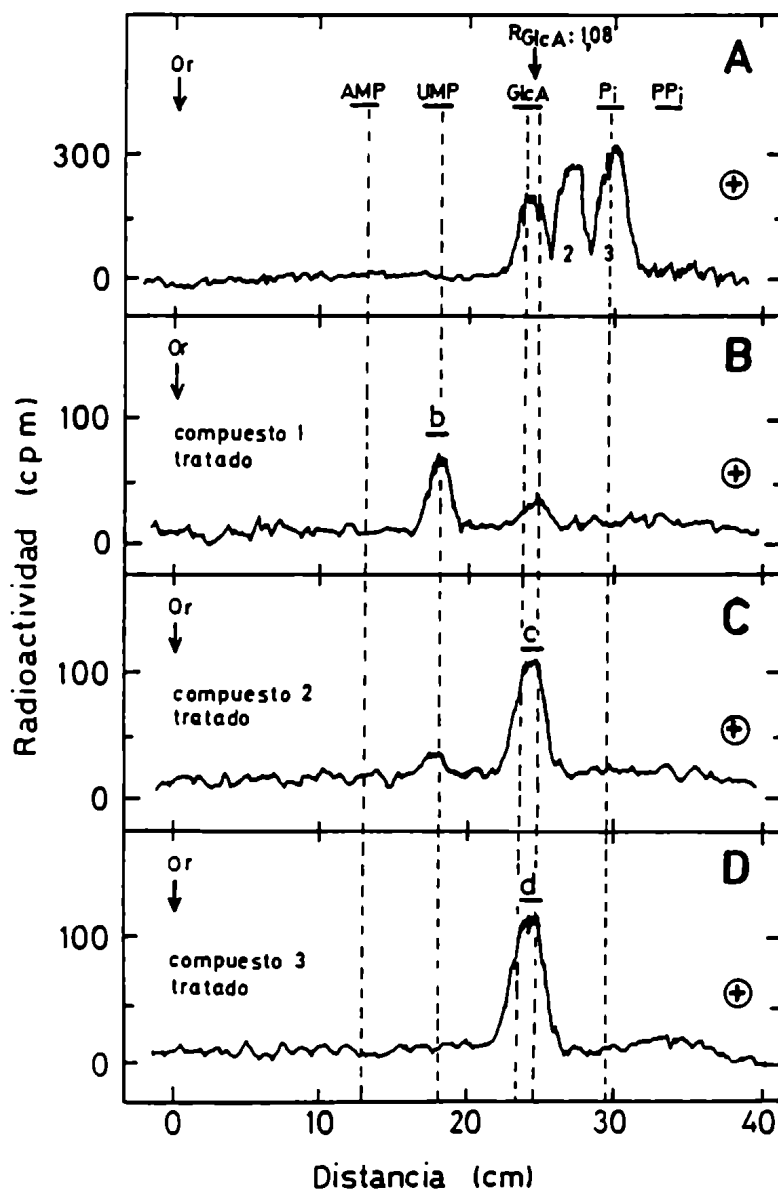


Figura 54: REDUCCION CON H₂-Pt.

El "extracto 1203" (7.760 cpm), obtenido en una incubación estándar como se describe (sección III.3.1), en presencia de UDP(¹⁴C)GlcA (1.000 pmoles) y UDP-Glc (25.000 pmoles) fue sometido a reducción catalítica con platino (sección III.4.3). Los productos fueron electroforetizados sobre papel Whatman N° 1 a 1.000 voltios durante 3 horas, utilizando el solvente B (panel A). Los materiales correspondientes a los picos 1, 2 y 3 del panel A fueron eluidos del papel, tratados con fosfatasa alcalina según se indica (sección III.6.1) y finalmente electroforetizados en el mismo sistema y condiciones que en el caso del panel A (paneles B, C y D, respectivamente).

IV.B.6.3 Marcación con (¹⁴C)Piruvato: Confirmación de la presencia de restos cetol-pirúvicos en los oligosacáridos b y c

IV.B.6.3.1 Incorporación de radioactividad proveniente de (¹⁴C)PEP a "Extracto 1203"

Atendiendo a los antecedentes hallados en nuestro laboratorio con Xanthomonas campestris, se sabía que en dicho sistema la piruvilación del exopolisacárido ocurre a nivel de prenil-fosfo-azúcares, y que el dador es el fosfo-enol-piruvato (PEP) (véase sección II.2).

Pareció razonable emprender un estudio similar en nuestro sistema, y en el caso de obtener marcación, era un modo de confirmar la interrelación propuesta para los oligosacáridos a, b y c, pues solamente debían marcarse con (¹⁴C)Piruvato los oligosacáridos b y c.

Se realizó una incubación estándar utilizando (¹⁴C)PEP como precursor radioactivo, en presencia o ausencia de nucleótido-azúcares fríos. Se observó que en los dos casos, se obtuvo transferencia de radioactividad a material liposoluble extraíble con "Solvente 1203" (Tabla X). Este resultado indicó una vez más que, como ya vimos, existen aceptores y dadores endógenos presentes en el preparado enzimático utilizado.

TABLA X

INCORPORACION DE RADIOACTIVIDAD PROVENIENTE DE (¹⁴C)PEP

A "Extracto 1203"

Exp	Dador		Radiactividad en "extracto 1203" (pmoles/mg.prot)
	Radiactivo	No radiactivo	
1	(¹⁴ C)PEP	-	28,5
2	(¹⁴ C)PEP	UDP-Glc + UDP-GlcA	51,5

TABLA X: Se realizaron incubaciones estándar según se indica (sección III.3.1), utilizando (¹⁴C)PEP como precursor radioactivo (414 uM fosfoenol 1-(¹⁴C)pirúvico ciclohexylamonio, 1,4 Ci/mol, Amersham, England). En el experimento 2 se incluyó además UDP-Glc (25.000 pmoles) y UDP-GlcA (25.000 pmoles).

IV.B.6.3.2 Confirmación de la interrelación propuesta entre los oligosacáridos a, b y c

El "Extracto 1203" marcado con radioactividad proveniente de (^{14}C)PEP (Tabla X, exp. 2) fue sometido a reducción catalítica con $\text{H}_2\text{-Pt}$, con el objeto de liberar las porciones sacarídicas del lípido sin afectar los restos cetal-pirúvicos.

Los productos obtenidos se fraccionaron por electroforesis en papel y solamente se observaron dos compuestos: 1^{Pir} y 2^{Pir} (Fig. 55, panel A). Los compuestos 1^{Pir} y 2^{Pir} fueron defosforilados con fosfatasa alcalina y sometidos a nueva electroforesis en idénticos sistemas y condiciones que la anterior: el compuesto proveniente del pico 1^{Pir} originó el oligosacárido b y el del pico 2^{Pir} el c. Utilizando esta marcación, no fue posible aislar el oligosacárido a, ni tampoco los trisacáridos d₁ o d₂.

Estos resultados confirman que, efectivamente, los oligosacáridos a, b y c están muy vinculados estructuralmente y difieren solamente en el grado de piruvilación: a sería el oligosacárido sin piruvilar, b con un grupo cetal-piruvato, y c con dos de estos grupos.

Asimismo, estos resultados establecen que también en este sistema, el piruvato es transferido a nivel de lípido-intermediarios, el dador es el PEP y que el mismo está presente

como sustrato endógeno en los preparados enzimáticos utilizados, lo cual había sido previamente postulado (sección IV.B.6.1).

FIGURA 55

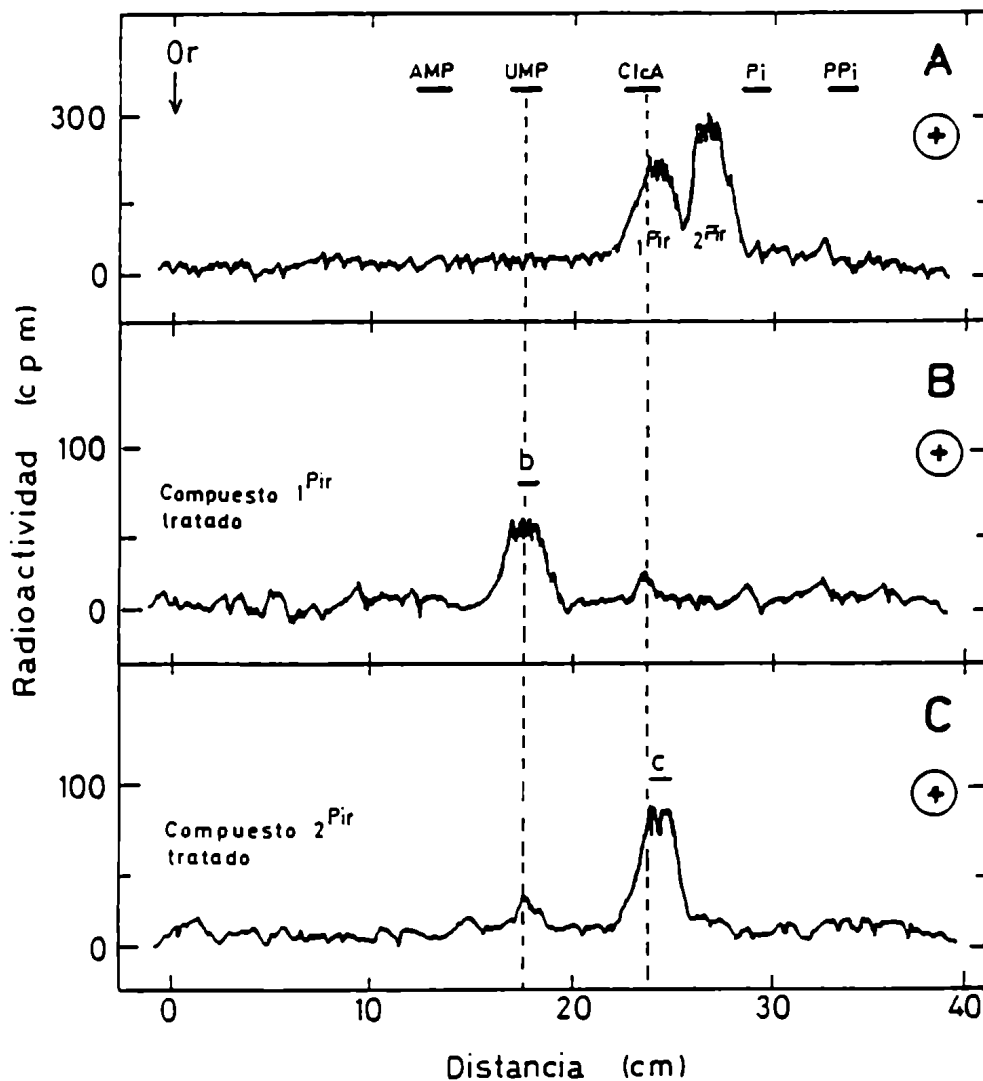


Figura 55: AISLAMIENTO DE LOS oligosacáridos b y c con marca en (¹⁴C)piruvato

"Extracto 1203" (3.720 cpm) obtenido como se indica en la Tabla VIII, Exp. 2, fue sometido a reducción catalítica con platino según se indica (sección III.4.3). Los productos fueron electroforetizados sobre papel Whatman N°1 a 1.000 voltios durante 3 horas utilizando el solvente B (panel A). Los materiales correspondientes a los picos 1^{Pir} y 2^{Pir} del panel A fueron eluidos del papel, tratados con fosfatasa alcalina según se indica (III.6.1) y finalmente electroforetizados en el mismo sistema y condiciones que en el caso anterior (paneles B y C, respectivamente).

Los experimentos aquí mostrados fueron realizados en colaboración con la Dra. Nora Iñón de Iannino.

IV.B.7 Caracterización del oligosacárido a

IV.B.7.1 Composición de restos glicosídicos

Los resultados mostrados más arriba (sección IV.B.6.3) indicaron que los compuestos a, b y c se encuentran muy vinculados estructuralmente. Parecerían diferir solamente en el grado de piruvilación, pues los oligosacáridos b y c sometidos a condiciones ácidas en las que se liberan los grupos cetal-pirúvicos pero no se afectan las uniones glicosídicas, producen el compuesto a como único producto.

Con el objeto de continuar la caracterización del oligosacárido a, se estudió la identidad del azúcar que ocupa su extremo reductor.

Vimos previamente que el "Extracto 1203" marcado con radioactividad proveniente de beta(³²P)-UDP(¹⁴C)Glc se fraccionó en columna de DEAE-celulosa en dos picos mayoritarios: I y II. Vimos también que similar resultado se obtuvo utilizando UDP(¹⁴C)GlcA o UDP(¹⁴C)Glc como precursores radioactivos (sección IV.B.2.3).

Asimismo, el material proveniente del pico II, sometido a hidrólisis ácida suave y posterior fraccionamiento por electroforesis en papel, originó los oligosacáridos a, b y c (sección IV.B.3.3).

La entrada de (^{32}P) a partir de beta(^{32}P)-UDP(^{14}C)Glc era un fuerte indicio de que el extremo reductor de los oligosacáridos a, b y c era glucosa.

Se preparó entonces oligosacárido a con marca en (^{14}C)Glc, se redujo con BH_4Na , se sometió a hidrólisis ácida total y, finalmente, los productos se analizaron por cromatografía en papel. Se detectó glucosa, galactosa y sorbitol (Fig. 56).

La presencia de galactosa indica que el preparado enzimático utilizado posee actividad UDP-Gal-4'-epimerasa. Dicha actividad también se había encontrado en nuestro laboratorio con el sistema de *Acetobacter xylinum* (201). Sorbitol y galactosa deben provenir respectivamente de los extremos reductor y no reductor de la unidad repetitiva propuesta (Figs. 15 y 57, páginas 116 y 210).

Con el objeto de confirmar lo antedicho, y continuar la caracterización del octasacárido a, se analizó el mismo mediante estudios de permetilación.

IV.B.7.2 Posición de los enlaces glicosídicos en el octasacárido a

Se preparó octasacárido a(^{14}C)Glc mediante fraccionamiento por electroforesis en papel (no mostrado), se eluyó

FIGURA 56

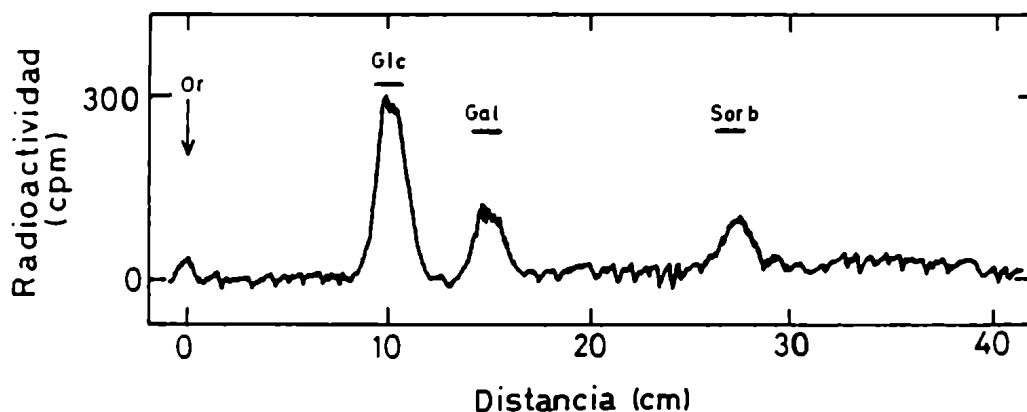


Figura 56: COMPOSICION DEL oligosacárido a.

Oligosacárido a con marca en (^{14}C)Glc (5.270 cpm) fue reducido con BH_4Na durante una noche. Luego de separar el exceso de borohidruro según se indica (sección III.4.5), el material se sometió a hidrólisis total en ampolla cerrada con ClH 1 N a 100°C durante 24 horas. Se separó el exceso de ácido a baja presión y finalmente el material se cromatografió sobre papel Whatman N°1 por un período de 48 horas utilizando el solvente G.

FIGURA 57

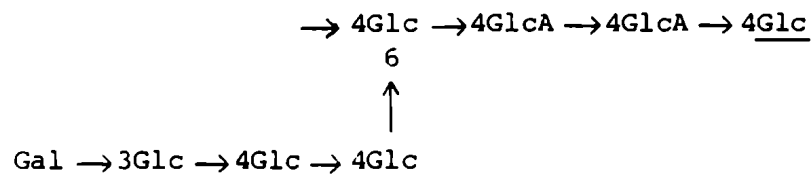


Figura 57: COMPOSICION DE RESTOS GLICOSIDICOS DE LA UNIDAD REPETITIVA DEL EPS DE *Rhizobium trifolii* NA-30

Tomado de Robertsen y col. (157)

el oligosacárido a y se permetiló utilizando la técnica de Hakomori. El material permetilado se hidrolizó y los productos se analizaron por cromatografía en capa delgada.

Se observaron bandas radioactivas con las movilidades de: 2,3,4 tri-0-Me-Glc; 2,4,6 tri-0-Me-Glc; 2,3,6 tri-0-Me-Glc y 2,3,4,6 tetra-0-Me-Gal (Fig. 58).

El primero de los derivados mencionados proviene de un resto glucosa sustituido en posición 6; el segundo, de una glucosa sustituida en posición 3; el tercer derivado significa la existencia de glucosa sustituida en posición 4. El último de los derivados mencionados confirma la posición terminal asignada a la galactosa.

Todos los derivados metilados obtenidos son congruentes con la estructura del octasacárido que constituye la unidad repetitiva (depiruvilada y desacetilada) propuesta para el exopolisacárido cuyo sistema de síntesis se investiga (Fig. 57).

La muy débil banda correspondiente a 2,3,4,6 tetra-0-Me-Glc podría provenir de muy pequeñas cantidades de heptasacárido contaminante. Asimismo, debe destacarse que la ausencia de un derivado disustituido significa que el oligosacárido a es un octasacárido lineal.

Por otra parte, habíamos visto que los compuestos a, b y c también podían marcarse con (^{14}C)GlcA (secciones IV.B.3.1. y IV.B.3.2).

Estos resultados, tomados en conjunto, confirman que los derivados permetilados obtenidos a partir del compuesto a son congruentes con el octasacárido que constituye la unidad repetitiva (depiruvilada y desacetilada) (Fig. 57), el b con un grupo cetal piruvato, y el c con los dos grupos (Fig. 15, página 116).

FIGURA 58

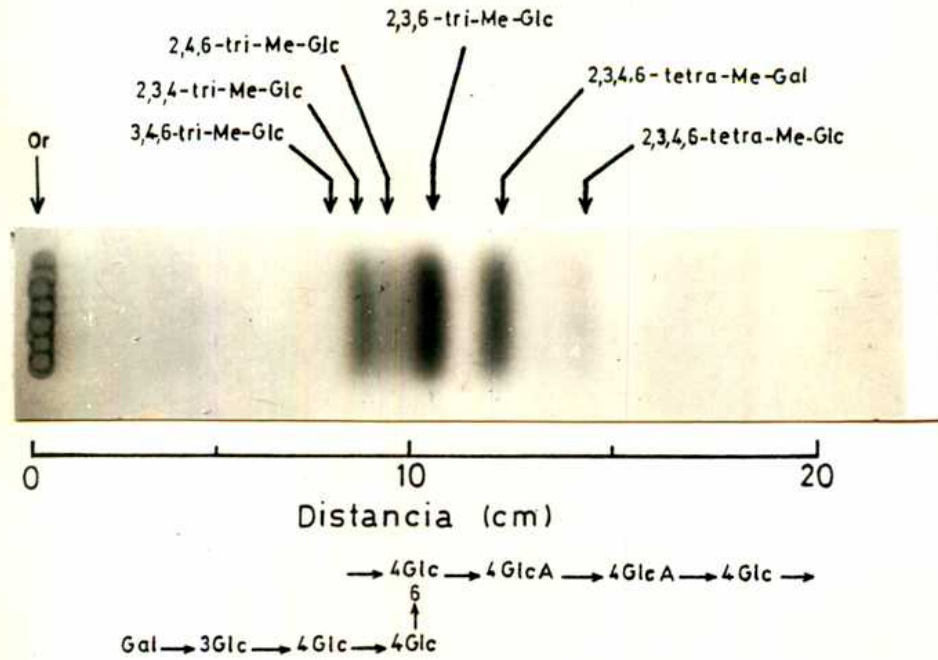


Figura 58: PERMETILACION DEL octasacárido a.

Octasacárido a con marca en (^{14}C)Glc (18.400 cpm) fue permetilado por la técnica de Hakomori según se indica (sección III.4.7.1). El material permetilado fue sometido a hidrólisis ácida en ClH 1 N a 100°C durante 4 horas. Se separó el exceso de ácido a baja presión y los productos fueron cromatografiados en placas de gel de sílice Merck "Kieselgel 60" durante un período de 3 horas, utilizando el solvente I. Finalmente, el material se reveló por autorradiografía durante un período de 18 días utilizando película Kodak X-OMAT.

IV.B.8 Presencia de restos acetilo en los octasacáridos a, b y c

IV.B.8.1 Octasacáridos acetilados preparados por biosíntesis in vitro

Demostramos previamente que el componente d analizado por cromatografía en papel en solvente D se fraccionaba en los trisacáridos d₁ y d₂ (sección IV.B.4.2).

Dijimos, además, que atendiendo a los datos del grupo de Albersheim, que propone la existencia de un resto acetilo para la unidad repetitiva del EPS del sistema en estudio (157), habíamos considerado que el trisacárido d₂ podía ser el homólogo acilado del d₁. Efectivamente, el trisacárido d₂ sometido a deacilación originó el trisacárido d₁ como único producto (sección IV.B.4.3).

La confirmación e identidad del grupo acilo se determinaron mediante marcación con (¹⁴C)-O-Acetilo (Fig. 42). Habíamos demostrado que, si se incuban preparados enzimáticos en presencia de (¹⁴C)Acetil-CoA, es posible transferir radioactividad al "Extracto 1203" (Tabla IX).

Asimismo demostramos que el tratamiento de dichos extractos con ácido suave liberaba una mezcla que, por electroforesis en papel, se resolvió en los componentes a, b y c' (Fig. 40), cuyas movilidades resultaron idénticas a las de los compuestos homónimos con marca tanto en (¹⁴C)Glc, como en

(^{14}C)GlcA (Fig. 23, paneles A y B, respectivamente). Esto fue una evidencia de que la radioactividad debida a las tres marcaciones ((^{14}C)Glc; (^{14}C)GlcA y (^{14}C)Acetilo) estaba asociada a los mismos oligosacáridos.

Vimos además, que el componente c' con marca en (^{14}C)Acetilo (c'(^{14}C)Acetilo), analizado por filtración en columna de geles, se fraccionó en el octasacárido c(^{14}C)Acetilo y el trisacárido d₂(^{14}C)Acetilo, cuyos volúmenes de elución fueron idénticos a los compuestos homónimos con marca en (^{14}C)Glc o en (^{14}C)GlcA (Fig. 41).

Con el objeto de continuar la caracterización de los oligosacáridos a y b marcados con (^{14}C)Acetilo, los mismos fueron analizados por filtración en columna de geles: se comportaron como compuestos únicos, cuyos volúmenes de elución fueron idénticos a los de dichos compuestos con marca en (^{14}C)Glc o en (^{14}C)GlcA (Fig. 59).

No fue posible conocer el grado de acetilación de los compuestos a(^{14}C)Acetilo, b(^{14}C)Acetilo o c(^{14}C)Acetilo. El sistema de cromatografía en papel que permitió discriminar entre los trisacáridos d₁ y d₂ (solvente D), no fue capaz de distinguir entre el oligosacárido a(^{14}C)GlcA desacetilado y su homólogo no tratado (resultados no mostrados).

El poco éxito obtenido para separar los trisacáridos d₁ de d₂ por HPLC (Fig. 37), o por filtración en columnas de

FIGURA 59

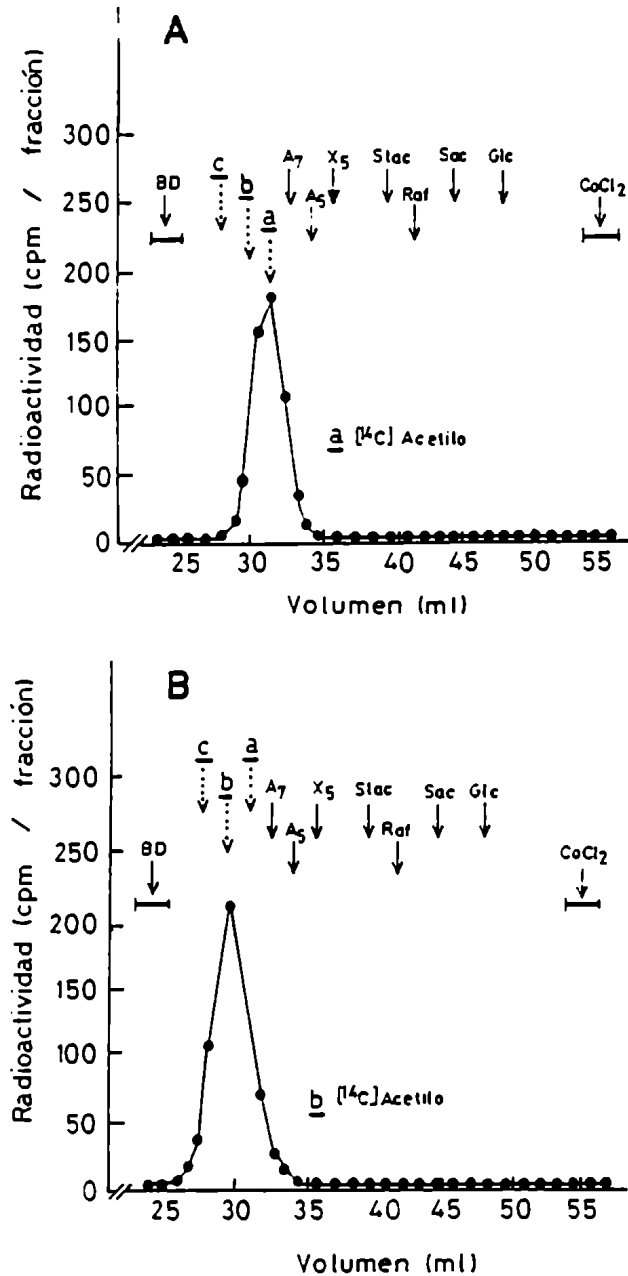


Figura 59: FILTRACION POR GELES DE LOS oligosacáridos a y b con marca en (¹⁴C)Acetilo.

Los materiales correspondientes a los picos a (1.400 cpm) y b (1.780 cpm) que se muestran en la Fig. 40, fueron eluidos del papel y cromatografiados en columna de Bio-Gel P₂ según se indica (sección III.7.2) (paneles A y B, respectivamente). Las flechas llenas indican las posiciones de elución de los mismos estándares utilizados en la Fig. 41. Las flechas de líneas de puntos indican los volúmenes de elución de los octasacáridos a, b o c con marca en (¹⁴C)Glc o en (¹⁴C)GlcA.

borano (resultados no mostrados, ver sección III.7.5), hizo que no se intentaran estas técnicas con los octasacáridos, en principio mucho más difíciles de fraccionar.

En resumen, pudieron obtenerse los oligosacáridos a, b y c con marca en (¹⁴C)Acetilo, lo cual indica además, que el tratamiento ácido suave empleado para liberar las porciones sacarídicas del lípido, produce depiruvilación parcial (sección IV.B.6.1, Fig. 53), pero permite conservar el/los resto/s acetilo en los oligosacáridos aislados. Ya habíamos visto que dicho tratamiento ácido suave permitía obtener el trisacárido d₁ y su homólogo acetilado d₂ (secciones IV.B.4.2, IV.B.4.3 y IV.B.4.4).

IV.B.8.2 Posición del resto acetilo en los octasacáridos a, b y c

Demostramos previamente que en el trisacárido acetilado d₂, la presencia del resto O-Acetilo bloqueaba la acción de la glucosidasa, y de este modo impedía la degradación total, dando como productos finales ácido glucurónico y el disacárido acetilado e (secciones IV.B.4.5.2 y IV.B.4.5.3).

Teniendo en cuenta esta propiedad de las glicosidasas presentes en la glucosidasa de no degradar compuestos acetilados, se utilizó esta mezcla de enzimas para tratar el octasacárido a con marca en (¹⁴C)Acetilo. Previamente, se procedió a estudiar la

interrelación de los oligosacáridos a, b y c con dicha marcación.

IV.B.8.2.1 Interrelación de los octasacáridos a, b y c marcados con (¹⁴C)Acetilo

Demostramos previamente que los oligosacáridos a, b y c se encuentran muy vinculados estructuralmente: el a es el octasacárido que constituiría la unidad repetitiva sin piruvilar, el b con un grupo cetal-piruvato, y el c con dos de estos grupos. Dicha interrelación fue demostrada con oligosacáridos marcados tanto con (¹⁴C)GlcA como con (¹⁴C)Glc (sección IV.B.6.3.2).

Vimos que el oligosacárido c con marca tanto en (¹⁴C)GlcA como en (¹⁴C)Glc sometido a depiruvilación parcial o total, originó respectivamente una mezcla de los oligosacáridos a, b y c, o bien el compuesto a respectivamente (véase Fig. 53).

El compuesto a no fue afectado por ninguno de los dos tratamientos. Según dijimos, esto significa que las condiciones empleadas liberan grupos cetal-pirúvicos pero no afectan las uniones glicosídicas.

Faltaba determinar si dichos tratamientos degradativos (depiruvilación parcial o total) producían también desacetilación. Con esa finalidad, y también con el objeto de estudiar la interrelación de los compuestos a, b y c marcados con (¹⁴C)Acetilo, se sometió el oligosacárido c(¹⁴C)Acetilo a depiruvilación parcial o total (sección IV.B.6.1, Fig. 53).

Los resultados muestran que el oligosacárido c(¹⁴C)Acetilo sometido a condiciones de hidrólisis en las que se liberan grupos cetil-pirúvicos, pero no se afectan uniones glicosídicas, se convierte en el compuesto a(¹⁴C)Acetilo (Fig. 60, panel A).

Si los tiempos de hidrólisis son menores, el producto es una mezcla de los oligosacáridos a(¹⁴C)Acetilo, b(¹⁴C)Acetilo, y c(¹⁴C)Acetilo (Fig. 60, panel B).

Con esta marcación, el compuesto a pierde el grueso de la radioactividad en tiempos mayores a los empleados (más de 180 minutos, no mostrado). Esto no ocurre cuando la marca está en (¹⁴C)GlcA o en (¹⁴C)Glc.

Los resultados de esta sección, conjuntamente con la identidad de los volúmenes de elución en columnas de geles (no mostrado), permiten concluir que la interrelación entre los compuestos a, b y c es también válida para el caso en que dichos oligosacáridos estén acetilados.

Asimismo, se confirma una vez más que la radioactividad debida a las tres marcaciones ((¹⁴C)GlcA, (¹⁴C)Glc y (¹⁴C)-Acetilo), está también asociada a los mismos tres compuestos estudiados en esta sección: los octasacáridos acetilados a, b y c.

FIGURA 60

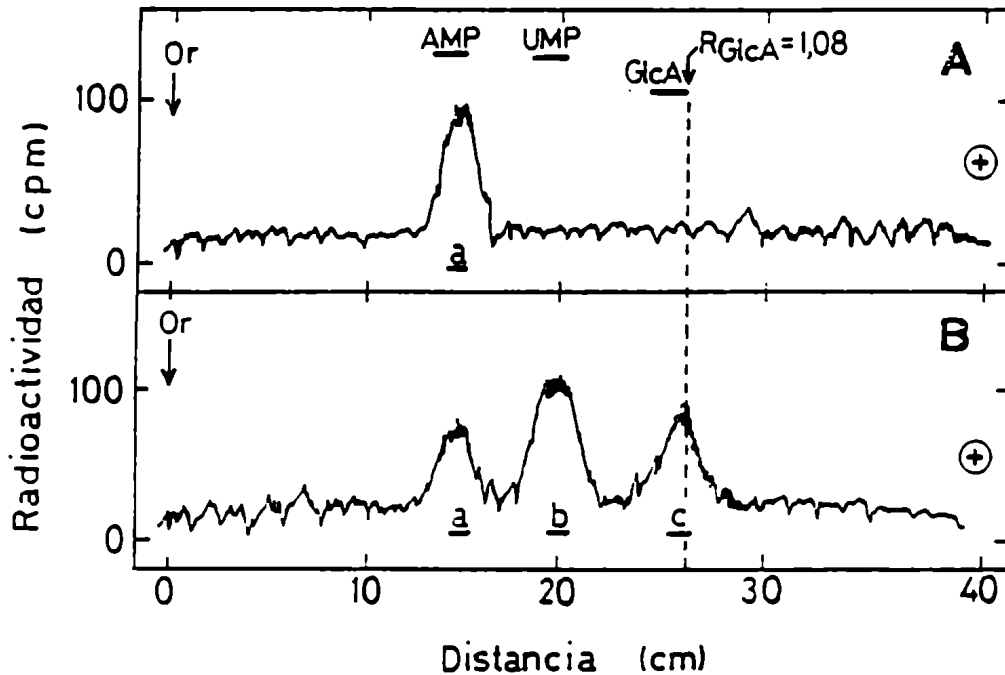


Figura 60: DEPIRUVILACION DEL compuesto c con marca en (^{14}C)Acetilo.

El compuesto c (^{14}C)Acetilo (2.100 cpm) fue hidrolizado en ClH 0.01 N a 100°C durante 90 minutos en ampolla cerrada (265). Luego se separó el exceso de ácido a baja presión y el material se electroforetizó sobre papel Whatman N°1 a 1.000 voltios durante 3 horas, utilizando el solvente B (panel B).

Otra alícuota del mismo compuesto (3.300 cpm) fue sometida a hidrólisis durante solamente 30 minutos y se continuó como en el caso anterior (panel B).

IV.B.8.2.2 Degradación con glucosidasa del octasacárido a marcado con $(^{14}\text{C})\text{GlcA}$

En un primer momento decidimos utilizar como sustrato el octasacárido a con marca en $(^{14}\text{C})\text{GlcA}$. Se trataba, en principio, de probar la actividad de la glucosidasa sobre dicho sustrato y de optimizar las condiciones de incubación.

Se trató a los octasacáridos b y c con ácido suave para eliminar los restos cetal-pirúvicos. El producto depiruvilado se aisló por electroforesis en papel, en donde se comportó como el compuesto a, y posteriormente, por filtración en columna de geles en donde también se comportó como el compuesto a (resultados no mostrados). Luego se trató con glucosidasa de intestino de caracol y finalmente, los productos fueron analizados por electroforesis en papel.

Los resultados mostraron la presencia de tres componentes: n, o y p (Fig. 61, panel A).

El componente n, minoritario, no se estudió. El componente o migró con un R_{f} : 0,85, una posición idéntica a la del disacárido acetilado e (Fig. 61, panel A; véase también Fig. 45, panel C). Asimismo, el material correspondiente al componente o, analizado por cromatografía en papel, también se comportó como el disacárido acetilado e (Fig. 61, panel B).

FIGURA 61

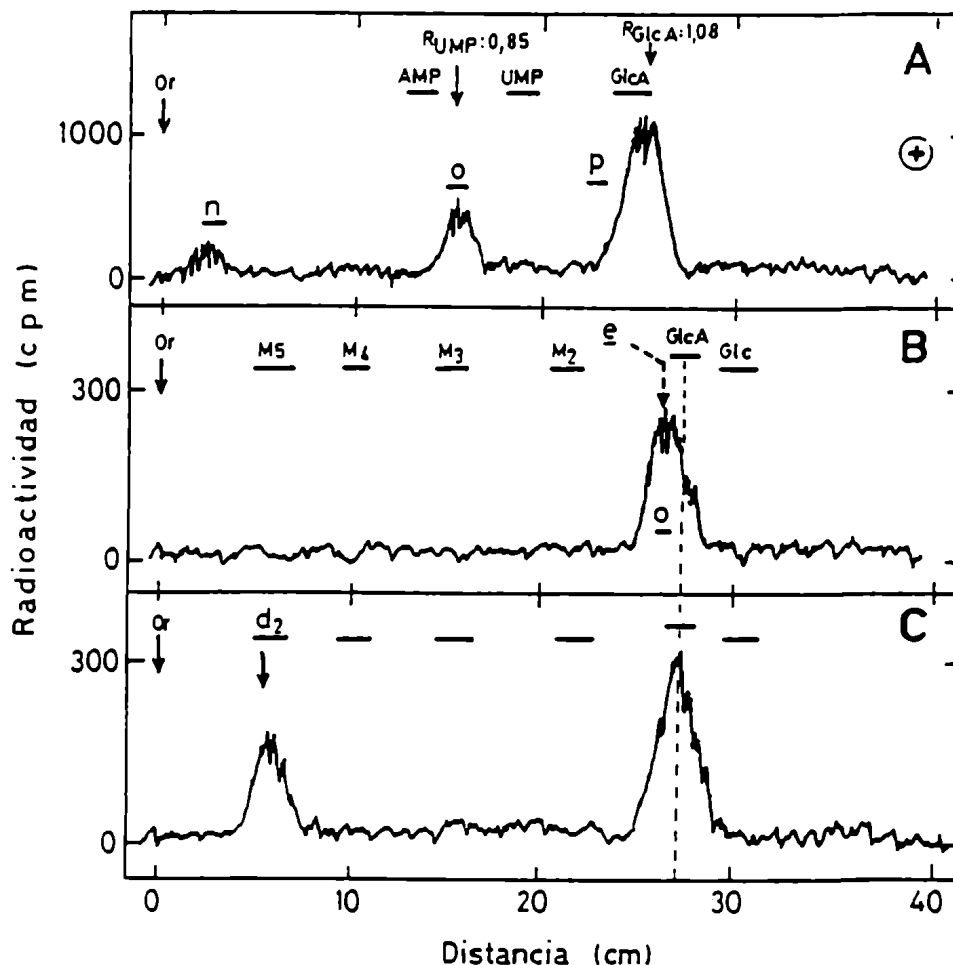


Figura 61: DEGRADACION CON GLUSULASA DEL oligosacárido α -(^{14}C)GlcA.

Panel A: El octasacárido α -(^{14}C)GlcA (13.500 cpm), preparado y aislado como se describe en el texto, fue digerido con glusulasa de intestino de caracol durante un período de 22 horas según se indica (sección III.6.2). Los productos fueron analizados por electroforesis sobre papel Whatman N° 1 a 1.000 volts durante 3 horas, utilizando el buffer B.

Panel B: El material del pico o (panel A) fue eluído y cromatografiado en papel Whatman N° 1 durante un período de 3 días y utilizando el solvente D. La flecha de líneas de puntos indica la posición de migración del disacárido acetilado e, con marca en (^{14}C)Glc, (^{14}C)GlcA o en (^{14}C)-O-Acetilo. Maltopentosa (M_5), maltotetrosa (M_4), maltotriosa (M_3), maltosa (M_2), ácido glucurónico (GlcA) y glucosa (Glc).

Panel C: El material correspondiente al pico p (panel A) fue eluído y analizado por cromatografía en idénticos sistemas y condiciones que para el caso anterior. La flecha indica la posición del trisacárido acetilado d₂ con marca tanto en (^{14}C)Glc como en (^{14}C)GlcA.

El material correspondiente al componente p, analizado por cromatografía en papel, resultó una mezcla de ácido glucurónico y del trisacárido d₂ (es decir, acetilado), sin degradar (Fig. 61, panel C).

Estos resultados significan que el octasacárido a(¹⁴C)GlcA es degradado por la glusulasa y que los productos mayoritarios que resultan de dicha degradación son análogos a los obtenidos a partir del trisacárido acetilado d₂: ácido glucurónico y el disacárido acetilado e (véase también Fig. 45, panel A).

IV.B.8.2.3 Degradación con glusulasa del octasacárido a marcado con (¹⁴C)Acetilo

Con el objeto de confirmar los resultados antedichos (punto anterior), se decidió realizar un experimento similar, pero partiendo esta vez del octasacárido a con marca en (¹⁴C)Acetilo.

Para ello, se preparó octasacárido a(¹⁴C)Acetilo por depiruvilación completa de sus homólogos piruvilados, los octasacáridos b(¹⁴C)Acetilo y c(¹⁴C)Acetilo. El producto depiruvilado se aisló por electroforesis en papel, en donde se comportó como el compuesto a (no mostrado).

Posteriormente, el material se eluyó del papel y se trató con glusulasa por un tiempo mayor al utilizado al tratar el

compuesto a(¹⁴C)GlcA. Se realizó el tratamiento por un período más prolongado con el objeto de disminuir o aún anular la proporción del trisacárido acetilado d₂ (véase Fig. 61, panel C). Los resultados muestran un único componente cuya movilidad fue R_{UMp} : 0,85, es decir que se comportó como el disacárido acetilado e (Fig. 62, panel A). Lógicamente, con esta marcación no fue posible detectar ácido glucurónico y, debido al mayor tiempo de incubación empleado, tampoco se aisló el trisacárido acetilado d₂, cuya movilidad en este sistema es igual a la del estándar de M_5 (véase Fig. 38).

El material de R_{UMp} : 0,85 fue posteriormente analizado por cromatografía en papel empleando el solvente D, en donde también se comportó como un compuesto único y con idéntica movilidad que el disacárido acetilado e (Fig. 62, panel B).

Es decir, que tanto el octasacárido acetilado a (a(¹⁴C)Acetilo), como el trisacárido acetilado d₂ (d₂(¹⁴C)Acetilo), por digestión con glucosidasa producen un compuesto con propiedades análogas: el disacárido acetilado e.

Por lo tanto, estos resultados indican que el octasacárido a (y sus homólogos piruvilados b y c) poseen un resto acetilo (o más), sobre el disacárido que ocupa el extremo reductor, en forma análoga a lo observado con el trisacárido.

Debe mencionarse que, el grupo de Albersheim estudió la composición del EPS sintetizado in vivo por *Rhizobium trifolii*

FIGURA 62

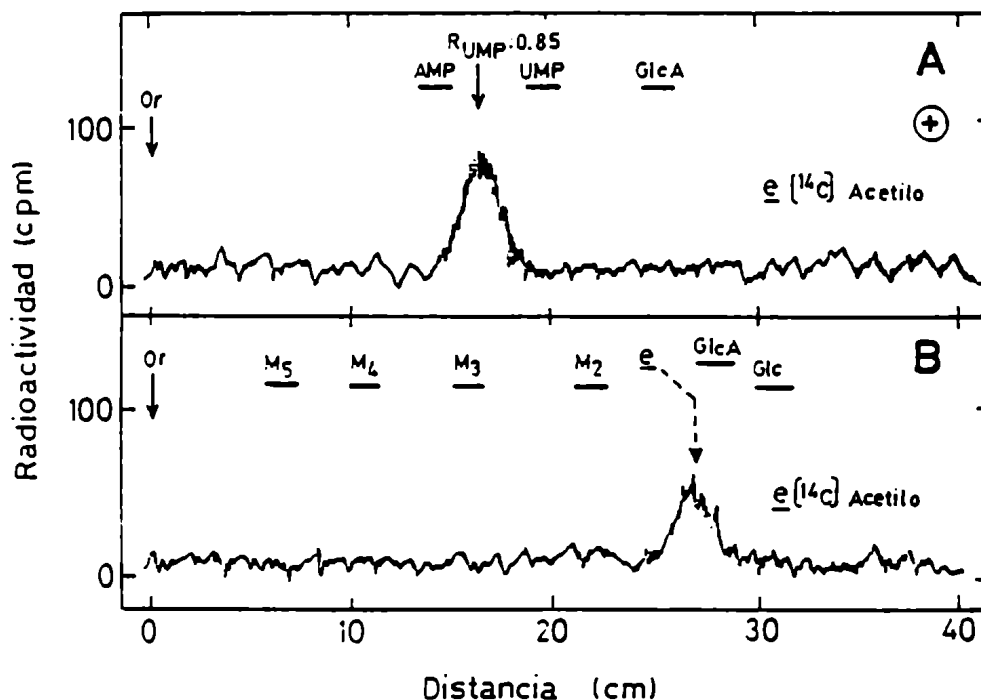


Figura 62: DEGRADACION CON GLUSULASA DEL oligosacárido a(¹⁴C)Acetilo.

Panel A: Octasacárido a con marca (¹⁴C)Acetilo (1.830 cpm) preparado y aislado como se describe en el texto, fue digerido con glusulasa de intestino de caracol durante un período de 28 horas según se indica (sección III.6.2). Posteriormente, el material fue analizado por electroforesis sobre papel Whatman N°1 a 1.000 volts durante 3 horas, utilizando el solvente B.

Panel B: El material correspondiente al pico que se muestra en el panel A fue eluido del papel y analizado por cromatografía utilizando idéntico sistema y condiciones que para el caso de la Fig. 61, panel C.

NA-30 y comunicó el hallazgo de unidades repetitivas sin O-Acetilar, con uno o con dos grupos O-Acetilos (259). Los estudios de biosíntesis in vitro presentados en esta tesis dan cuenta del aislamiento de por lo menos un oligosacárido desacetilado (el trisacárido d₁) y tres oligosacáridos acetilados (el trisacárido d₂, los octasacáridos b y c). Dado que la acción de la glucosidasa es bloqueada por restos O-Acetilos (sección IV.B.4.5.3), puede descartarse la presencia de restos O-Acetilos más allá del disacárido que ocupa el extremo reductor del octasacárido a; es decir el disacárido acetilado denominado "compuesto e". Asimismo, no puede descartarse la presencia de más de un resto O-Acetilo en dicho disacárido.

Además, trabajando con el EPS sintetizado in vivo, los autores antes mencionados informaron el aislamiento de algunas unidades repetitivas sustituidas por un resto O-3-Hidroxibutirilo (259). Con nuestro sistema de síntesis in vitro no logramos visualizar cambios de movilidad en los compuestos de nuestro interés cuando los mismos fueron aislados a partir de "Extractos 1203" obtenidos en presencia de hidroxibutiril-CoA añadido como precursor frío (resultados no mostrados).

IV.B.9 Estudios de los productos de incorporación a "Extracto 1203" variando la temperatura y los tiempos de incubación

Como dijimos anteriormente (secciones II.2 y II.3), trabajos previos en nuestro laboratorio con los sistemas de *Xanthomonas campestris* y *Acetobacter xylinum*, habían mostrado que, omitiendo ciertos precursores o modificando las condiciones de temperatura y tiempos de incubación, era posible estudiar la incorporación secuencial de los diferentes azúcares a la unidad repetitiva unida a lípido.

Pareció razonable emprender un estudio similar en nuestro caso.

Con *Rhizobium trifolii* NA-30, los resultados indicaron la presencia de distinta cantidad y variedad de aceptores y dadores endógenos en los preparados enzimáticos utilizados. Esta variación dependía además del lote de enzima. Se intentó entonces evitar o disminuir la presencia de dadores endógenos (nucleótido-azúcares) mediante diálisis de los preparados enzimáticos previa a la incubación. Los resultados no fueron diferentes. Decidimos entonces modificar la temperatura y los tiempos de incubación con la esperanza de aislar productos de biosíntesis de distinta complejidad.

Se realizaron curvas de tiempo y temperatura utilizando UDP(¹⁴C)GlcA como precursor radioactivo. La marcación proveniente

de este precursor es la más específica, dado que, como dijimos (sección IV.B.1.1), diferentes cepas de Rhizobios son productoras de glucanos cuyo precursor es UDP-Glc. Se observó un máximo a una temperatura de 25°C. A menos de 10°C y a más de 35°C, las incorporaciones de radioactividad a "Extracto 1203" (proveniente de UDP(¹⁴C)GlcA), resultaron muy bajas (Fig. 63).

A tres temperaturas diferentes (10°C, 20°C y 25°C), se estudió la incorporación en distintos tiempos de incubación (Fig. 64).

Se observó que, a un tiempo dado, la incorporación de radioactividad es mayor a la temperatura más alta.

A 10°C, el aumento de incorporación es lineal, no así en el caso de las curvas de 20°C y 25°C, las cuales mantienen linealidad hasta unos 45 min.

FIGURA 63

CURVA DE INCORPORACION DE (¹⁴C)GlcA A "Extracto 1203"
A DISTINTAS TEMPERATURAS Y A TIEMPO DE INCUBACION CONSTANTE

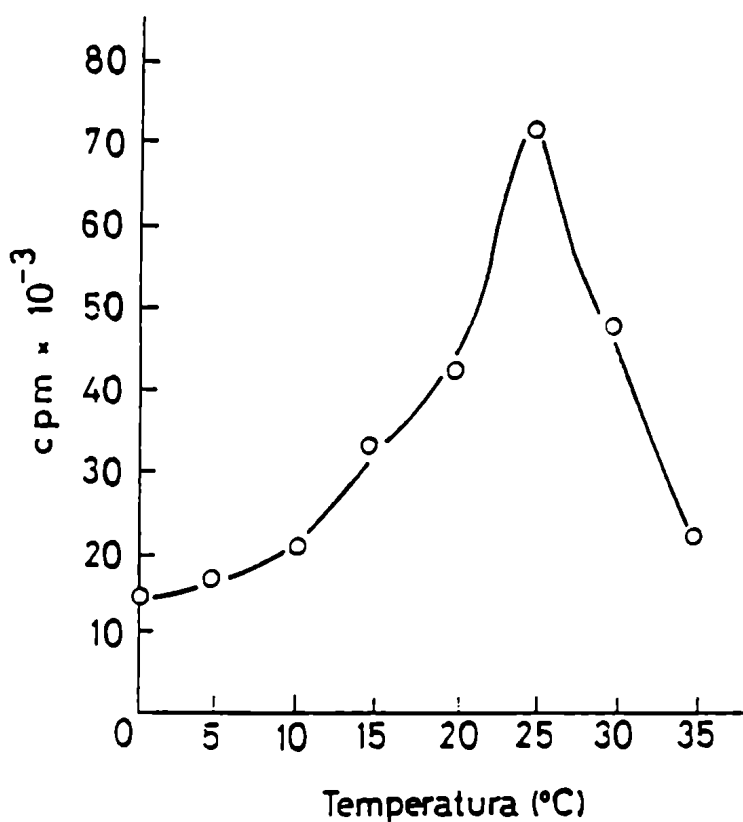


Figura 63: En todos los casos, las incubaciones fueron realizadas en presencia de UDP(¹⁴C)GlcA (1.000 pmoles) y UDP-Glc (25.000 pmoles) durante el período de 60 min y a cada una de las temperaturas indicadas sobre abscisas. Cada punto representa la incorporación de radioactividad a "Extracto 1203".

FIGURA 64

CURVAS DE INCORPORACION DE (¹⁴C)GlcA A "Extracto 1203"
A DISTINTAS TEMPERATURAS EN FUNCION DEL TIEMPO DE INCUBACION

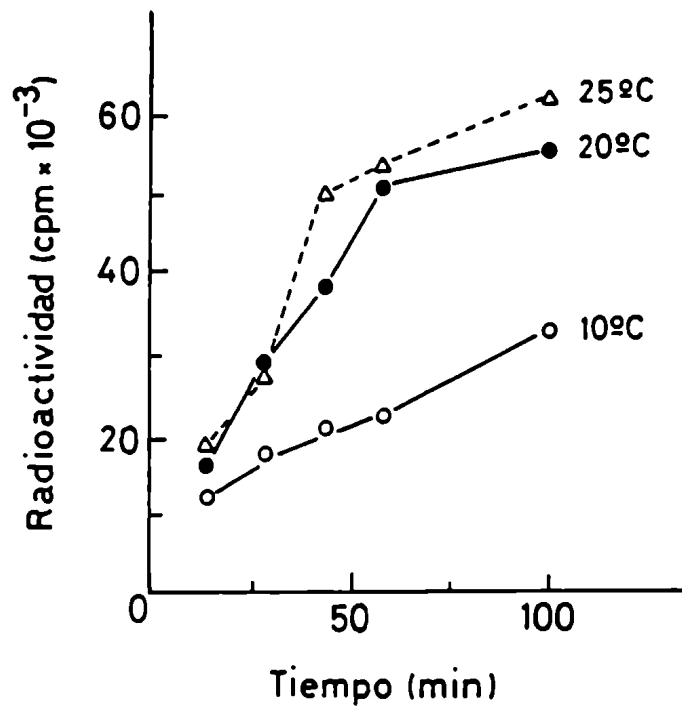


Figura 64: En todos los casos, las incubaciones fueron realizadas en presencia de UDP(¹⁴C)GlcA (1.000 pmoles) y de UDP-Glc (25.000 pmoles), durante los tiempos indicados y a tres temperaturas diferentes: 10°C (—○—), 20°C (—●—) y 25°C (---△---). Cada punto representa incorporación de radioactividad a "Extracto 1203".

El análisis de los oligosacáridos asociados a los prenilfosfo-azúcares presentes en los extractos obtenidos a diferentes tiempos, se realizó por electroforesis en papel luego de liberar las porciones sacarídicas mediante hidrogenación catalítica con platino (H₂-Pt, sección IV.B.6.2).

Se procedió de este modo pues los productos obtenidos por hidrólisis ácida suave se enriquecían en los compuestos depiruvilados total o parcialmente (octasacáridos a y b, respectivamente; sección IV.B.6.1).

De esta manera, obtuvimos la incorporación de radioactividad a cada uno de los siguientes sacáridos logrados por síntesis in vitro: trisacáridos totales (d₁ + d₂), octasacárido monopiruvilado (b), octasacárido dipiruvilado (c), y un componente que fue preliminarmente caracterizado como ácido urónico (197) (Fig. 65). En ninguna de las condiciones ensayadas se aislaron productos diferentes de los mencionados. En tiempos de incubación menores de 15 minutos, las incorporaciones de radioactividad a "Extracto 1203" fueron sumamente bajas, y el análisis de dichos extractos resultó prácticamente imposible.

Se observó que a baja temperatura (10°C) e independientemente del tiempo de incubación, el mayor porcentaje de radioactividad estuvo asociado a trisacáridos (Fig. 65, panel A).

A una temperatura superior (25°C), en todos los tiempos de incubación, la radioactividad asociada a octasacáridos fue siempre mayor. A partir de los 45 minutos de incubación, la radioactividad asociada a trisacáridos comenzó a disminuir en el mismo valor y simultáneamente al aumento de la radioactividad asociada a octasacáridos (Fig. 65, panel B).

En la Tabla XI, se muestran las incorporaciones absolutas y los porcentajes de radioactividad debidos a cada compuesto.

Se observa que para una temperatura de 10°C, la cantidad relativa de cada oligosacárido es similar a tiempos cortos (15 minutos) que a tiempos mayores (la diferencia nunca fue mayor que el 10%). La situación es diferente para una temperatura de 25°C: los trisacáridos disminuyen su relación desde un 50% (a los 15 minutos), hasta un 25% en tiempos mayores (a los 120 minutos). Paralelamente a dicha disminución, los octasacáridos incrementan su relación en el mismo valor: desde un 45% (a los 15 minutos) hasta un 70% (a los 120 minutos). Debe destacarse que en ninguna de las condiciones ensayadas se encontró transferencia de radioactividad a fase acuosa en los lavados de la mezcla de incubación (polisacárido liberado, sección III.3.2), o a los precipitados de células (polisacárido unido al cuerpo celular).

Los resultados mencionados en esta sección permiten pensar en una relación precursor-producto entre los trisacáridos (d₁ y d₂) unidos a lípido, y los octasacáridos (b y c) unidos a lípido.

FIGURA 65

CURVAS DE INCORPORACION DE (¹⁴C)Glca A LOS DISTINTOS COMPUESTOS
SINTETIZADOS "IN VITRO" PRESENTES EN "Extracto 1203"
A DISTINTAS TEMPERATURAS Y EN FUNCION DEL TIEMPO DE INCUBACION

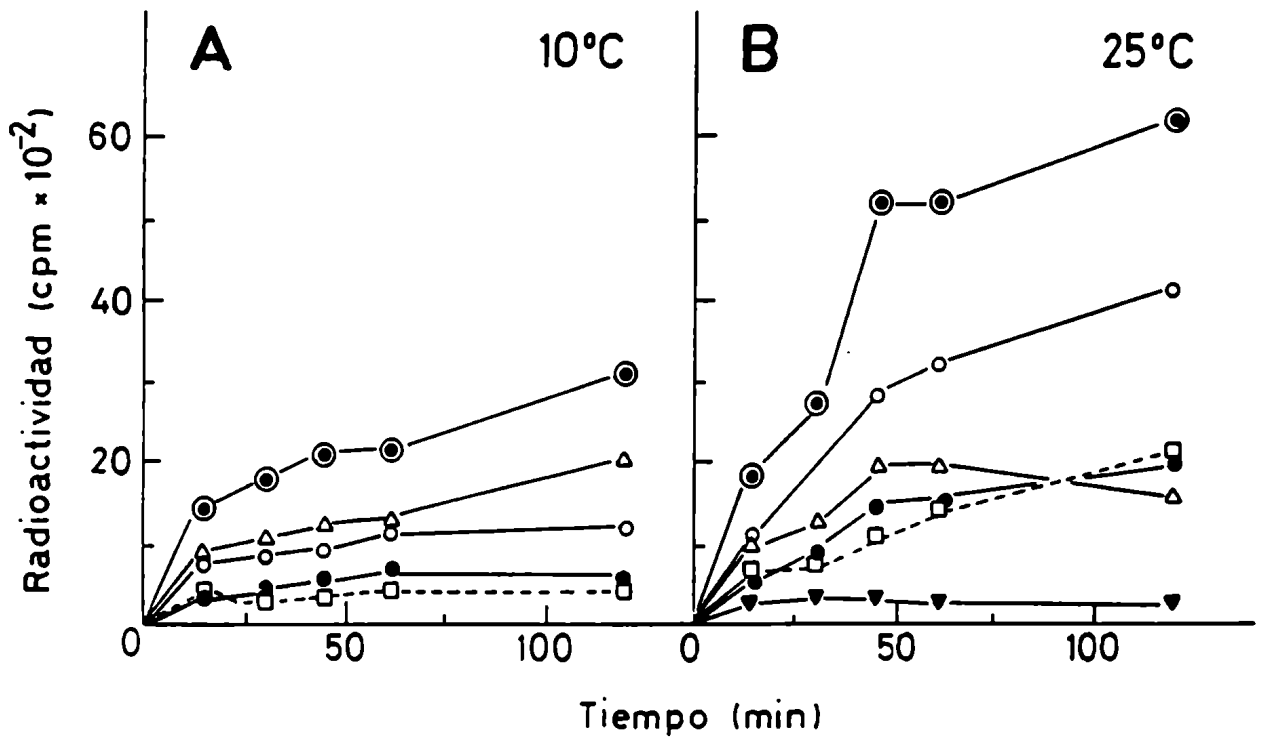


Figura 65: "Extracto 1203", correspondiente a cada tiempo y obtenido a cada temperatura (Fig. 64), fue sometido a reducción catalítica con platino según se indica (sección III.4.3). Posteriormente, los oligosacáridos fosforilados fueron fraccionados por electroforesis en papel. Finalmente, se calculó la radioactividad debida a cada compuesto. Se graficó dicho valor para cada tiempo y a dos temperaturas diferentes: 10°C (panel A) y 25°C (panel B). Radioactividad total (●), octosacáridos totales (▲), octosacárido dipiruvilado (○), octosacárido monopiruvilado (●), trisacáridos (□), y ácido urónico (▼).

TABLA XI

EVALUACION ABSOLUTA Y PORCENTUAL DE LOS COMPUESTOS RADIOACTIVOS

SINTETIZADOS IN VITRO POR Rhizobium trifolii NA-30

TEMP. (°C)	TIEMPO (min)	TRISACARIDOS		OCTASACARIDO-Pir		OCTASACARIDO-Pir ₂		AC. URONICO	
		cpm	%	cpm	%	cpm	%	cpm	%
10	15	7625	61.79	2379	18.66	2475	19.86	-	-
	30	9379	56.58	3729	22.62	3499	21.21	-	-
	45	11869	57.91	5186	25.38	3586	17.28	-	-
	60	12867	55.10	5842	26.21	4242	19.06	-	-
	120	21681	65.68	5544	16.88	5874	17.83	-	-
25	15	9216	50.09	4675	25.41	3367	18.30	1221	6.64
	30	13373	45.18	7651	25.85	6284	21.23	1998	6.75
	45	20076	37.80	15629	29.53	12174	22.97	4310	8.24
	60	19657	35.74	15977	29.05	15218	27.67	3632	6.41
	120	15649	24.84	20802	33.02	21861	34.70	3666	5.82

TABLA XI: Los compuestos fueron preparados y aislados como se describe en la leyenda de la Fig. 65.

IV.B.10 Extensión a otras cepas de Rhizobios de los estudios desarrollados con Rhizobium trifolii NA-30

Como dijimos anteriormente (sección I.5, Fig. 7) distintas especies de rhizobios que nodulan diferentes huéspedes pueden producir exopolisacáridos con idéntica estructura de restos glicosídicos. Además, fue sugerido que la sustitución de las porciones sacarídicas de los distintos EPS con diferentes restos no glicosídicos (acetilos, succinilos, cetal-piruvatos, metilos, etc.) contribuirían a la función que se discute para estas macromoléculas (259).

Con el objeto de estudiar la biosíntesis de los EPSs en diferentes cepas, se obtuvieron preparados enzimáticos (sección III.1.3) de *Rhizobium trifolii* ATCC 14479, y de *Rhizobium leguminosarum* 128-C-53 y 128-C-63.

Como adelantáramos, no se logró síntesis in vitro del polímero con ninguna de las cepas mencionadas (sección IV.B.1.1). En cambio, fue posible transferir radioactividad proveniente de UDP(¹⁴C)GlcA a material extraíble con "extracto 1203" (Tabla VII). Asimismo, también se logró transferir radioactividad a dicho extracto cuando se utilizó UDP(¹⁴C)Glc como precursor radioactivo (Tabla XII).

TABLA XII

INCORPORACION DE RADIOACTIVIDAD A "Extracto 1203"

A PARTIR DE DIFERENTES PRECURSORES UTILIZANDO

PREPARADOS ENZIMATICOS DE DISTINTAS CEPAS

Exp.	Preparado		Dador		Radioactividad en "Extracto 1203" (pmoles/mg proteína)
	Enzimático	Radioactivo	No radioactivo		
1	R. trifolii	UDP(¹⁴ C)GlcA	UDP-Glc		6.8
2	ATCC 14479	UDP(¹⁴ C)Glc	UDP-GlcA		3.9
3	R. leguminosa-	UDP(¹⁴ C)GlcA	UDP-Glc		9.3
4	rum 128-C-63	UDP(¹⁴ C)Glc	UDP-GlcA		2.7
5	R. leguminosa-	UDP(¹⁴ C)GlcA	UDP-Glc		55.4
6	rum 128-C-53	UDP(¹⁴ C)Glc	UDP-GlcA		19.6

TABLA XII: Las incubaciones fueron realizadas en condiciones estándar (sección III.3.1) y en presencia de UDP(¹⁴C)GlcA (1.000 pmoles) y de UDP-Glc (25.000 pmoles) (Exp. 1,3 y 5); ó de UDP(¹⁴C)Glc (1.000 pmoles) y UDP-GlcA (25.000 pmoles) (Exp. 2,4 y 6).

Para todas las cepas mencionadas, la transferencia de radioactividad al extracto fue mayor cuando la marcación se realizó utilizando UDP(¹⁴C)GlcA (Tabla XII). De las cepas antedichas, *Rhizobium leguminosarum* 128-C-53, resultó el sistema más activo en la transferencia de radioactividad a compuestos solubles en "extracto 1203", con cualquiera de las marcaciones utilizadas (Tabla XII).

En cada caso, los "extractos 1203" fueron sometidos a hidrólisis ácida suave y posteriormente el material radioactivo se trató con fosfatasa alcalina con el objeto de liberar de fosfato las porciones sacarídicas. Posteriormente, dichas porciones sacarídicas fueron analizadas por electroforesis en papel.

Los resultados (Fig. 66) muestran en todos los casos un mismo perfil de compuestos aislados por este criterio: N, a, b y c (obtenidos con radioactividad proveniente de UDP(¹⁴C)Glc, paneles IA, IIA y IIIA); y a, b y c (obtenidos con radioactividad proveniente de UDP(¹⁴C)GlcA, paneles IB, IIB y IIIB).

El compuesto N observado al utilizar UDP(¹⁴C)Glc fue atribuido a un/os glucano/s, cuyo análisis no nos ocupa, y que también fuera observado en el caso de *Rhizobium trifolii* NA-30 (Fig. 23, panel A).

FIGURA 66

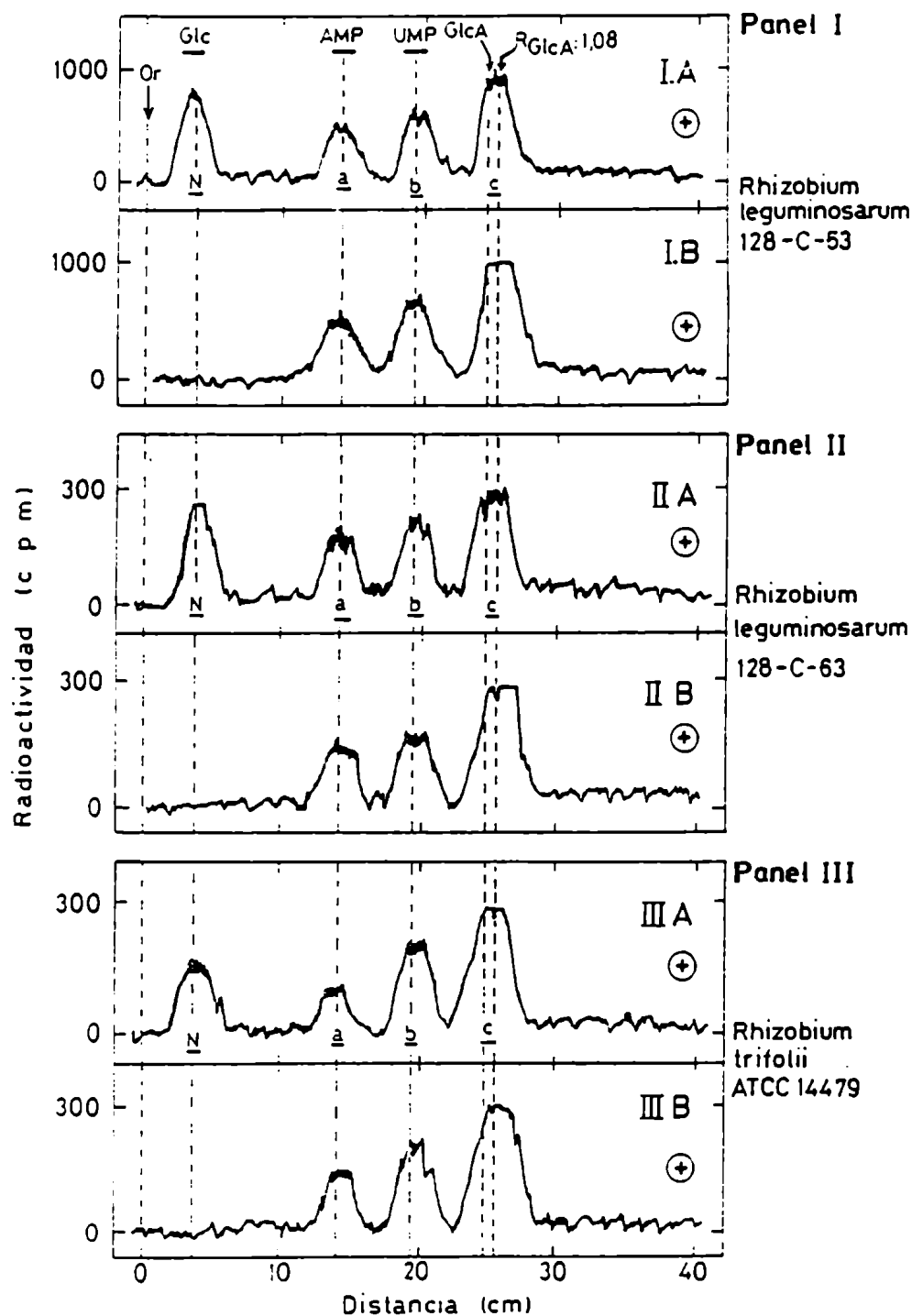


Figura 66: ELECTROFORESIS DE LOS COMPUESTOS RADIOACTIVOS LIBERADOS MEDIANTE HIDROLISIS ACIDA SUAVE DE LOS "Extractos 1203" OBTENIDOS CON MARCA EN ^{14}C Glc O EN ^{14}C GlcA UTILIZANDO PREPARADOS ENZIMATICOS DE DIFERENTES CEPAS (Ver leyenda en la página siguiente).

Panel I: Rhizobium leguminosarum 128-C-53. Se obtuvo "Extracto 1203" (18.200 cpm) utilizando un preparado enzimático de Rhizobium leguminosarum 128-C-53 en una incubación estándar utilizando UDP(¹⁴C)Glc (1.000 pmoles) y en presencia de UDP-GlcA (25.000 pmoles). El extracto fue sometido a hidrólisis ácida en ClH 0.01 N a 100°C durante 10 min. Se eliminó el exceso de ácido a baja presión, se trató con fosfatasa alcalina según se describe (sección III.6.1), y finalmente el material se electroforetizó sobre papel Whatman N° 1 a 1.000 volts durante un período de 3 horas, utilizando el solvente B (Panel I.A).

"Extracto 1203" (19.200 cpm) con radioactividad proveniente de UDP(¹⁴C)GlcA (1.000 pmoles), obtenido en una incubación estándar según se indica (sección III.3.1) y en presencia de UDP-Glc (25.000 pmoles) fue tratado y analizado como en el caso anterior (Panel I.B).

Panel II: Rhizobium leguminosarum 128-C-63. Se obtuvo "Extracto 1203" (8.400 cpm) como en el caso del panel I.A, pero utilizando un preparado enzimático de Rhizobium leguminosarum 128-C-63. Se procesó el extracto como en el caso anterior (Panel II.A).

Se obtuvo "Extracto 1203" (11.600 cpm) como en el caso del panel I.B, pero utilizando un preparado enzimático de Rhizobium leguminosarum 128-C-63. Se procesó el extracto como en el caso anterior (Panel II.B).

Panel III: Rhizobium trifolii ATCC 14479. Se obtuvo "Extracto 1203" (9.700 cpm) como en el caso del panel I.A, pero utilizando un preparado enzimático de Rhizobium trifolii ATCC 14479. Se procesó el extracto como en los casos anteriores (Panel III.A).

Se obtuvo "Extracto 1203" (12.300 cpm) como en el caso del panel I.B, pero utilizando un preparado enzimático de Rhizobium trifolii ATCC 14479. Se procesó el extracto como en los casos anteriores (Panel III.B).

En todos los casos, los compuestos a, b y c (con cualquiera de las marcaciones utilizadas) fueron analizados por filtración en columna de Bio-Gel P2: eluyeron como los compuestos homónimos aislados con el sistema de Rhizobium trifolii NA-30. Como ejemplo, se muestran los resultados obtenidos con Rhizobium leguminosarum 128-C-53 (Fig. 67). Los resultados fueron análogos con las otras cepas.

Con ninguna de las cepas mencionadas en esta sección, se logró preparar el trisacárido d, producido por el sistema de síntesis de Rhizobium trifolii NA-30, cuya caracterización se describe en esta tesis.

Los resultados presentados en esta sección permiten concluir que distintas cepas de Rhizobios comparten idénticos mecanismos de síntesis de sus respectivos EPSs, por lo menos hasta el nivel de análisis estudiado: entrada de restos glucosídicos vía intermediarios lipídicos.

FIGURA 67

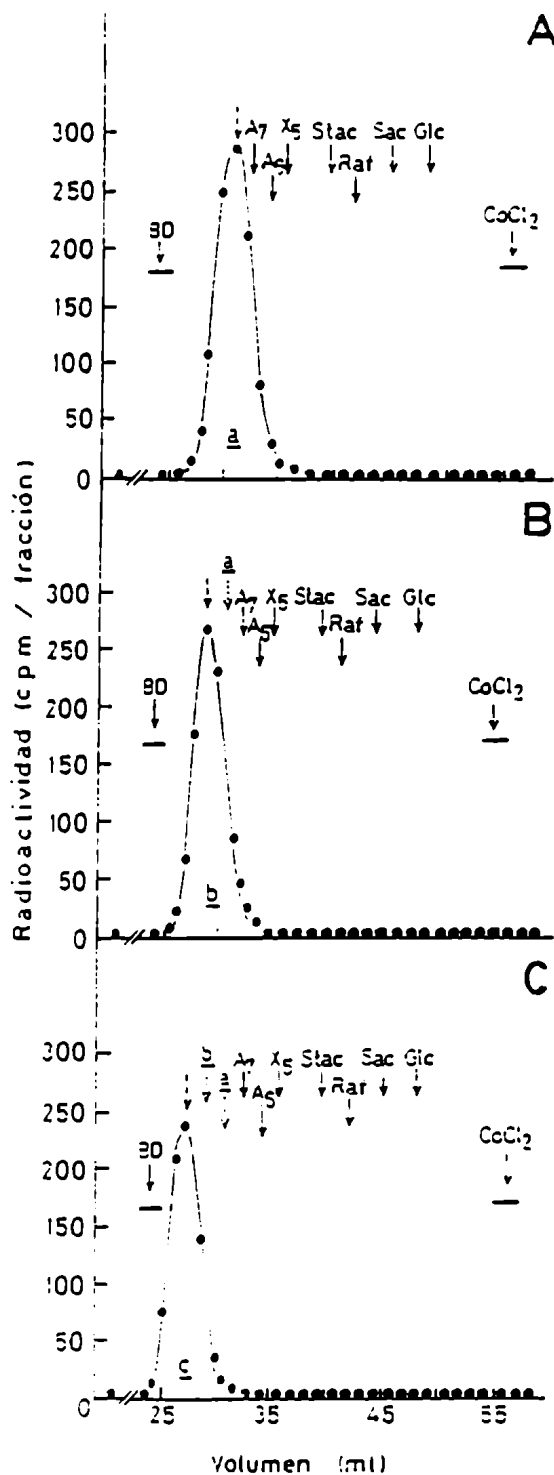


Figura 67: FILTRACION POR Bio-Gel P₂ DE LOS oligosacáridos a, b y c SINTETIZADOS "IN VITRO" POR *Rhizobium leguminosarum* 128-C-53 (marcación con radioactividad proveniente de UDP(¹⁴C)Glc, ver leyenda en la página siguiente).

Panel A: Compuesto a con marca en (^{14}C)Glc (2.600 cpm), fue eluido del pico homónimo (Fig. 66, Panel I.B) y cromatografiado en columna de Bio-Gel P₂ según se describe (sección III.7.2). Las flechas llenas indican los volúmenes de elución de los siguientes estándares: glucosa (Glc), sacarosa (Sac), rafinosa (Raf), estaquirosa (Stac), pentasacárido de Xanthomonas campestris (X₅) (64,221), hexasacárido de Acetobacter xylinum (A₆), y heptasacárido de Acetobacter xylinum (A₇) (203,204). La flecha de línea cortada indica la posición de elución de los compuestos a sintetizados in vitro por Rhizobium leguminosarum 128-C-63 ó por Rhizobium trifolii ATCC 14479 (con marca en (^{14}C)Glc ó en (^{14}C)GlcA).

Panel B: Compuesto b con marca en (^{14}C)Glc (2.470 cpm) fue eluido del papel del pico homónimo (Fig. 66, Panel I.B) y analizado como en el caso anterior. La flecha de línea cortada indica la posición de elución de los compuestos b sintetizados in vitro por Rhizobium leguminosarum 128-C-63 ó por Rhizobium trifolii ATCC 14479 (con marca en (^{14}C)Glc ó en (^{14}C)GlcA).

Panel C: Compuesto c con marca en (^{14}C)Glc (2.220 cpm) fue eluido del papel del pico homónimo (Fig. 66, Panel I.B), y analizado como en los casos anteriores. La flecha de línea cortada indica la posición de elución de los compuestos c sintetizados in vitro por Rhizobium leguminosarum 128-C-63 ó por Rhizobium trifolii ATCC 14479 (con marca en (^{14}C)Glc ó en (^{14}C)GlcA). Las flechas de líneas de puntos (a y b) indican las posiciones de elución de los compuestos a y b sintetizados in vitro por Rhizobium trifolii NA-30, Rhizobium trifolii ATCC 14479, Rhizobium leguminosarum 128-C-53 ó Rhizobium leguminosarum 128-C-63 con cualquiera de las marcaciones utilizadas ((^{14}C)Glc ó (^{14}C)GlcA).

VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES

En este trabajo se ha intentado estudiar la biosíntesis del exopolisacárido ácido (EPS) producido por varias cepas de rizobios. Como en la sección RESULTADOS (sección III), ya se ha discutido cada experimento con cierto detalle, en este capítulo se hará una breve revisión de los mismos, destacando las conclusiones más significativas:

VI.1 Estudios in vivo

La primera tarea consistió en investigar la producción de EPS in vivo. Se estudiaron las siguientes cepas: *Rhizobium trifolii* NA-30 y ATCC 14479, y *Rhizobium leguminosarum* 128 C-53 y 128 C-63. Atendiendo a la producción de EPS (Tabla IV) y a la capacidad de nodulación de las distintas cepas (Tabla VI), *Rhizobium trifolii* NA-30 pareció el sistema más apropiado para emprender los estudios in vitro.

En todos los casos, se confirmó que los respectivos EPSs tenían la composición de restos glicosídicos descrita en la literatura por el grupo de Albersheim (Ref. 157, Fig. 15 y Tabla V). En el caso de *Rhizobium trifolii* NA-30, se confirmó también la composición de restos no glicosídicos.

VI.2 Estudios in vitro

El estudio de otros sistemas en nuestro laboratorio había demostrado que la biosíntesis de estos polisacáridos complejos implica por lo menos dos estadios: en el primero, la unidad repetitiva se monta secuencialmente sobre un prenil-fosfato a partir de los respectivos nucleótido-azúcares dadores; y en el segundo, la unidad repetitiva se polimeriza formando el EPS final. Asimismo, estos estudios habían hecho ver que células permeabilizadas con EDTA/Tris y shock frío constituyen un adecuado sistema enzimático para investigar in vitro este tipo de problema.

Como la estructura del EPS era conocida (Fig. 15, página), se utilizaron como precursores de los azúcares componentes los nucleótido-azúcares más comunes: UDP-GlcA y UDP-Glc, marcados tanto con ^{14}C en la porción sacarídica como con ^{32}P en el fosfato vecino al azúcar.

Los productos del primer estadio se aislaron por extracción con "Solvente 1203", y los del segundo por precipitación con etanol 66% o por cromatografía.

Solo se observó formación de productos del primer estadio, es decir, lípido-azúcares, y también en este caso la cepa NA-30 resultó la más activa, pues produjo la máxima transferencia de

radioactividad a material liposoluble (Tabla VII). El estudio in vitro se realizó fundamentalmente con esta cepa.

La ausencia de productos del segundo estadio no resultó sorprendente, dada la imposibilidad de obtenerlos hasta el presente con los sistemas de síntesis de EPS descritos en este y otros laboratorios (204,205,208), a excepción de los casos del polisacárido capsular (CPS) producido por *Aerobacter aerogenes* (189,190) y del EPS ácido de *Xanthomonas campestris*. Con este último sistema, trabajos de nuestro laboratorio permitieron lograr la biosíntesis *in vitro* del xantano (64,196).

Con respecto a los productos del primer estadio, se logró la transferencia de radioactividad proveniente de UDP(¹⁴C)GlcA o de UDP(¹⁴C)Glc a material liposoluble, lo cual constituyó el primer indicio de que (¹⁴C)GlcA y (¹⁴C)Glc podían formar parte de dicho material (Tabla VII).

Con la primera de las marcaciones nombradas, la incorporación de radioactividad se estimuló por el agregado de UDP-Glc no radiactivo a la mezcla de incubación (Tabla VII, exp. 1 y 2).

La inversa no fue tan clara, dado que no se observó una gran estimulación cuando se midió transferencia de radioactividad a partir de UDP(¹⁴C)Glc en presencia de UDP-GlcA no radioactivo (Tabla VII, exp. 3 y 4). Una posible explicación de estos resultados es que los preparados enzimáticos utilizados tuvieron

diferentes proporciones de dadores endógenos: en este caso, mayor cantidad de UDP-GlcA que de UDP-Glc. Se intentó modificar los valores de incorporación mediante diálisis de los preparados enzimáticos previa a la incubación, pero aún en este caso la estimulación no resultó mucho mayor.

Dado que distintas cepas de rhizobios producen también glucanos (36,37,38,39 y 40) cuyo precursor posiblemente es UDP-Glc (263) el compuesto neutro observado en nuestro caso (Fig. 17, panel C y Fig. 23, panel A) al utilizar UDP(¹⁴C)Glc como precursor podría ser un oligosacárido similar (sección IV.B.3.1). Esta incorporación secundaria o lateral para nuestro estudio pudo enmascarar la posible estimulación producida por el agregado de UDP-GlcA.

Por otra parte la estimulación de la incorporación de marca proveniente de UDP(¹⁴C)GlcA (Tabla VII, exp. 1 y 2), así como la pequeña estimulación en el caso de utilizar UDP(¹⁴C)Glc (Tabla VII, exp. 3 y 4) resultó además dependiente de la partida de enzima utilizada, dificultando aún más la interpretación precisa de los valores de incorporación de radioactividad al "extracto 1203".

Los compuestos liposolubles permanecieron en el lugar de siembra cuando fueron sometidos intactos a electroforesis en papel (Fig. 17, panel A), lo que resultó concordante con la naturaleza lipídica de los mismos. El análisis de dichos com-

puestos intactos mediante cromatografía en columnas de DEAE-celulosa permitió aislar dos fracciones mayoritarias, I y II, las cuales se eluyeron con concentraciones de 1,0 M y 1,4 M de acetato de amonio, respectivamente. Las fracciones I y II pudieron prepararse con radioactividad proveniente tanto de UDP(¹⁴C)GlcA, de UDP(¹⁴C)Glc, como de beta(³²P)UDP-Glc (Figs. 20, 21 y 22, respectivamente).

Estos resultados condujeron a pensar que tanto (¹⁴C)GlcA como (¹⁴C)Glc, así como también (³²P) estaban asociados al mismo grupo de compuestos lipofílicos. Las altas molaridades de elución resultaron congruentes con la densidad de carga presente en la unidad repetitiva del EPS de la cepa en estudio (Fig. 15, página 225). Por tratamiento ácido suave, la fracción I liberó solo un compuesto radioactivo: el compuesto d, que como discutiremos más adelante, resultó un trisacárido. La fracción II también resultó lábil frente al ácido suave y liberó los octasacáridos a, b y c (Fig. 27, paneles A y B, respectivamente).

La labilidad en medio ácido suave de las fracciones mayoritarias (I y II) resultó un fuerte indicio de que dichos compuestos eran prenil-fosfo-azúcares.

Asimismo, los "extractos 1203" obtenidos con radioactividad proveniente tanto de UDP(¹⁴C)GlcA como de UDP(¹⁴C)Glc, tratados directamente con ácido suave, liberaron los mismos cuatro oligosacáridos antes mencionados (a, b, c y d), los cuales fueron

aislados mediante electroforesis en papel y filtración por Bio-Gel P2 (Figs. 23, 24, 25 y 26).

Los oligosacáridos c y d poseen idéntica movilidad electroforética en el solvente utilizado (RGLcA: 1,08, componente c'), pero son perfectamente separables en columna de Bio-Gel P2 (Fig. 26).

Por otra parte, los compuestos presentes en el "extracto 1203" también resultaron lábiles en medio alcalino suave, y por este tratamiento originaron dos derivados (1° y 2°), los que pudieron obtenerse con marca tanto en (^{14}C) (Fig. 18) como en (^{32}P) (Fig. 50).

Los derivados 1° y 2° resultaron resistentes al tratamiento directo con fosfatasa alcalina: mediante dicho procedimiento solo fueron defosforilados si previamente eran sometidos a una hidrólisis ácida suave (Fig. 22, panel C), todo lo cual permitió caracterizarlos como oligosacáridos fosfodiésteres cíclicos.

La formación de fosfodiésteres cíclicos de oligosacáridos mediante tratamiento alcalino suave, también es característica de prenil-difosfo-azúcares, siempre que el oxhidrilo del C2 del azúcar unido al fosfato más cercano esté libre y en posición "cis" respecto del mismo (201), sugiriendo la presencia de un puente difosfato en estos derivados.

Asimismo, los compuestos liposolubles pudieron clivarse mediante hidrogenación catalítica con platino ($\text{H}_2\text{-Pt}/10 \text{ min/temp.}$

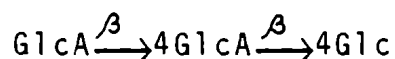
ambiente), una técnica que rompe la unión prenil-fosfato pero no la ligadura azúcar-fosfato, y originaron compuestos radioactivos de mayor movilidad electroforética que los obtenidos al liberar las porciones sacarídicas del lípido mediante tratamiento ácido o alcalino suaves (Fig. 54, panel A). Dichos compuestos, tratados con fosfatasa alcalina perdieron movilidad y originaron los oligosacáridos b, c y d (Fig. 54, paneles B, C y D respectivamente), indicando que no se trataba de ésteres cíclicos sino de mono o difosfatos. La alta movilidad electroforética observada constituyó otro resultado en apoyo de la presencia de unión difosfato entre las porciones sacarídicas y el lípido. Además, la capacidad de los compuestos liposolubles de descomponerse mediante H_2 -Pt, sugirió con bastante fundamento que la porción lipídica estaría constituida por un prenil alílico. Los poliprenoles dolicolicos no dan esta reacción (231). Debe destacarse que por H_2 -Pt y posterior tratamiento con fosfatasa alcalina no se observó la presencia del oligosacárido a (Fig. 54).

La existencia de un puente difosfato, ya referida también al observar la labilidad de los compuestos liposolubles en medio alcalino suave (sección IV.B.2.2) se confirmó mediante el aislamiento de (^{32}P)Pirofosfato inorgánico, luego de someter el material liposoluble (marcado con radioactividad proveniente de beta(^{32}P)UDP-Glc) a hidrólisis ácida suave en tiempos muy cortos (Fig. 51). Nuevamente, esta labilidad de la unión lípido-fosfato es característica de los derivados alílicos (en los derivados

dolicólicos esta unión es estable) (231), reafirmando que la porción lipídica muy probablemente es un prenol alílico, del tipo del undecaprenol descrito en bacterias (267).

Análisis del trisacárido d

Para el compuesto d proponemos la estructura:



por los siguientes motivos:

Por filtración en columna de Bio-Gel P2 eluyó como un trisacárido (Fig. 26). Un primer indicio de que la glucosa ocupa el extremo reductor se obtuvo al lograr transferir (^{32}P) proveniente de beta(^{32}P)UDP-Glc al pico I aislado del "extracto 1203" por columna de DEAE-celulosa. Trabajos previos en nuestro laboratorio y también de otros grupos permitieron demostrar que en sistemas similares, el primer azúcar se transfiere como azúcar-1-P a un P-lípido aceptor endógeno (201,267). Este enfoque se confirmó de la siguiente manera: el trisacárido d(^{14}C)Glc se redujo con BH_4Na , luego el material reducido se hidrolizó, y finalmente el análisis de los productos permitió aislar (^{14}C)sorbitol como único compuesto radioactivo (Fig. 29, panel A).

Como era de esperar, el compuesto d(^{14}C)GlcA sometido a idéntico tratamiento, no produjo (^{14}C)glucuronitol, sino (^{14}C)GlcA (Fig. 29, panel B); este resultado fue una contraprueba del experimento anterior y confirmó además la presencia de GlcA en el trisacárido d.

Asimismo, estos estudios fueron concordantes con la imposibilidad de transferir (^{32}P) proveniente de β -(^{32}P)UDP-GlcA (Fig. 16, panel B y Tabla VIII, exp. 3 y 4) a los compuestos de nuestro interés.

El número de restos glucurónicos se confirmó mediante el análisis del trisacárido \underline{d} (^{14}C)GlcA con sus grupos carboxilos reducidos a alcoholes primarios por tratamiento con EDC/metanol/ BH_4Na . Mediante dicho procedimiento, se logró reducir los carboxilos del trisacárido \underline{d} total o parcialmente.

Cuando la reducción fue total, el trisacárido original produjo un compuesto neutro, de movilidad idéntica al (^{14}C)celotriitol ($\text{Glc} \xrightarrow{\beta} 4\text{Glc} \xrightarrow{\beta} 4\text{Glc}$) al analizarlo por TLC (Fig. 33, panel A). Este comportamiento también indicó que con gran probabilidad, el trisacárido tenía dos uniones $\beta, 1 \rightarrow 4$.

En cambio, la reducción parcial produjo un compuesto de movilidad electroforética intermedia entre la del celotriitol y la del trisacárido \underline{d} sin reducir (Fig. 34, panel A, compuesto \underline{B}). El compuesto \underline{B} degradado con glusulasa produjo dos únicos derivados radioactivos: (^{14}C)glucosa y (^{14}C)glucurónico, en relación 1:1 (Fig. 34, panel B). Estos resultados confirmaron la presencia de dos restos glucurónicos en el trisacárido \underline{d} , y significaron también la confirmación de la presencia de uniones glicosídicas de configuración "beta" (dado que la glusulasa de intestino de caracol incluye actividades de beta-glucuronidasa y de beta-glu-

cosidasa). Asimismo, el trisacárido \underline{d} (^{14}C)GlcA reducido en sus grupos carboxilos y posteriormente digerido con beta-glucosidasa produjo un único compuesto radioactivo: (^{14}C)glucosa (Fig. 33, paneles B y C), confirmando las configuraciones antedichas.

La posición de los enlaces glicosídicos se determinó además mediante estudios de permetilación. Para ello se utilizó el trisacárido \underline{d} obtenido con marca tanto en (^{14}C)Glc como en (^{14}C)GlcA. El material permetilado se hidrolizó y los productos se analizaron por TLC.

En el primer caso, se aisló un único producto radioactivo: 2,3,6-Tri-O-Me-Glc (Fig. 35), indicando una sustitución en el C4 de la glucosa. En el segundo caso, fue necesario reducir los ésteres metílicos de los restos glucurónicos a glucosa y volver a permetilar, pues habíamos preparado solamente los derivados metilados de glucosa para utilizar como estándares, los que además son más fáciles de separar mediante la técnica empleada. En este caso, se obtuvieron dos productos radioactivos 2,3,6-Tri-O-Me-Glc proveniente del resto glucurónico sustituido en posición C4, y 2,3,4,6-Tetra-O-Me-Glc, proveniente del resto glucurónico terminal (Fig. 36).

Estos resultados confirmaron que el compuesto \underline{d} es el trisacárido $\text{GlcA} \xrightarrow{\beta} \text{GlcA} \xrightarrow{\beta} \text{Glc}$. Se debe destacar que esta secuencia es parte de la unidad repetitiva propuesta por el grupo de Albersheim para el EPS de *Rhizobium trifolii* cepa NA-30 (Fig. 15, página 116).

Por otra parte, el análisis del compuesto d, mediante cromatografía en papel, permitió concluir que se trataba de una mezcla del trisacárido recién mencionado (d₁) y su homólogo acetilado (d₂) (Fig. 38). Es necesario puntualizar que solo mediante esta técnica de análisis fue posible separar los trisacáridos d₁ y d₂, cuya mezcla constituye el componente d. La filtración en columna de geles (Fig. 26), así como el análisis por HPLC (Fig. 37) mostraron que dicho componente se comportaba como un compuesto homogéneo. Asimismo, el análisis del componente d mediante columnas de borano tampoco permitió resolver con claridad la mezcla de ambos trisacáridos (resultados no mostrados). Debe destacarse también que la técnica de permetilación utilizada produce además desacetilación, por lo tanto para estos estudios resultó indiferente utilizar la mezcla d o el trisacárido d₁.

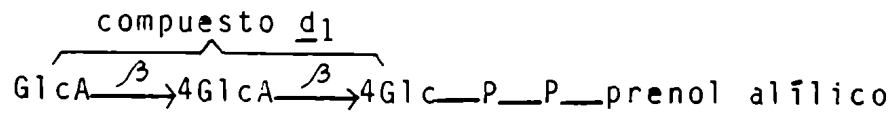
La identidad del resto acilo presente en el trisacárido d₂ se confirmó utilizando (¹⁴C)Acetil-CoA como precursor radioactivo (Tabla IX y Figs. 40, 41 y 42). En nuestro laboratorio, trabajos previos con *Xanthomonas campestris* permitieron lograr por primera vez acetilación in vitro en la síntesis de un EPS: el xantano (216). Asimismo, con el sistema de *Rhizobium meliloti*, M. Tolmasky y colaboradores habían comunicado evidencias indirectas, aunque no lograron transferir radioactividad proveniente de (¹⁴C)Acetil-CoA a material liposoluble (208).

Por otra parte, y dado que el trisacárido acetilado d₂ pudo obtenerse indistintamente con marca en (¹⁴C)GlcA, como con (¹⁴C)Glc o con (¹⁴C)Acetilo (Fig. 45), la confirmación de la identidad del grupo dador de acetilos (Acetil-CoA) también permitió concluir que dicho precursor constituye un dador endógeno presente en los preparados enzimáticos utilizados.

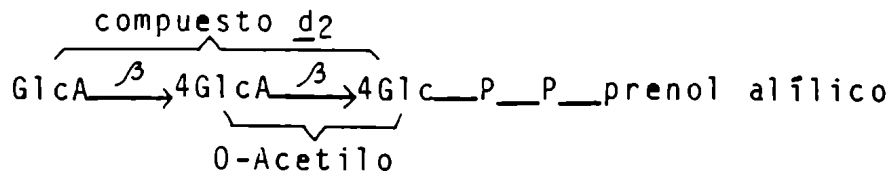
Los resultados de los estudios de acetilación presentados en esta tesis constituyen el primer caso descrito de acetilación in vitro en un sistema de síntesis de EPSs de rhizobios (véase también ref. 268).

Estudios comparativos mediante digestión con glusulasa de intestino de caracol de los trisacáridos d₁ (desacetilado) y d₂ (acetilado) permitieron concluir que la presencia del resto acetilo en este último constituye un bloqueo a dicha digestión enzimática, pues condujo al aislamiento y caracterización del disacárido acetilado denominado compuesto e. Este disacárido pudo obtenerse tanto con marca en (¹⁴C)GlcA como en (¹⁴C)Glc, o en (¹⁴C)-O-Acetilo. Estos resultados permitieron acotar la posición del resto O-Acetilo en el trisacárido d₂, al disacárido que ocupa el extremo reductor del mismo: el compuesto e (sección IV.B.4.5.3).

En resumen, de estos estudios podemos concluir que en el sistema enzimático utilizado se sintetizan in vitro los siguientes derivados:



y su derivado acetilado,



Análisis de los octasacáridos a, b y c

Por tratamiento ácido suave del "extracto 1203", además de los trisacáridos d₁ y d₂ recién discutidos, se aisló un grupo de oligosacáridos que por electroforesis en papel se fraccionó en los compuestos a, b y c: filtrados por columnas de geles, sus volúmenes de elución fueron mayores que un heptasacárido de *Acetobacter xylinum* utilizado como estándar. Los tamaños aparentes fueron los esperados para un octasacárido (a y b) o algo todavía más grande (Figs. 24, 25 y 26, respectivamente). La diferencia del volumen de elución del compuesto c respecto del b, y de éste respecto del a resultó semejante a la observada en el caso de un pentasacárido piruvilado de *Xanthomonas campestris* (X₅-Pir) respecto de su homólogo depiruvilado (X₅) utilizados como estándares (Fig. 52). El tratamiento del "extracto 1203" mediante H₂-Pt (que, como dijimos, es un procedimiento que cliva la unión entre el lípido y el fosfato sin afectar los enlaces glicosídicos ni los restos cetal-pirúvicos (sección IV.B.6.2)), liberó una mezcla de 3 componentes de gran movilidad electroforética (Fig. 54, panel A). Estos componentes tratados con fosfatasa alcalina produjeron los oligosacáridos b, c y d de menor movilidad (Fig. 54, paneles B, C y D, respectivamente). Mediante este análisis, que no eliminó los grupos cetal-pirúvicos, no se aisló el octasacárido a, lo que permitió presumir que los compuestos a, b y c obtenidos por hidrólisis ácida suave eran el mismo octasacárido con diferente grado de piruvilación: el a

depiruvilado, el b con un grupo cetal-piruvato y el c con dos de estos grupos.

Condiciones ácidas adecuadas para eliminar los grupos cetal-piruvato sin afectar las uniones glicosídicas (0,01 N/ClH/100°C, 90 min (265)), llevaron las movilidades electroforéticas de los compuestos b y c a la del a, y tratamientos intermedios permitieron, a partir del compuesto c, generar el b y el a (Fig. 53, panel B), apoyando totalmente la interpretación arriba mencionada. Estos resultados permitieron concluir que el compuesto a observado luego de liberar las porciones sacarídicas del lípido mediante hidrólisis ácida suave, y ausente en el caso de que la técnica de clivaje fuera H₂-Pt y posterior defosforilación, era un producto de depiruvilación parcial de la mezcla de octasacáridos mono y dipiruvilados realmente sintetizados in vitro.

El modo de confirmar categóricamente lo antedicho consistió en estudiar los productos de síntesis obtenidos con marca en (¹⁴C)Piruvato. Atendiendo a los antecedentes hallados en nuestro laboratorio con *Xanthomonas campestris*, se sabía que en dicho sistema la piruvilación del EPS ocurre a nivel de prenil-fosfoazúcares, y que el dador es el fosfo-enol-piruvato (PEP) (221). Con el sistema de *Rhizobium meliloti*, M. Tolmasky y colaboradores habían encontrado resultados similares, aunque en este caso solo pudieron analizar la piruvilación hasta el nivel de intermediarios lipídicos (208).

Con nuestro sistema también logramos transferir radioactividad proveniente de (^{14}C)PEP a "extracto 1203" (Tabla X), y mediante el análisis de los productos obtenidos con esta marcación por electroforesis en papel, solo se aislaron los octasacáridos b(^{14}C)Piruvato (monopiruvilado) y c(^{14}C)Piruvato (dipiruvilado) (Fig. 54). Estos resultados confirmaron la interrelación entre los octasacáridos a, b y c, y significaron además que también en el sistema de síntesis del EPS de *Rhizobium trifolii* NA-30, la piruvilación ocurre a nivel de lípido-intermediarios y que el dador es el PEP. El hecho de obtener derivados piruvilados en ausencia de PEP exógeno se justificó admitiendo la presencia de este dador en el preparado enzimático (véase también ref. 268). Confirmando estos hallazgos, Gardiol y Dazzo utilizaron nuestro ensayo para estudiar la síntesis del CPS en *Rhizobium trifolii* cepa 0403: en dicho sistema, la piruvilación también ocurre a nivel de intermediarios lipídicos y el dador es el PEP (271).

En cuanto a la composición de azúcares de estos oligosacáridos, el octasacárido a marcado con (^{14}C)Glc reducido con BH_4Na e hidrolizado en medio ácido, produjo una mezcla de compuestos radioactivos que, analizados por cromatografía en papel, se resolvió en (^{14}C)sorbitol, (^{14}C)glucosa y (^{14}C)galactosa en una relación 1:4:2 (Fig. 56). La presencia de galactosa se justificó aceptando que el preparado enzimático utilizado contenía UDP-Gal-4'-epimerasa, y constituyó una evidencia de que la unidad

repetitiva se hallaba completa, pues sorbitol y galactosa solo pueden provenir (respectivamente) de los extremos reductor y no reductor de la estructura propuesta por el grupo de Albersheim (Fig. 15, página 116). Atendiendo a esta estructura, la relación de marca observada en los monosacáridos obtenidos (1:4:2, sorbitol: glucosa: galactosa) fue diferente a la esperada (1:5:1). Este resultado se interpretó como una evidencia de la presencia de diferentes cantidades de aceptores endógenos en los preparados enzimáticos utilizados.

La posición de los distintos enlaces glicosídicos en el octasacárido a se analizó mediante estudios de permetilación del compuesto a(¹⁴C)Glc. El material permetilado se hidrolizó y los productos se analizaron por TLC.

Se aislaron cuatro productos mayoritarios: 2,3,4-Tri-O-Me-Glc, proveniente de glucosa sustituida en posición C₆; 2,4,6-Tri-O-Me-Glc, proveniente de glucosa sustituida en posición C₃; 2,3,6-Tri-O-Me-Glc, proveniente de glucosa sustituida en posición C₄, que resultó el compuesto mayoritario, y 2,3,4,6-Tetra-O-Me-Gal, proveniente de galactosa no sustituida, es decir, terminal (Fig. 58).

Considerando que el octasacárido a también contiene en su composición ácido glucurónico, estos resultados permitieron concluir que los productos de permetilación obtenidos eran los esperables del octasacárido que constituye la unidad repetitiva

(depiruvilada y desacetilada) del EPS de *Rhizobium trifolii* NA-30 (Fig. 58).

También se aisló un quinto producto, aunque minoritario, el cual fue caracterizado como 2,3,4,6-Tetra-O-Me-Glc (Fig. 58) proveniente de glucosa terminal, la cual podría deberse a la presencia de muy pequeñas proporciones de heptasacárido contaminante. Esta observación podría estar vinculada a los resultados obtenidos por el grupo de Rolfe (152).

Dichos autores aislaron varias cepas de *Rhizobium* sp. y analizaron la composición de las unidades repetitivas de los distintos EPSs. Sus resultados indican que en muchos casos y para una misma cepa, la galactosa estaba ausente en un 10% de las unidades repetitivas. No estudiaron *Rhizobium trifolii* NA-30.

Una posible implicancia de este hallazgo es que no fuera necesario que la totalidad de las unidades repetitivas estuvieran galactosiladas para que ocurriera su polimerización. Sería sumamente interesante establecer si la ausencia de la galactosa terminal está distribuida regularmente en el EPS. Si dicha distribución fuera regular, podría pensarse que la "unidad repetitiva real" sería mayor, y que comprendería bloques de carbohidratos que incluirían por lo menos una unidad repetitiva carente de galactosa terminal.

Con respecto a la presencia de acetilos en el EPS de *Rhizobium trifolii* NA-30, ya mencionamos que el grupo de

Albersheim describió la existencia de un resto acetilo por unidad repetitiva, aunque sin aclarar su posición (ref. 157 y Fig. 15). Por tal motivo, era dable considerar la posibilidad de obtener in vitro octasacáridos acetilados.

Como se mencionó (Tabla IX), fue posible incorporar radioactividad proveniente de (^{14}C)Acetil-CoA a material liposoluble presente en el "extracto 1203". El tratamiento ácido suave de dichos extractos liberó una mezcla de compuestos radioactivos que, separados por electroforesis en papel y por filtración en Bio-Gel P2 se comportaron como los compuestos a, b, c y d (Fig. 59, paneles A y B; y Fig. 41, respectivamente).

El octasacárido a marcado con (^{14}C)Acetilo tratado con glucosidasa (mezcla de enzimas cuya actividad, según demostramos, es bloqueada por la presencia de restos O-Acetilo, sección IV.B.4.5.3) originó un único producto radioactivo (Fig. 62), con propiedades idénticas a las del disacárido acetilado e, producido por degradación con glucosidasa del trisacárido acetilado d₂ (Fig. 47).

Como dijéramos, el disacárido acetilado e corresponde al extremo reductor del trisacárido d. Estos resultados indicaron que el octasacárido a posee por lo menos un resto acetilo sobre el disacárido que ocupa su extremo reductor, en forma análoga a lo observado con el trisacárido acetilado d₂ (sección IV.B.4.5.3).

El compuesto totalmente depiruvilado, resultó un producto de hidrólisis parcial, y aunque debe sintetizarse in vitro, no se aisló por biosíntesis. El resto O-Aceto puede no estar presente en todas estas especies. Esta indeterminación se debe a que no pudimos separar con las técnicas empleadas, octasacáridos acetilados de sus homólogos no acetilados.

Con el objeto de estudiar la síntesis secuencial de la unidad repetitiva, se realizaron incubaciones a distintos tiempos y temperaturas con la idea de aislar intermediarios de menor tamaño. Los resultados (Tabla XI) permitieron concluir que en las condiciones ensayadas, los únicos productos formados fueron, a baja temperatura (10° C), trisacárido y octasacáridos; y a una temperatura mayor (25° C) se formó además un compuesto parcialmente caracterizado como lípido-urónico (197).

Por otra parte, a 10° C, la proporción de trisacárido d se mantuvo constante hasta unos 120' de incubación, pero a 25° C, en los distintos tiempos de incubación, se observó que el incremento de radioactividad en octasacáridos (b y c) era igual a la disminución de radioactividad presente en trisacárido (d). Estos resultados, si bien no lo demuestran, inducen a pensar en una relación precursor-producto.

Los estudios de biosíntesis fueron extendidos a otras cepas de rhizobios que producen EPSs con la misma estructura de restos

glicosídicos, nodulan distintos huéspedes y poseen además, distinta calidad y proporción de restos no glicosídicos (266): *Rhizobium trifolii* ATCC 14479, *Rhizobium leguminosarum* 128-C-63 y *Rhizobium leguminosarum* 128-C-53.

Con cada una de estas cepas pudieron obtenerse preparados enzimáticos capaces de transferir radioactividad proveniente de UDP(¹⁴C)Glc o de UDP(¹⁴C)GlcA a material liposoluble presente en "extracto 1203" (Tabla XII).

Para cada caso, los extractos obtenidos fueron hidrolizados en ácido suave, y posteriormente tratados con fosfatasa alcalina con el objeto de liberar las porciones sacarídicas. Estas porciones se fraccionaron por electroforesis en papel, y en todos los casos se obtuvieron tres únicos productos con las movilidades de los ya conocidos oligosacáridos a, b y c (Fig. 66, paneles A y B). Cuando se utilizó UDP(¹⁴C)Glc como precursor radioactivo, se observó también una proporción variable de radioactividad asociada a un compuesto/s neutro/s (Fig. 66, panel A).

En todos los casos, los oligosacáridos a, b y c filtrados por columna de Bio-Gel P₂ eluyeron en las posiciones esperadas para los compuestos homónimos hallados con *Rhizobium trifolii* NA-30 (Fig. 67). En ningún caso se observó formación de trisacárido d.

Todos estos resultados (sección IV.3.10) permitieron concluir que distintas cepas de rhizobios que producen EPSs con

idéntica estructura de restos glicosídicos, pero que nodulan diferentes huéspedes (266,157), comparten los mismos mecanismos de síntesis de intermediarios lipídicos en la producción de sus respectivos EPSs o por lo menos en lo que respecta a la formación de la unidad repetitiva.

Recientemente, Kuo y Mort comunicaron que el EPS de *Rhizobium leguminosarum* (que nodula arveja, *Pisum sativum*) difiere del EPS de *Rhizobium trifolii* (que nodula trébol, *Trifolium repens* y *Trifolium pratensis*), en que el primero posee un resto 3-Hidroxibutirato sobre el C₃ de la galactosa terminal (aunque no en el 100% de los casos) y además dos restos O-Acetilo sobre los carbonos C₂ y C₃ de la glucosa sustituida en posición C₆ de la cadena principal (aunque tampoco en el 100% de los casos) (266). Sería interesante poder confirmar los hallazgos de Kuo y Mort por biosíntesis in vitro.

La importancia de la variación de los sustituyentes no glicosídicos se ve reforzada por hallazgos genéticos. Por ejemplo, se ha observado que mutaciones en los genes *nodF* y *nodE* permiten que *Rhizobium trifolii* nodule poroto, aunque pobremente (132). Debe destacarse que el producto del gen *nodF* presenta alta homología con la proteína transportadora de grupos acilo (ACP) de *E. coli* (Tabla I y ref. 127). Rolfe sugiere que una posible explicación para esta observación es que los productos de dichos genes modifiquen algún o algunos componentes de superficie que difieran

poco de una especie a otra (132). Resulta tentador especular con la idea de que dicha modificación fuera de hecho la acilación, la acetilación o el grado de acetilación de los distintos EPSs, todo lo cual formaría parte del complejo proceso de reconocimiento entre la bacteria y la planta.

Un caso interesante es el de *Rhizobium trifolii* cepa BART A que produce un EPS con idéntica estructura de restos glicosídicos que *Rhizobium trifolii* NA-30, a excepción de los restos O-Acetilos: posee tres grupos por unidad repetitiva (165), en vez de uno (157). Lo llamativo es que la cepa BART A es incapaz de nodular trébol. Esta inhabilidad podría estar vinculada a la diferencia en el grado de acetilación de los respectivos EPSs.

La presencia de restos no glicosídicos en los distintos EPSs parece contribuir a determinar algún aspecto de la especificidad durante el proceso de infección. El estudio comparado de la entrada de dichos restos y el de su regulación aparecen así cada vez más importantes.

M. A. H. T.

J. R. 2012

VI.0 BIBLIOGRAFIA

1. Brown y Williams (1985) Ann.Rev.Microbiol. 39: 527-556
2. Costerton J.W. et al: Bacterial biofilm in nature and disease. Am.Rev.Microbiol. Vol. 41: 435-464 (1987)
3. Sutherland I.W. (1982) Adv.Microbiol.Physiol. 23: 79-149
4. Sutherland I.W. (1985) Ann.Rev.Microbiol. 39: 243-270
5. Sanford, P.A. (1979) Adv.Carbohydr.Chem.Biochem. 36: 265-313
6. Misaki A., Srito H., Ito T. y Harada T. (1970) Biochem. 8: 4645-4650
7. Harada T., Misaki A. y Srito H. (1968) Arch.Biochem.Biophys. 124: 292-298
8. Ghai S.K., Hisamatsu M., Amemura A., Harada T. (1981) J.Gen. Microbiol. 122: 33-40
9. Hestrin S. (1962) en "The Bacteria" (Gunsalus I.C. & Steiner R.I., eds) Vol. III: 382-386
10. Sutherland I.W. (1977) en "Surface carbohydrates of the prokaryotic cell" (Sutherland I.W., ed.) 27-96, Academic Press, Londres, Nueva York, San Francisco
11. Geoghegan M.J. y Brian R.C. (1948) Biochem.J. 43: 5
12. Lyne R.R., Peat S. y Stacey M. (1940) J.Chem.Soc. 237
13. Dedonder R., Jozon E., Rapoport G., Loyeux Y. y Fritsch A. (1963) Bulletin de la Societé de Chimie Biologique 45: 477
14. Dedonder R., Lepasant J.A., Lepasant-Kejzlarova, J., Kunst F. y Pascal M. (1972) en "Biochemistry of the Glycosidic

- Linkage" (Piras R. y Pontis H.G., eds.), pp. 717-721, Academic Press, Nueva York and Londres
15. Hestrin S. y Schum M (1954) *Biochem J.* 54: 345-352
 16. Sutherland I.W., (1977) en "Surface carbohydrate of the prokaryotic cell" (Sutherland I.W., ed.), Academic Press, Londres, Nueva York, San Francisco, p. 32
 17. Barry G.T. y Goebel W.F. (1957) *Nature* 79: 206
 18. Bayer M.E. y Thurron H. (1977) *J.Bacteriol.* 130: 911-936
 19. Costerton J.W., Irigian J.M. y Cheng K.J. (1974) *Bacteriol. Rev.* 38: 87-110
 20. Cagel G.D. (1975) *Can.J.Microbiol.* 21: 395-408
 21. Guggenheim B., Regola , B. y Mühlemann H.R. (1972) *Caries Res.* 6: 289-297
 22. Long L.W. y Edwards, J.R. (1972) *Carbohydr.Res.* 24: (1972) 216-217
 23. Jeanes A.J. (1975) *Polym.Sci.Polym.Symp.* (1975) 45: 209
 24. Jeanes A. (1974) *Food Technology* 28: 34
 25. Jansson P.E., Kenne L. y Lindberg B. (1975) *Carbohydr.Res.* 45: 275-282
 26. Couso R.O., Ielpi L. y Dankert M.A. (1987) *J.Gen.Microbiol.* 133: 2123-2135
 27. Goebel Walther (1963) *Proc.Natl.Acad.Sci.* 49: 465-471
 28. Grant W.D., Sutherland I.W. y Wilkinson J.F. (1969) *J. Bacteriol.* 100: 1187-1193
 29. Gorin P.A. y Spencer J.F.T. (1966) *Can.J. of Chem.* 44:

993-998

30. Linker A. y Jones R. (1966) J.Biol.Chem. 241: 3845-3851
31. Larsen B. y Hang A. (1971) Carbohydr.Res. 287-296
32. Davidson I.N., Sutherland I.W. y Lawson C.J. (1977) J. of Gen.Microbiol. 98: 603-606
33. Pindar D.F. y Bucke, C. (1975) Biochem.J. 252: 617-622
34. Revista Biofutur, mayo 1986, pág. 30
35. McIntire F.C., Peterson H. y Riker A.J. (1942) J.Biol.Chem. 143: 491-496
36. Zevenhuizen L.D.T.M y Van Neervan A.R. (1983) Carbohydr.Res. 124: 166-171
37. Putman E.W., Potter A.L., Hodgson R. y Hassid W.Z. (1950) J.Amer.Chem.Soc. 72: 5024-5026
38. Dell A., York W.S., McNeil M., Darvill A.G. y Albersheim P. (1983) Carbohydr.Res. 117: 185-200
39. Hisamatsu M., Amemura A., Koizumi K., Utamura T. y Okada Y. (1983) Carbohydr.Res. 121: 31-40
40. Koizuma K., Okada Y., Horiyama S., Utamura T., Hisamatsu M. y Amemura A. (1983) J.Chromatogr. 265: 89-96
41. Dudman W.F. y Jones A.J. (1980) Carbohydr.Res. 84: 358-364
42. Amemura A., Hisamatsu M., Mitani H. y Harada T. (1983) Carbohydr.Res. 114: 277-285
43. Van Golde L.M., Schulman H. y Kennedy E.P. (1973) Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A. 70: 1368-1372
44. Jordan D.C. y Allen, O.N. Bergey's Manual of Determinative

- Bacteriology (1974) Baltimore Williams and Wilkins Co., pp. 261-267
45. Burkart A. en "Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas" (1952) (2da. Edición) Buenos Aires, Argentina, pág. 27
46. Hellriegel H. y Willfarth H. (1888) Beilage Z. vers. Rubenzuckerind, pp. 1-234
47. Burris R.H. (1980) en "The global nitrogen budget" (Newton W.E. y Johnson W.H., eds.) Vol. 1, pp. 7-16
48. Dart R.J. (1974) "Infection and development of leguminous nodules". En: Treatise on Dinitrogen Fixation, Section III: Biology (Hardy R.W.F. y Silver N.S., eds.), pp. 367-472, Nueva York, John Wiley
49. Dart P.J. (1975) "Legume root nodule initiation and development". En: "The Development and Function of Roots" (Torrey J.G. y Clarkson D.T., eds.), Londres, Academic Press, pp. 467-506
50. Dart P.J. (1977) "Infection and development of leguminous nodules". En: A Treatise of Dinitrogen Fixation (Hardy R.W.F. y Silver W.S., eds.) Nueva York, John Wiley, pp. 367-472
51. Allen O.N. y Allen E.K. (1981) The Leguminosae, Londres, McMillan
52. Newcomb W. (1980) Control of morphogenesis and differentiation of pea root nodules. En: Nitrogen Fixation, Vol. 2,

- (Newton W.E. y Orme-Johnson W.H., eds.) pp. 87-102,
Baltimore, University Park Press
53. Rolfe B.G. y Shine J. En: Genes Involved in Microbe-Plant Interactions, pág. 97, Verma, D.P.S. and Hohn T.H., Springer-Verlag, Nueva York
54. Legocki R.P. y Verma D.P. (1980) Cell 20: 153-163
55. Dilworth M.J. et al. (1979). En: A treatise of Dinitrogen Fixation (Hardy R., Bottomley F. y Burns R.C., eds.), Nueva York, John Wiley, pp. 691-764
56. Lang N., Unnasch N. y Ausubel F.M. (1985) Plant Physiol. 77: 833-839
57. Bisseling T., Breen C., Klugkist J., Van Kammen A. y Nadler K. (1983) EMBO J. 2: 961-966
58. Verma D.P.S. y Nadler K. (1984), en: Genes Involved in Microbe-Plant Interaction (Verma D.P.S. y Hohn T.H., eds.), Springer-Verlag, Nueva York, pp. 58-93
59. Appleby C.A. (1984) Ann.Rev.Plant Physiol. 35: 443-473
60. Ashwell G. y Morell A.G. (1974) Adv. in Enzymol. (Meister, ed.) 41: 99-127
61. Rogers J. y Kornfeld S. (1971) Biochem.Biophys.Res.Commun. 45 N°3, 622-629
62. Albersheim P., Darvill A., Davis K., Lau J., Mc Neil M., Sharp J. and York W. en: Why study the structures of biological molecules? (1983). En: "Structure and Biosynthesis of Plant Cell Walls (Duggan y Barnitcki-García, eds.) Academic

Press, pp. 21

63. Sandford P.A. (1979) Adv.Carbohydr.Chem.Biochem. 36: 265-313
64. Ielpi L. (1982) Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina
65. Abe M.A., Amemura A. e Higashi S. (1982) Studies on cyclic beta, 1→2 glucan obtained from periplasmic space of Rhizobium trifolii cells. Plant Soil 64: 315-324
66. Dazzo F.B., Truchet G.L. y Hrabak E.M. (1984) en: Advances in Nitrogen Fixation Research, (Verger C. y Newton W.E., eds.), Nijhoff/Junk Publishers, pág. 143
67. Bhagwat A. y Thomas J. (1984) Arch.Microbiol. 140: 260-264
68. Erwin S.E. y Hubbel D.H. (1985) Appl.Environ.Microbiol. 49: 61-68
69. Hubbel D.H. (1970) Bot.Gaz. 131: 337-342
70. Solheim B. y Raa J. (1973) J.Gen.Microbiol. 77: 241-247
71. Yao P. y Vincent J.M. (1969) Aust.J.Biol.Sci. 22: 413-423
72. Albersheim P. y Anderson-Prouty A.J. (1975) Ann.Rev.Plant Physiol. 26: 31-52
73. Abe M., Sherwood J.E., Hollingsworth R.I. y Dazzo F.B. (1984) J.Bacteriol. 160: 517-520
74. Index Merck, Ninth Edition, p. 7799
75. Bhagwat A.A. y Thomas J. (1984) Arch.Microbiol. 140: 260-264
76. Dazzo F.B., Truchet G.L. y Hrabak E.M. (1984) en: Advances in Nitrogen Fixation Research (Veeger C. y Newton W.E., eds.)
The Hague

77. Amemura A. y Cabrera-Crespo J. (1986) J.Gen.Microbiol. 132:
2443
78. Puvanesarajah V., Shell F.M., Stacey G., Douglas C.J. y
Nester E. (1985) J.Bacteriol. 164: 102-106
79. Zorreguieta A. y Ugalde R.A. (1986) J.Bacteriol. 167:
947-951
80. Hollingsworth R.I., Abe M., Sherwood J.E. y Dazzo F.B.
(1984) J.Bacteriol. 160: 510-516
81. Leigh J.A., Abe M., Sherwood J.E. y Dazzo F.B. (1985) Proc.
Natl.Acad.Sci. U.S.A. 82: 6231-6235
82. Dazzo F.B. y Truchet G.L. (1983) J.Mem.Biol. 73: 1-16
83. Ward H.M. (1887) Philos.Trans.R.Soc. London Ser B. 178:
537-562
84. Yao P. y Vincent J.M. (1976) Plant Soil 15: 1-16
85. Innes R.W., Kuempel P.L., Plazinski J., Canter-Cremers H,
Rolfe B.G., and Djordjevic M.A. (1985) Mol.Gen.Genet. 201:
426-432
86. Shuwaneswari T.V. y Solheim B. (1985) Physiol.Plant. 63:
25-34
87. Dazzo F.B., Truchet G.L., Sherwood E.Z., Hrabak J.E. y
Gardiol A. (1982) Appl.Environ.M.Microbiol. 44: 478-490
88. Solheim B. y Fzellheim L.E. (1984) Physiol.Plant. 62: 11-17
89. Carlson R.W., Hanley B., Rolfe B.G. y Dyorjevic M.A. (1986)
Plant Physiol. 80: 134-137
90. Larry J., Halverson and Stacey G. (1986) Microbiol.Rev. 50:

N°2, pág. 213

91. Caetano-Anollés G., Wall L.C., De Micheli A.T., Machi E., Bauer W., and Favelukes G. (1988) Plant Physiol. 86: 1228-1235
92. Calaham D.A. y Torrey (1981) Can.J.Bot. 59: 1647-1664
93. Ljunggren H. y Fahraeus G. (1959) Nature 184: 1578-1579
94. Ljunggren H. y Fahraeus G. (1961) J.Gen.Microbiol. 26: 521-528
95. Cita 90, pág. 215
96. Higashi S. y Abe M. (1980) Appl.Environ.Microbiol. 39: 297-301
97. Geremía R., comunicación personal, 1988
98. Bohlool B.B. y Schmidt E.L. (1974) Science. 185: 269-271
99. Bhuvanewari T.V. y Bauer W.D. (1976) Plant Physiol. 62: 71-74
100. Dazzo F.B. y Hubbell D.H. (1975) Appl.Microbiol. 30: 1017-1033
101. Dazzo F.B., Yanke W.E. y Brill W.J. (1978) Biochim.Biophys. Acta 529: 276-286
102. Dazzo F.B., Truchet G.L., Sherwood J.E., Hrabak E.M. y Abe M. (1984) Appl.Environ.Microbiol. 48: 1140-1150
103. Bhuvanewari T.V., Mills K.K., Crist D.K., Evans W.R. and Bauer W.D. (1983) J.Bacteriol. 153 (N° 1): 443-451
104. Mort A.J. y Bauer W.D. (1980) Plant Physiol. 66: 158-163
105. Urbano M.R. y Dazzo F.B. (1980) Abs.Annu.Meet.Am.Soc.

Microbiol., pág. 163

106. Dazzo F.B., Yanke W.E. y Brill W.J. (1978) Biochim.Biophys. Acta 536: 276-286
107. Dazzo F.B. y Hubbel D.H. (1976) Plant Soil 43: 713-717
108. Law I.J. y Strijolom B.W. (1977) Soil Biol.Biochem. 9: 79-84
109. Seegers R. y La Rue T.A. (1985) J.Bacteriol. 162: 784-789
110. Wong P.P. (1980) Plant Physiol. 65: 1049-1052
111. Lepek V. y Maréchal L.R. (1989) An.Asoc.Quím.Arg. 77 (2): 159-167
112. Szeto W.W., Zimmerman J.L., Sundaresan U. y Ausubel F.M. (1984) Cell 36: 535-543
113. Banfalvi Z., Sakanyan V., Koucz C., Kiss A., Dusha I. y Kondorosi A. (1981) Mol.Gen.Genet. 184: 318-325
114. Rosemberg C., Boistard D., Denarie J. y Casse-Delbart F. (1981) Mol.Gen.Genet. 184: 326-333
115. Kondorosi A., Kondorosi E., Pankhurst C.E., Broughton W.J. y Banfalvi Z. (1982) Mol.Gen.Genet. 188: 433-439
116. Finnan T.M., Hirsh A.M., Leigh J.A., Johansen E., Kuldan G.A., Duggan S., Walker G.C. y Signer E.R. (1985) Cell 40: 869-877
117. Downie J.A., Hombrecker G., Knight C.D., Wells B. y Johnston A.N. (1983) Mol.Gen.Genet. 190: 359-365
118. Truchet G., Rosemberg C., Vasse J., Julliot J.S., Camut S. y Denarie J. (1981) J.Bacteriol. 157: 134-142
119. Davis, Elaine O., Evans, Ian J. y Johnston, Andrew W. (1988)

- Mol.Gen.Genet. 212: 531-535
120. Kondorosi E. y Kondorosi A. (1986) Trends Biochem.Sci. 11:
296-299
121. Rossen L., Johnston A.W. y Downie J.A. (1984) Nucleic Acids
Research 12: 9497-9508
122. Schmidt J., John M., Wiemeke U., Krussman D. y Schell J.
(1986) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 83: 9581-9585
123. Schofield P.R. y Watson J.M. (1985) Nucleic Acids Res. 14:
2891-2903
124. John M., Schmidt J., Weineke U., Kondorosi E., Kondorosi A.
y Schell J. (1985) EMBO J. 4: 2425-2430
125. Downie J.A., Knight C.D., Johnston A.W.B. y Rossen L. (1985)
Mol.Gen.Genet. 198: 255-262
126. Horvath B., Kondorosi E., John M., Schmidt J., Torok I.,
Gyorgypal Z., Barabas I., Weineke U., Schell J. y Kondorosi
A. (1986) Cell 46: 335-343
127. Shearman C.A., Rossen L., Johnston A.W.B. y Downie J.A.
(1986) EMBO J. 5: 647-652
128. Debelle F. y Sharma S.B. (1986) Nucleic Acids Res. 14:
7453-7472
129. Evans I.J. y Downie J.A. (1986) Gene 43: 95-101
130. Downie J.A., Surin B.P., Evans I.J., Rossen L., Shearman
C.A. Y Johnston A.W.B. (1987), en: Molecular Genetics of
Plant-Microbe Interaction (Verma D.P.S. y Britton N., eds.)
pp. 225-228, Martinus Nijhoff Publishers

131. Gotz R., Evans I.J., Downie J.A. y Johnston A.W.B. (1985)
Mol.Gen.Genet. 201: 296-300
132. Djordjevic M.A., Schofield P.R. y Rolfe B.G. (1985) Mol.Gen.
Genet. 200: 463-471
133. Couso R.O (1980) Tesis doctoral, Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales, Buenos Aires, Argentina.
134. Rossen L., Shearman C., Johnston A.W. y Downie J.A. (1985)
EMBO J. 4: 3369-3373
135. Jacobs T.W., Egelhoff T.T. y Long S.R. (1985) J.Bacteriol.
162: 469-476
136. Roitas K., Kondorosi E., Horvarth B., Simoncsits A. y
Kondorosi A. (1986) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 83: 1757-1761
137. Firmin J.L., Wilson K.E., Rossen L. y Johnston A.W.B. (1986)
Nature 324: 90-92
138. Redmond J.N., Batley M., Djordjevic M.A., Innes R.W.,
Kuempel P.L. y Rolfe B.G. (1986) Nature 323: 632-635
139. Peters N.K., Frost J.W. y Long S.R. (1986) Science 233:
977-980
140. Djordjevic M.A., Redmond J.W., Batley M. y Rolfe B.G. (1987)
EMBO J. 6: 1173-1179
141. Dylan T., Ielpi L., Stanfield S., Kashyp L., Douglas C.,
Yanofsky M., Nester E., Helinski D. y Ditta G. (1986) Proc.
Natl.Acad.Sci. U.S.A. 83: 4403-4407
142. Finan T.M., Kubel B., De Vos G.I., Signer E.R. (1986) J.
Bacteriol. 167: 66-72

143. Borthakur D., Downie J.A., Johnston A.W. y Lamb J.W. (1985) Mol.Gen.Genet. 200: 278-282
144. Hancai Chen, Gray J., Nayudu M., Djordjevic M., Batley M., Redmond J. y Rolfe B.G. (1988) Mol.Gen.Genet. 212: 310-316
145. Bauer W.D. (1981) Infection of legumes by Rhizobia. Ann. Rev.Plant Physiol. 32: 407-409
146. Carlson R.W. (1980) Surface Chemistry of Rhizobium, en: Ecology of Nitrogen Fixation (Broughton, ed.) 2: 201-202, Oxford University Press
147. Carlson R.W. y Lee R.P. (1983) Plant Physiol. 71: 223-228
148. Chakravorty A.K., Zurkowski W., Shine J. y Rolfe B.G. (1982) J.Mol.Appl.Genet. 1: 585-596
149. Law I.J., Yamamoto Y., Mort A.J. y Bauer W.D. (1982) Plant Physiol. 154: 100-109
150. Sanders R.E., Carlson R.W. y Albersheim P. (1978) Nature 271: 240-242
151. Sanders R.E., Raleigh E. y Signer E. (1981) Nature 292: 148-149
152. Djordjevic S., Hancai Chen, Batley M., Redmond J. y Rolfe B. (1987) J.Bacteriol. 169 N°1: 53-60
153. Bhagwat A. y Thomas J. (1984) Arch.Microbiol. 140: 260-264
154. Dazzo F., Truchet G.L., Sherwood J.E., Hrabak E.M. and Gardiol A.E. (1982) Appl.Environ.Microbiol. 44: 478-490
155. Solheim B. y Fjellheim E. (1984) Physiol.Plant. 62: 11-17
156. Kiem T.T.V., Toubart P., Cousson A., Gollin D., Chelf P. and

- Albersheim P. (1985) Nature (Londres) 314: 615-617
157. Robertsen B.K., Aman P., Darvill A.G., McNeil M. y Albersheim P. (1981) Plant Physiol. 67: 389-400
158. Amemura A., Harada T., Abe M. e Higashi S. (1983) Carbohydr. Res. 115: 165-174
159. Dudman W.F., Franzen L.E., Darvill J.E., McNeil M., Darvill A.G. y Albersheim P. (1983) Carbohydr.Res. 117: 141-156
160. Franzen L.E., Dudman W.F., McNeil M., Darvil A.G. y Albersheim P. (1983) Carbohydr.Res. 117: 157-167
161. Aman P., Franzen L.E., Darvill J.E., McNeil M., Darvill A.G. y Albersheim P. (1982) Carbohydr.Res. 103: 77-100
162. Dudman W.F., Franzen L.E., McNeil M., Darvill A.G. y Albersheim P. (1983) Carbohydr.Res. 117: 169-183
163. Jann K. y Jann B. (1977) Bacterial polysaccharide antigens, en: Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cells (Sutherland, ed.), Academic Press, Londres, pp. 247-287
164. Leigh J.A., Reed J.W., Hanks J.F., Hirsch A.M., and Walker G.C. (1987) Cell 51: 579-587
165. Somme R. (1985) Carbohydr.Res. 137: 167-171
166. Robbins P.W. y Uchida T. (1962) Biochem. 1: 323
167. Robbins P.W., Wright A. y Bellows J. (1964) Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A. 52: 1302
168. Zeleznick L.D., Rosen S.M., Saltmarsh-Andrew M., Osborn M.J. y Horecker L. (1965) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 53: 207
169. Nikaido H. y Nikaido K. (1965) Biochem.Biophys.Res.Commun.

- 19: 322
170. Wright A., Dankert M. y Robbins P.W. (1965) Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A. 54: 235-241
171. Weiner T., Higuchi T., Rothfield L., Saltmarsh-Andrew M., Osborn M.J. y Horecker B.L. (1965) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 54: 228-234
172. Bray D. y Robbins P.W. (1967) Biochem.Biophys.Res.Comm. 28: 334-339
173. Tipper D.J. y Wright A., en: The Structure and Biosynthesis of the Bacterial Cell Walls - The Bacteria, Vol. VII (Gunsalus, ed.) (1979) pp. 443
174. Scher M., Lennarz W.J. and Sweeley C.C. (1968) Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A. 39: 1313-1320
175. Takayama K. and Goldman B.S. (1970) J.Biol.Chem. 245: 6251-6257
176. Wright A. (1971) J.Bacteriol. 105: 927-936
177. Jankowski W., Mankowski T. and Chojnacki T. (1974) Biochem. Biophys.Acta 337: 153-162
178. Mescher F.M., Hansen U. and Strominger J.L. (1976) J.Biol. Chem. 251: 7289-7294
179. Chiu T.H. and Saralkar C. (1978) J.Bacteriol. 113: 185-195
180. Troy F.A., Vijay I.K. and Tesche N. (1975) J.Biol.Chem. 250: 156-163
181. Sanderman Jr. H. (1977) FEBS Lett. 81: 294-298
182. Schultz J. and Elbein A.D. (1974) Arch.Biochem.Biophys. 160:

311-322

183. Rohr T.E., Levy G.N., Stark N.J. and Anderson J.S. (1977)
J.Biol.Chem. 252: 3460-3465
184. Osborn M.J. and Weiner I.M. (1968) J.Biol.Chem. 243:
2631-2639
185. Anderson J.S., Matsubashi M., Haskin M.A. and Strominger
J.L. (1967) J.Biol.Chem. 242: 3207-3217
186. Couso R.O., Ielpi L., García R.C. y Dankert M.A. (1982)
Eur.J.Biochem. 123: 617-627
187. Masson L. and Holbein B.E. (1985) J.Bacteriol. 161: 861-867
188. Troy F.A., Vijay I.K. and Tesche N. (1975) J.Biol.Chem. 250:
156-163
189. Yurewicz E., Ghalambor M.A., Heath E. (1971) J.Biol.Chem.
246: 5596-5606
190. Troy F.A. Frerman F.E., Heath E. (1971) J.Biol.Chem. 246:
118-133
191. García R.C., Recondo E. y Dankert M.A. (1974) Eur.J.Biochem.
43: 93-105
192. Repaske R. (1958) Biochim.Biophys. Acta 30: 225-232
193. Leive L. (1965) Biochem.Biophys.Res.Commun. 21: 290-296
194. Bayer M.H. y Leive L. (1977) J.Bacteriol. 130: 1364-1381
195. Nikaido H. y Vaara M. Microbiol.Reviews (Mar. 1985), Vol. 49
N°1, pág. 141
196. Ielpi L., Couso R. y Dankert M.A. (1981) FEBS Letters 130
N°2: 253-256

197. Russomando G., Bossio J.C. y Dankert M.A., resultados no publicados
198. Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (1986) pág. 168
199. Romero Martínez P. (1977) Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires
200. Couso R., Ielpi L. y Dankert M.A. (1987) J.Gen.Microbiol. 133: 2123-2135
201. García R., Recondo E. y Dankert M.A. (1974) Eur.J.Biochem. 43: 93-105
202. Couso R., Ielpi L., García R., Dankert M.A. (1980) Arch. Biochem.Biophys. 204: 434-443
203. Couso R. (1980) Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires
204. Couso R., Ielpi L., García R. y Dankert M.A. (1982) Eur.J. Biochem. 123: 617-627
205. Iñón de Iannino N., Couso R. y Dankert M.A. (1988) J.Gen. Microbiol. 134: 1731-1736
206. Hisamatsu M., Abe J., Amemura A. y Harada T. (1980) Agr. Biol.Chem. 44 (N°5): 1049-1055
207. Harada T., Amemura A., Jansson P.E. y Lindberg B. (1979) Carbohydr.Res. 77: 285-288
208. Tolmasky M. (1982) Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires
209. Tolmasky M., Staneloni R.J., Ugalde R. y Leloir L.F. (1980) Arch.Biochem.Biophys. 203 (N°1): 358-364

210. Tolmasky M., Staneloni R.J. y Leloir L.F. (1982) J.Biol. Chem. 257: 6751-6757
211. Jansson P.E., Kenne L., Lindberg B., Ljunggren H., Lönngren J., Rudén V. y Svensson S. (1977) J.Am.Chem.Soc. 99: 3812-3815
212. Sandford P.A., Pittsley J.E., Knutson C.A., Watson P.R., Cadmus M.C. y Jeanes A. (1977) en: Extracellular Microbial Polysaccharides (Sandford P.A. y Laskin A., eds.) 192-210, Symp.Ser. N°45 Am.Chem.Soc., Washington D.C.
213. Sutherland I.W. (1977) en: Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell (Sutherland I.W., ed.), 27-96, Academic Press, Londres, Nueva York, San Francisco.
214. Wright A. (1971) J.Bacteriol. 105: 927-936
215. Robbins P., Keller J.M., Wright A. y Bernstein R.I. (1964) J.Biol.Chem. 240: 384-390
216. Ielpi L., Couso R. y Dankert M.A. (1983) Biochem.Intl. Vol. 6 (N°3): 323-333
217. Staneloni R.J., Tolmasky M. y Leloir L.F. (1984) J.Gen. Microbiol. 130: 869-879
218. Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, 1986, pág. 463
219. Robbins P., Wright A. y Bellows J. (1964) Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A. 52: 1302-1309
220. Suárez C., Couso R. y Dankert M.A., resultados no publicados
221. Ielpi L., Couso R. y Dankert M.A. (1981) Biochem.Biophys. Res.Commun. 102 N°4: 1400-1408

222. Hestrin S., Aschner M. y Mager J. (1947) Nature (Londres) 159: 64-65
223. Couso K., Iñón de Iannino N., García R., y Dankert M.A. (1986) An.Asoc.Quím.Arg. 74 (6): 783-793
224. Manual of Microbiological Methods by the Society of American Bacteriologists (1957) McGraw-Hill, Nueva York-Londres
225. Revista de Investigaciones Agrícolas XVII (1) (1963), pág. 17
226. Handelsman J., Ugalde R. y Brill W. (1984) J.Bacteriol. 157 N°3: 703-707
227. Sloneker J.H. y Jeanes A. (1962) Can.J.Chem. 40: 2066-2071
228. Amemura A. y col. (1985) J.Gen.Microbiol. 131: 301-307
229. Zevenhuizen L. y col. (1981) Antoine Van Leewenhook 47: 481-497
230. Iñón de Iannino N., Staneloni R.J., Behrens N.H. y Dankert M.A. (1979) FEBS Lett. 99: 73-76
231. Pont Lezica R., Brett C.T., Romero P. y Dankert M.A. (1975) Biochem.Biophys.Res.Commun. 66: 980-987
232. Taylor L.R. y Conrad H.E. (1972) Biochemistry 11: 1383-1388
233. Hakomori S. (1964) J.Biochem. 55: 205-208
234. Sandford P.A. y Conrad H.E. (1966) Biochemistry 5: 1508-1516
235. Smith F. y Montgomery R. (1956) en: Methods of Biochemical Analysis (Glick D., ed.) Vol. III, Interscience, Nueva York, Londres, pp: 154-157
236. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951)

- J.Biol.Chem. 193: 265-275
237. De Stevens G. (1955) Meth.in Enzymol. Vol I: 173-177
238. Kunitz M. (1961) Arch.Biochim.Biophys. 92: 270-272
239. Dankert M.A., Wright A., Kelley W.S. y Robbins P.W. (1966)
Arch.Biochem.Biophys. 116: 425
240. Paladini A.C. y Leloir L.F. (1952) Biochem.J. 51: 426-430
241. Jeanes A., Wise C.S. y Dimler R.J. (1951) Anal.Chem. 23:
415-420
242. Tung K.K. y Nordin J.H. (1968) Biochim.Biophys.Acta 158:
154-156
243. Bourne E.J., Hutson D.H. y Weigel H. (1961) J.Chem.Soc. Part
1: 35-38
244. Robyt J.F. (1975) Carbohydr.Res. 40: 373-374
245. Trevelyan W.E., Procter D.P. y Harrison J.S. (1950) Nature
(Londres) 166: 444-445
246. Burrows S., Grylls F.S.M. y Harrison J.S. (1952) Nature
(Londres) 170: 800-801
247. Behrens N. y Táborá E. (1978) Meth. in Enzymol. 50: 402
248. Chapman A., Li E. y Kornfeld S. (1979) J.Biol.Chem. 254:
10243-10249
249. Bray G.A. (1960) Anal.Biochem. 1: 279-285
250. Thomas J.A., Schlender K.K. y Larner J. (1968) Anal.Biochem.
25: 486-499
251. Mellor's Modern Inorganic Chemistry (Parkes G.D. y Mellor
J.W., eds.), Longmans, Green and Co., Londres, Nueva York,

Toronto (1939) pp. 254-255

252. Kornfeld S., Gregory W. y Chapman A. (1979) J.Biol.Chem. 254: 11649-11654
253. Borthakur D., Barker R.F., Latchford J.W., Rossen L. y Johnston A.W.B (1988) Mol.Gen.Genet. 213: 155-162
254. Borthakur D. y Johnston A.W.B. (1987) Mol.Gen.Genet. 207: 149-154
255. Nikaido H. (1962) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 48: 1337-1341
256. Rossen L., Davies O.E., Johnston A.W.B. (Nov. 1987) Trends in Biochemical Sciences 12: 432
257. Kondorosi E. y Kondorosi A. (Julio 1986) Trends in Biochemical Sciences 11: 298
258. Rolfe B. (1988) Biofactors Vol. 1, N°1, pp. 1-3
259. McNeil M., Darvill J., Darvill A., Albersheim P., Van Veen R., Hooykaas P., Schilperoot R. y Dell A. (1986) Carbohydr. Res. 146: 307-326
260. Amemura A., Hashimoto T., Koizumi K. y Utamura T. (1985) J.Gen.Microbiol. 131: 301-307
261. Ross P., Aloni Y., Weinhouse Ch., Michaeli D., Weinberger-Ohana P., Meyer R. and Benziman M. (1985) FEBS Lett. 186, N°2: 191-196
262. Sutherland I.W. (Marzo 1979) Trends in Biochemical Sciences, pág. 57
263. Zorreguieta A., Tolmasky M.E. and Staneloni R.J. (1985) Arch.Biochem.Biophys. 238: 368-372

264. Marcelo A. Dankert y Nicolás H. Behrens. Anales de la Sociedad Científica Argentina, N° Especial (1971) pp. 145-164
265. Amemura A. and Harada T. (1983) Carbohydr.Res. 112: 85-93
266. Mao-Sung Kuo and Andrew J. Mort (1986) Carbohydr.Res. 145: 247-265
267. Robbins P.W., Bray D., Dankert M. and Wright A. (1967) Science 158: 1536-1542
268. Bossio J.C., Iñón de Iannino N. y Dankert M.A. (1986) Biochem. Biophys.Res.Comm. 134: 205-211
269. Prehm P. (1980) Carbohydr.Res. 78: 372-374
270. Jansson P.E., Kenne L., Lindberg B., Ljunggren H., Lonngren J., Ruden U. and Svensson S. (1977) J.Amer.Chem.Soc. 99: 3812
271. Gardiol A. y Dazzo F. (1986) J.Bacteriol. 168 (3): 1459-1462