

Tesis de Posgrado

Bioquímica y biología molecular del metabolismo de hidratos de carbono y de la síntesis de exopolisacáridos en Rhizobiaceae

Uttaro, Antonio Domingo

1994

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:

Uttaro, Antonio Domingo. (1994). Bioquímica y biología molecular del metabolismo de hidratos de carbono y de la síntesis de exopolisacáridos en Rhizobiaceae. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2623_Uttaro.pdf

Cita tipo Chicago:

Uttaro, Antonio Domingo. "Bioquímica y biología molecular del metabolismo de hidratos de carbono y de la síntesis de exopolisacáridos en Rhizobiaceae". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2623_Uttaro.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL
METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO Y DE LA
SINTESIS DE EXOPOLISACARIDOS EN RHIZOBIACEAE.

ANTONIO DOMINGO UTTARO

DIRECTOR: RODOLFO A. UGALDE

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS, FUNDACION CAMPOMAR

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

(ORIENTACION EN CIENCIAS QUIMICAS)

1994

BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL
METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO Y DE LA
SINTESIS DE EXOPOLISACARIDOS EN RHIZOBIACEAE.

ANTONIO DOMINGO UTTARO

AGRADECIMIENTOS

A Rodolfo, por su confianza y entusiasmo en la dirección de mi trabajo de tesis y por escuchar atentamente mis propuestas.

Al Consejo Directivo de la Fundación Campomar por haber permitido realizar mi trabajo de tesis en el Instituto.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por sustentar mi trabajo mediante la beca Doctoral.

Al personal de apoyo de la Fundación Campomar.

A todos los ex y actuales miembros del Instituto con quienes he compartido gratos momentos, y a aquellos de quienes aprendí. A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en mi trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, presentes y pasados.

A mis amigos, el mejor resultado en estos años de investigación.

A mi profesor de química de 3° año de la escuela secundaria.

A mis padres y hermana.

A Silvia.

ABREVIATURAS, ANGLICISMOS Y ACLARACIONES

ADP: 5' adenosina difosfato

ATP: 5' adenosina trifosfato

DTT: ditioneitol

EDTA: etilen diamino tetraacetato

Fru: fructosa

Gal: galactosa

Glc: glucosa

GDP: 5' guanosina difosfato

GTP: 5' guanosina trifosfato

NAD⁺/NADH: formas oxidada y reducida de la nicotinamida dinucleótido

NADP⁺: forma oxidada de la nicotinamida dinucleótido 2-fosfato

P o Pi: fosfato

PPi: pirofosfato

SDS: sodio dodecil sulfato

Tris: 2-amino 2-hidroximetil 1,3-propanodiol

UDP: 5' uridina difosfato

UTP: 5' uridina trifosfato

UV: ultravioleta

PCR: Polimerase Chain Reaction: reacción en cadena de la polimerasa.

Buffer: solución tampón, amortiguadora o reguladora.

Chase: Traducido del inglés como "caza" o "persecución", indica el agregado de gran cantidad de sustrato no radioactivo a una reacción que se lleva a cabo en presencia de sustrato radioactivo (pulso), con el fin de interrumpir la incorporación de la marca y seguir la misma en el (los) producto (s). También empleado como "enfriamiento" o "dilución" de la marca.

El símbolo δ fue utilizado como γ , letra griega gamma.

Parte de los resultados expuestos en esta tesis fueron publicados en los siguientes artículos:

"Biochemical characterization of avirulent *exoC* mutants of *Agrobacterium tumefaciens*". 1990. Journal of Bacteriology **172**: 1640-1646.

"Galactose metabolism in *Rhizobiaceae*; characterization of *Agrobacterium tumefaciens exoB* mutants". 1993. Journal of General Microbiology **139**: 1055-1062.

INDICE

CAPITULO 1: INTRODUCCION GENERAL	1
Familia Rhizobiaceae	2
Interacción rizobio-leguminosa	
-Señales difusibles de la planta	4
-Señales difusibles de la bacteria	4
-Invasión del nódulo	6
Interacción Agrobacterium-planta	8
-Moléculas señales de la planta	9
-Colonización y unión bacteria-célula vegetal	9
-Transformación de las células vegetales	10
Polisacáridos sintetizados por <i>R.meliloti</i> y <i>A.tumefaciens</i>	11
-Exopolisacáridos:	
Succinoglicano o EPS I	12
Exopolisacárido II o EPS II	15
Otros exopolisacáridos	16
-Lipopolisacáridos (LPS)	16
-Curdulano	17
-Celulosa	17
-Glucano β (1-2) cíclico	17
-Glucógeno	18
Metabolismo de la galactosa y nucleótido-azúcares	19
Objetivos de la presente tesis	21
CAPITULO 2: CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS MUTACIONES <i>exoC</i>	22
Resumen	23
Introducción	23
Resultados	
-Síntesis in vivo de glucano β (1-2) cíclico y succinoglicano:	24
-Síntesis in vitro de glucano β (1-2) cíclico:	25
-Presencia y actividad de la proteína de membrana interna de 235 kDa:	26
-Síntesis in vitro de UDP-glucosa	28
Discusión	30
CAPITULO 3: CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS MUTACIONES <i>exoB</i>	33
Resumen	34

INDICE

Introducción	34
Resultados	
-Síntesis in vitro de lípido-azúcares intermediarios	35
-Contenido in vivo de nucleótido-azúcares	37
-Síntesis in vitro de UDP-galactosa	38
Discusión	39
CAPITULO 4: METABOLISMO DE LA GALACTOSA EN <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
Resumen	42
Introducción	42
Resultados	
-Crecimiento de las mutantes <i>exoC</i> y <i>exoB</i> con galactosa como única fuente de carbono	43
-Ensayo de las actividades galactokinasa y galactosa 1-fosfato uridililtransferasa	43
-Metabolismo oxidativo de la galactosa	44
Discusión	48
CAPITULO 5: CARACTERIZACION GENETICA DE LAS MUTACIONES <i>exoC</i>	50
Resumen	51
Introducción	51
Resultados	
-Análisis por subclonado del plásmido pFC6251 y complementación de mutantes <i>exoC</i> de <i>A. tumefaciens</i>	52
-Análisis de la secuencia de DNA	53
-Actividad fosfomanomutasa	60
-Mapeo de la inserción <i>exoC::Tn5</i>	60
Discusión	62
CONCLUSIONES	64
MATERIALES Y METODOS	
Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo	67
Determinación del contenido de exopolisacáridos en el medio de cultivo	68
Obtención de glucano $\beta(1-2)$ cíclico	68
Preparación de citosoles y membranas internas	68
Preparación de células permeabilizadas	68
Ensayo in vitro para la síntesis de glucano $\beta(1-2)$ y marcación de la proteína intermediaria	68
Ensayos in vitro para la síntesis de UDP-glucosa (actividad fosfoglucomutasa)	69
Determinación de la actividad fosfomanomutasa	69
Determinación de la actividad UDP-Glucosa 4-epimerasa	69

INDICE

Determinación de las actividades galactoquinasa y galactosa 1-fosfato uridililtransferasa	69
Ensayos in vitro para la identificación del metabolismo de la galactosa	70
Determinación de la actividad galactosa dehidrogenasa	70
Determinación de la actividad galactonato dehidratasa	70
Determinación de la actividad 6-fosfo 2-ceto 3-deoxigalactonato aldolasa	70
Determinación de la actividad ADP-glucosa sintetasa	70
Ensayos in vitro para la síntesis de lípido-azúcares intermediarios	70
Cromatografías y electroforesis	71
Determinación del contenido endógeno de nucleótido-azúcares	71
Transformación de bacterias	71
Métodos de recombinación de DNA	71
Secuenciación de DNA	72
Mapeo de la inserción Tn5	72
Número de acceso de la secuencia de nucleótidos	72
BIBLIOGRAFIA	73

CAPITULO 1

INTRODUCCION GENERAL

La interacción entre microorganismos y tejidos de animales y plantas ha sido un tema extensamente estudiado durante muchos años. Esta interacción es de gran importancia en los aspectos del control de la salud humana, animal y vegetal. Pueden producirse asociaciones benéficas (simbiosis) o perjudiciales (patogénesis).

En el caso específico de la relación entre plantas y bacterias, ambos tipos de interacción están bien representadas por microorganismos pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*.

FAMILIA RHIZOBLACEAE:

Las bacterias agrupadas en esta familia se caracterizan por tener forma de bastón, no contener endosporas y ser habitantes del suelo. Son aeróbicas, móviles y con capacidad de utilizar una gran variedad de hidratos de carbono. Acumulan gran cantidad de material mucoso extracelular cuando crecen sobre medios ricos en hidratos de carbono (Jordan, 1984).

Se dividen en cinco géneros, tres de los cuales, llamados genéricamente rizobios, producen asociaciones simbióticas con plantas leguminosas (salvo una excepción: *Parasponia*).

En términos generales esta simbiosis consiste en la inducción de la formación de nódulos en las raíces de las plantas que son posteriormente invadidos por los rizobios, los que se diferencian en "bacteroides" adquiriendo la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N_2) en forma de amoníaco y otros compuestos asimilables por la planta (ureidos). Esta simbiosis es altamente específica, teniendo cada rizobio un número muy reducido de especies de leguminosas en las que forman nódulos fijadores de N_2 . En la Tabla 1 (tomada de: Brewin, 1991 y Dénarié et al., 1992) se enumeran las especies de rizobios y sus respectivos hospedadores.

TABLA 1:

Género	Especie	Algunos de sus hospedadores
<i>Rhizobium</i>	<i>R.leguminosarum</i>	
	bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum</i> (guisante), <i>Vicia</i> (arveja)
	bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i> (poroto)
	bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> (trebol)
	<i>R.meliloti</i>	<i>Medicago</i> (alfalfa)
	<i>R.loti</i>	<i>Lotus</i>
	<i>R.fredii</i>	<i>Glycine</i> (soja)
	<i>R. sp.</i> NGR234	<i>Parasponia</i> y legumbres tropicales
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B.japonicum</i>	<i>Glycine</i> (soja)
	<i>B. spp</i>	<i>Arachis</i> (maní)
		<i>Parasponia</i> (no legumbre)
<i>Azorhizobium</i>	<i>A.caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>

El cuarto género está representado por *Agrobacterium*, bacterias patógenas capaces de producir infecciones hipertróficas descontroladas e indiferenciadas en muchos tipos de plantas. La clasificación en especies es aún controvertida, aunque actualmente se acepta la siguiente (Young et al., 1992):

- A.tumefaciens* (especie tipo)
- A.rhizogenes*
- A.rubi*
- A.vitis*

El quinto género, *Phyllobacterium*, está formado por bacterias capaces de producir nódulos en las hojas de ciertas especies de plantas de las familias *Myrsinaceae* y *Rubiaceae*, pero su capacidad de fijar N₂ es discutida. Está compuesto por las especies *P.myrsinacearum* y *P.rubiacearum* (Jordan, 1984).

INTERACCION RIZOBIO-LEGUMINOSA:

Señales difusibles de la planta:

Los rizobios responden positivamente a exudados de las raíces de las plantas mediante un mecanismo quimiotáctico hacia azúcares, aminoácidos y otros nutrientes, en forma similar a otras bacterias saprófitas del suelo. Además, los rizobios muestran una marcada quimiotaxis hacia compuestos del tipo flavonoide, producidos por las plantas. Estos inducen la transcripción de un importante conjunto de genes bacterianos involucrados en la nodulación (genes *nod*). Esta interacción es mediada por el producto del gen *nodD*, el único que se expresa constitutivamente. NodD está asociado a la membrana interna del rizobio y al interaccionar con los flavonoides deja la membrana y es capaz de interactuar con la región promotora (*nod* box) de los restantes genes *nod* (estructurales), activando su transcripción. El primer nivel de especificidad de la simbiosis se encuentra aquí. Cada especie de planta segrega un espectro característico de flavonoides y los NodD de diferentes especies de rizobios reconocen preferentemente un flavonoide en particular (Tabla 2, Dénarié et al., 1992).

Señales difusibles de la bacteria:

Como respuesta a las señales recibidas de la planta, la bacteria sintetiza y segrega glicolípidos denominados factores Nod, que en pequeña concentración (nanomolar) actúan sobre la planta induciendo el enrollado y la ramificación de los pelos absorbentes y la división celular (hipertrofia) en la región cortical de la raíz, dando lugar a un nuevo meristema que terminará formando un nódulo. En la Figura 1 se aprecia la estructura de los oligómeros de quitina substituidos, que representa a los factores Nod:

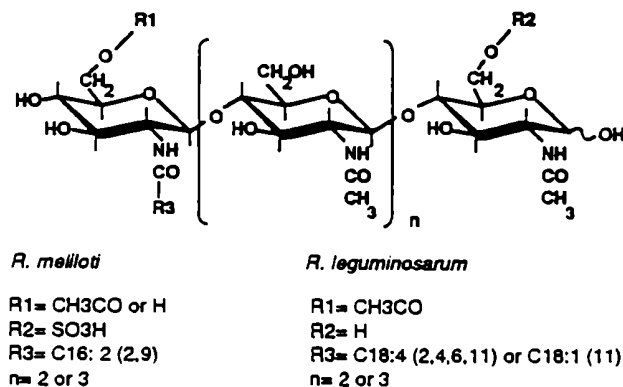
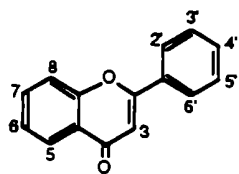


FIGURA 1: Estructura de los factores Nod sintetizados por *R. meliloti* y *R. leguminosarum*.

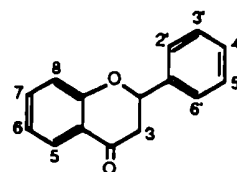
CAPITULO 1: INTRODUCCION GENERAL

TABLA 2: Efecto de flavonoides y chalconas sobre distintas proteínas NodD, en la expresión de los genes *nod*.

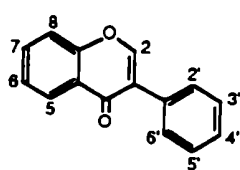
Compuesto	Posición de la substitución						Proteína NodD ^a					
	3	5	7	3'	4'	5'	Rt	Rl	RmD1	RmD2	NGR	Bj
Flavonas:												
luteolina		OH	OH	OH	OH		++	++	++		++	-
apigenina		OH	OH	OH			++	++	+		++	+
---			OH	OH	OH		n	++	++		n	n
crisoeriol		OH	OH	OCH ₃	OH		n	n	++		n	n
---				OH	OH		n	n	-		n	n
---			OH		OH		++	n	+		++	+
crisina		OH	OH				+	-	-		++	-
Flavonoles:												
miricetina	OH	OH	OH	OH	OH	OH					+	n
quercetina	OH	OH	OH	OH	OH						++	-
kaempferol	OH	OH	OH		OH						++	+
Flavanonas:												
eriodictiol		OH	OH	OH	OH		+	++	+		n	
naringenina		OH	OH		OH		++	++	-		++	-
hesperetina		OH	OH	OH	OCH ₃		-	++	-		++	n
Isoflavonas:												
genisteina		OH	OH		OH						++	++
daidzeina			OH		OH						++	++
Chalcona:												
4,4'-dihidroxi-2'-metoxichalcona			OH		OH				++	++	n	



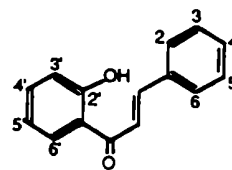
Flavonas y flavonoles



Flavanonas



Isoflavonas



Chalconas

a: Rt: *R.trifolii*, Rl: *R.leguminosarum*, RmD1: *R.meliloti* NodD1, RmD2: *R.meliloti* NodD2, NGR: *R.sp.*NGR234, Bj: *B.japonicum*. ++: 50-100%, +: 10-50%, -: 0-10% de expresión. n: no determinado.

La síntesis de estos factores es llevada a cabo por el producto de los genes *nod* estructurales, los que se clasifican en dos grupos:

Genes *nod* comunes, son los *nodABC*, los que están involucrados en la síntesis del oligosacárido de quitina (poliglucosamina), estructura común en todos los rizobios, aunque de longitud variable (Figura 1).

Genes *nod* específicos, involucrados en la modificación del oligosacárido (Figura 1). Estas sustituciones son las responsables del segundo nivel de control de la especificidad rizobio-planta. Aquí podemos citar a los genes *nodEF* (y *nodG* en *R.meliloti*) que estarían involucrados en la síntesis de los ácidos grasos sustituyentes; los *nodH* y *nodPQ*, responsables de la sulfatación y *nodL*, responsable de la acetilación del factor Nod.

En *R.meliloti* y *R.leguminosarum* los genes *nod* se encuentran agrupados en una región específica del megaplásmido simbiótico pSyma, mientras que en *B.japonicum* son todos cromosomales (Dénarié et al., 1992).

Invasión del nódulo:

El próximo paso en el proceso de nodulación requiere atravesar los tejidos de la raíz hasta alcanzar e invadir el nódulo. Esto implica la unión de la bacteria al pelo radicular, induciendo el enrulado del mismo alrededor de la bacteria que termina por envolverla. Luego se detecta una invaginación de la pared del pelo radicular y un crecimiento de ésta hacia adentro. Aquí comienza la formación del hilo de infección, que avanzará conduciendo a las bacterias hasta invadir la zona meristemática del nódulo. El hilo de infección se ramifica y las bacterias incrementan rápidamente su número dentro de los mismos. Una subsecuente diferenciación del nódulo dará lugar a la formación de conexiones vasculares y a una variedad de tipos celulares necesarios para las distintas funciones.

El próximo paso es la internalización de un rizobio en el citoplasma de la célula vegetal (endocitosis o fagocitosis), donde se comportará como una organela denominada "simbiosoma". En estas condiciones el rizobio encuentra una atmósfera con un contenido de oxígeno inferior al 1%. Este parámetro es crítico, ya que los rizobios son aerobios estrictos, pero una concentración superior de oxígeno impediría la actividad de la nitrogenasa.

Las células de la planta se adaptan a las nuevas condiciones metabólicas de oxígeno, carbono y nitrógeno, por ejemplo, sintetizando un transportador de O₂ llamado leghemoglobina, fundamental para el desarrollo del bacteroide, o sobreexpresando

CAPITULO 1: INTRODUCCION GENERAL

enzimas como la glutamina sintetasa, regulando el metabolismo del carbono mediante una sacarosa sintetasa nódulo-específica, etc.

La bacteria intracelular se diferenciará progresivamente en un bacteroide fijador de N₂, proporcionando a la planta este elemento en forma de "ureidos" fácilmente asimilables. La planta, por su parte, proporcionará a los bacteroides ácidos dicarboxílicos (malato, succinato) como fuente de carbono (Brewin, 1991).

En el proceso infectivo descrito anteriormente, las macromoléculas superficiales de la planta y la bacteria juegan un papel importante.

Se ha propuesto que las fibrillas de celulosa sintetizadas por los rizobios pueden ayudar en el anclaje del mismo sobre la pared mucilaginosa de la raíz, cooperando también las proteínas calcio-dependientes o ricadhesinas bacterianas (Smit et al., 1989). La proteína integral de membrana NodC tendría un rol directo en la interacción entre las superficies celulares, al margen de su posible función exportadora de los factores Nod (John et al., 1988; Johnson et al., 1989).

Los glucanos cíclicos $\beta(1-2)$ (*Rhizobium*) o $\beta(1-3)\beta(1-6)$ (*Bradyrhizobium*) son también necesarios en la adhesión y en la formación de los hilos infectivos. Un trabajo reciente sugiere que la función de estos oligosacáridos no sería directa, sino que intervendrían en la producción de ricadhesinas funcionales (Swart et al., 1993). También se ha sugerido que la cavidad central de estas moléculas cíclicas puede atrapar compuestos, actuando como transportadores desde o hacia la bacteria de moléculas señales como los flavonoides o los factores Nod (Brewin, 1991; Morris et al., 1991; Koizumi et al., 1984a).

Mutantes de rizobios que no producen exopolisacáridos inducen poco o ningún desarrollo de los hilos infectivos. La aplicación exógena de un polisacárido de bajo peso molecular (un tetrámero del succinoglucano en *R.meliloti*; Battisti, 1992) restituye las propiedades infectivas de estas mutantes. Las funciones que se le atribuyen al exopolisacárido son múltiples (Gray y Rolfe, 1990):

- Enmascaramiento de la superficie bacteriana para anular los mecanismos de defensa de la planta.
- Encapsulamiento del rizobio como protección contra el estrés fisiológico dentro del hilo infectivo.
- Reconocimiento de la superficie bacteriana por receptores de la planta hospedadora.
- Estimulación de respuesta de la planta como resultado de la liberación de moléculas señales oligosacáridicas.

Se ha sugerido que la propiedad de los exopolisacáridos de secuestrar Ca^{++} del medio, formando un gel rígido, evitaría la formación de un gel de similares características con el ácido poligalacturónico secretado por la planta. Esto proporcionaría a la bacteria facilidades para su desplazamiento por el hilo de infección (Morris, 1989; Liners, 1989).

Un importante rol en la endocitosis y diferenciación a bacteroide ha sido atribuido al lipopolisacárido bacteriano. Podría estabilizar la membrana externa de la bacteria contra el estrés fisiológico, tal como la extrema acidez que podría encontrarse en el ambiente endofítico (Kannenberg y Brewin, 1989; Bhat et al., 1991) o promover la interacción física de la membrana externa bacteriana y la membrana plasmática de la célula vegetal (Gharyal et al., 1989). Sin embargo, en *R. meliloti* el lipopolisacárido no tiene funciones en este proceso, ya que mutantes que no lo producen siguen siendo infectivas (Clover et al., 1989).

En cuanto a las moléculas superficiales de la planta, las lectinas son sin duda las que han recibido mayor atención. Han sido propuestas como receptoras de los factores Nod, los lipopolisacáridos, exopolisacáridos y glucanos, pero su verdadero rol, si lo tiene, aún no ha sido aclarado (Lugtenberg et al., 1991).

Una glicoproteína extracelular vegetal de 95 kDa ha sido identificada sobre la superficie de células de raíces infectadas. Si bien esta proteína no es un componente nódulo-específico, su secreción parece ser rápidamente aumentada en respuesta a la infección por rizobios, acumulándose en el lumen de los hilos infectivos (Brewin, 1991).

INTERACCION *AGROBACTERIUM*-PLANTA:

El género *Agrobacterium* contiene dos especies ampliamente estudiadas: *A. tumefaciens*, capaz de inducir la formación de tumores tipo agalla y *A. rhizogenes*, capaz de formar raíces adventicias en cabellera, ambas en una gran variedad de plantas dicotiledóneas y en algunas gimnospermas y monocotiledoneas. La infección se realiza a través de heridas sobre tallos y hojas, donde las bacterias se unen a células individuales, transfiriéndole material genético que producirá la transformación de las células infectadas, adquiriendo la capacidad de sintetizar hormonas vegetales que inducen su proliferación. Además sintetizan nuevos azúcares y aminoácidos conjugados llamados "opinas", que serán usados por las bacterias como fuente de carbono y nitrógeno y para inducir la conjugación entre bacterias de los plásmidos de virulencia. Estos plásmidos (pTi en *A. tumefaciens* y pRi

en *A. rhizogenes*) contienen los genes de virulencia (genes *vir*) y el fragmento de DNA que será transferido a la planta, el T-DNA (Winans, 1992; Binns y Thomashow, 1988; Zambryski, 1992).

Moléculas señales de la planta:

Los primeros estadios del proceso infectivo se asemejan mucho al de los rizobios. Las bacterias se agrupan en la vecindad de la planta como resultado de un proceso quimiotáctico hacia azúcares y aminoácidos secretados por las células vegetales, especialmente por los tejidos dañados. Algunos compuestos fenólicos como la acetosiringona (Figura 2) también ejercen un efecto quimiotáctico para *Agrobacterium*, y además inducen la expresión de los genes *vir* (Winans, 1992).

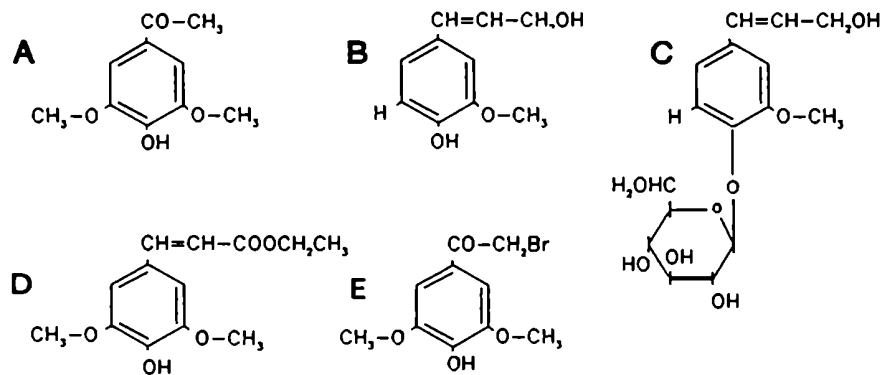


FIGURA 2 Estructura de grupos fenólicos representativos que inducen los genes *vir*. A: acetosiringona, B: coniferilalcohol, C: coniferina, D: etilferulato, E: bromoacetosiringona (un inhibidor).

Estos compuestos fenólicos son censados por el producto de *virA*, una proteína de la membrana plasmática de *Agrobacterium*. En estas condiciones VirA es capaz de autofosforilarse y luego transferir el grupo fosfato a la proteína citosólica VirG, la que uniéndose a zonas específicas de los promotores de los restantes genes *vir* (*vir* box), es capaz de inducir la transcripción de los mismos. VirA y VirG pertenecen a una familia de sistemas reguladores de dos componentes, donde VirA es un miembro de la clase de las histidina-proteín kinasa y VirG es un ejemplo de proteínas reguladoras de la respuesta (Winans, 1992).

Colonización y unión bacteria-célula vegetal:

Simultáneamente al proceso de inducción de los genes *vir*, las bacterias se concentran sobre la zona de la herida de la planta (quimiotaxis). Aquí pueden encontrarse bacterias tumorigénicas (las que contienen plásmidos de virulencia) y no

tumorigénicas (carentes de los mismos, antiguamente *A. radiobacter*). Las bacterias se unen a las células vegetales en sitios aparentemente específicos. Sin embargo aún no se han podido identificar los receptores (Binns y Thomashow, 1988).

Entre los componentes bacterianos que intervienen en la unión se ha descrito que las fibrillas de celulosa cooperan en este proceso, pero no son esenciales (Matthysse, 1983). Las ricadhesinas y/o el glucano $\beta(1-2)$ cíclico parecen ser esenciales en la unión (Douglas et al., 1985; Swart et al., 1993). Mutantes en dos genes cromosomales (*chvA* y *chvB*) involucrados en la secreción y síntesis del glucano son avirulentas (Cangelosi et al., 1989; Douglas et al., 1985; Iñon de Iannino y Ugalde, 1989; Zorreguieta y Ugalde, 1986). A diferencia de lo que ocurre con los rizobios, mutantes no productoras de exopolisacáridos no están afectadas en su virulencia, con una excepción, la mutante *exoC* (*pscA*) (Cangelosi et al., 1987; Thomashow et al., 1987), de origen cromosomal, probablemente por su incapacidad adicional de sintetizar glucano (esta tesis).

Transformación de las células vegetales:

Los plásmidos de virulencia se clasifican según el tipo de opina producida por las células que transforma. En la Figura 3 se esquematiza un pTi del tipo octopina, donde se aprecian zonas que codifican para los genes *vir*, los que tienen la función de transferir el T-DNA presente en una o dos copias no equivalentes (T_L y/o T_R -DNA). En el T-DNA se encuentran los genes encargados de la síntesis de opinas, hormonas vegetales (auxina, citoquinina) y otros genes tumorigénicos, los que solo serán expresados una vez que el T-DNA se haya integrado en el genoma de la planta. Existen también regiones involucradas con el metabolismo de las opinas y la conjugación entre bacterias, proceso por el cual se amplifica el número de células de *Agrobacterium* virulentas, por adquisición de este plásmido (Binns y Thomashow, 1988).

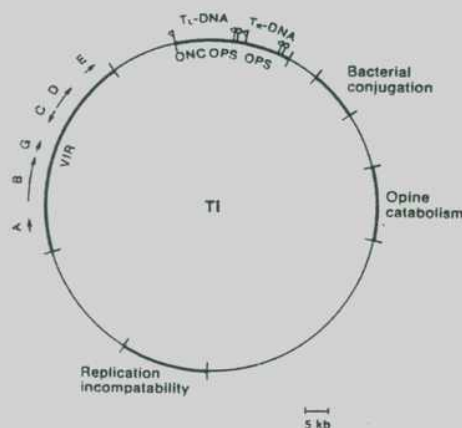


FIGURA 3: Plásmido Ti tipo octopina. Los círculos representan las secuencias *ode*, los triángulos, las secuencias repetidas y directas. ONC: oncogenes. OPS: genes para la síntesis de opinas (tomado de Binns y Thomashow, 1988).

El T-DNA está flanqueado por secuencias de 25 bases repetidas y directas. El borde derecho es esencial para la correcta transferencia, no así el izquierdo, que puede estar ausente. A la derecha del borde derecho suele haber una secuencia denominada *ode* (por overdrive) que dirige el sentido de la transferencia del T-DNA, desde el borde derecho al izquierdo. Esta transferencia ha sido comparada con la conjugación en muchos aspectos. El proceso comienza con la acción de las proteínas VirD1 y VirD2, donde VirD1 tendría funciones de topoisomerasa y VirD2 sería la encargada de cortar el enlace fosfato en el borde derecho del T-DNA de la hebra que será transferida. El extremo 5' del DNA simple cadena generado se une covalentemente a VirD2 y lo acompañará como "piloto" en todo el proceso de transferencia. La hebra escindida va siendo separada de la doble cadena por una nueva hebra que es sintetizada sobre la complementaria y es estabilizada y protegida por el recubrimiento con moléculas de VirE (Winans, 1992).

La hebra de T-DNA es entonces cortada por su extremo 3' y este complejo DNA-proteína es transportado a la célula vegetal a través de un poro abierto sobre ambas paredes celulares formado por el producto de los genes *virB*, compuesto por 11 proteínas distintas. Una vez en la célula blanco, el T-DNA es conducido hasta el núcleo por VirD2, la que probablemente también colabore en la integración en algún cromosoma. Esta integración es aparentemente inespecífica, aunque pequeños fragmentos homólogos (5-10 bases) entre los extremos del T-DNA y el sitio "blanco" de la planta pueden jugar algún rol en la integración (Zambryski, 1992). Una vez integrado el T-DNA, comienza la expresión de sus genes, los que están provistos de sitios activadores de la transcripción, promotores, y señales de poliadenilación similares a los de la planta (Winans, 1992).

POLISACARIDOS SINTETIZADOS POR *R.meliloti* y *A.tumefaciens*:

Ambas especies sintetizan una gran variedad de polisacáridos, alguno de los cuales son idénticos. Sus funciones son variadas y de gran importancia, actuando:

- como moléculas señales; es el caso de los factores Nod, ya descriptos.
- en la unión de la bacteria a la superficie de la célula vegetal (glucano $\beta(1-2)$ cíclico, celulosa).
- en la formación del hilo de infección en la interacción planta-rizobio (exopolisacárido, glucano $\beta(1-2)$ cíclico).
- como producto de reserva (glucógeno).

-en la internalización del rizobio en las células del nódulo; es el caso del lipopolisacárido (LPS), de gran importancia en varias especies de rizobios. En *R.meliloti* la función del LPS parece ser prescindible, aunque una variante del LPS normal, capaz de ser sintetizada por la acción del gen *lpsZ*, puede reemplazar las funciones de los exopolisacáridos (Williams et al., 1990), adquiriendo así, un rol en el proceso infectivo de esta especie.

Exopolisacáridos:

Succinoglicano o EPS I: Es sintetizado por ambas especies y consiste en un polímero de alto peso molecular de unidades repetitivas compuestas por glucosa y galactosa en la relación 7:1 substituida con restos acetilo, succinilo y piruvilo (Aman et al., 1981; Hisamatsu et al., 1980; Reuber y Walker, 1993a) (ver Figura 4).

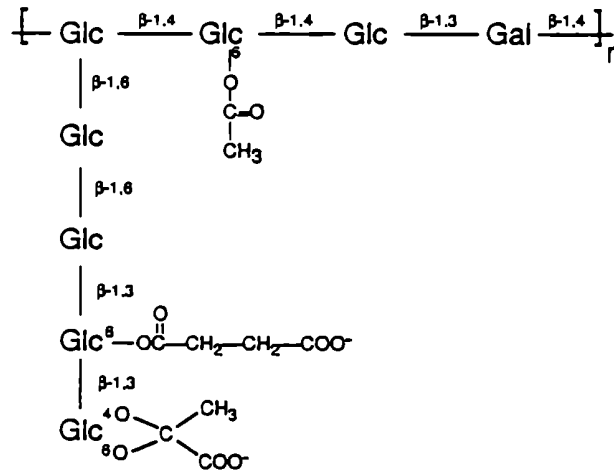


FIGURA 4: Estructura del octasacárido que representa la unidad repetitiva del succinoglicano (tomado de Reuber y Walker, 1993a).

La biosíntesis de EPS I se realiza sobre un intermediario lipídico del tipo poliprenolfosfato, y ha sido estudiada en nuestro laboratorio por Tolmasky et al. (1980, 1982, Staneloni et al., 1984) y continuada por Walker y colaboradores (Reuber y Walker, 1993a y b; Glucksmann et al., 1993a y b; Leigh et al., 1985), quienes han identificado la mayoría de los genes involucrados y sus funciones (genes *exo*, ver Figura 5). Estos genes están agrupados sobre el segundo megaplásmido simbiótico (pSymb) de *R.meliloti*, salvo algunos, que se localizan en el cromosoma. En la Tabla 3 se enumeran los genes *exo* de *R.meliloti* y las funciones que se le atribuyen.

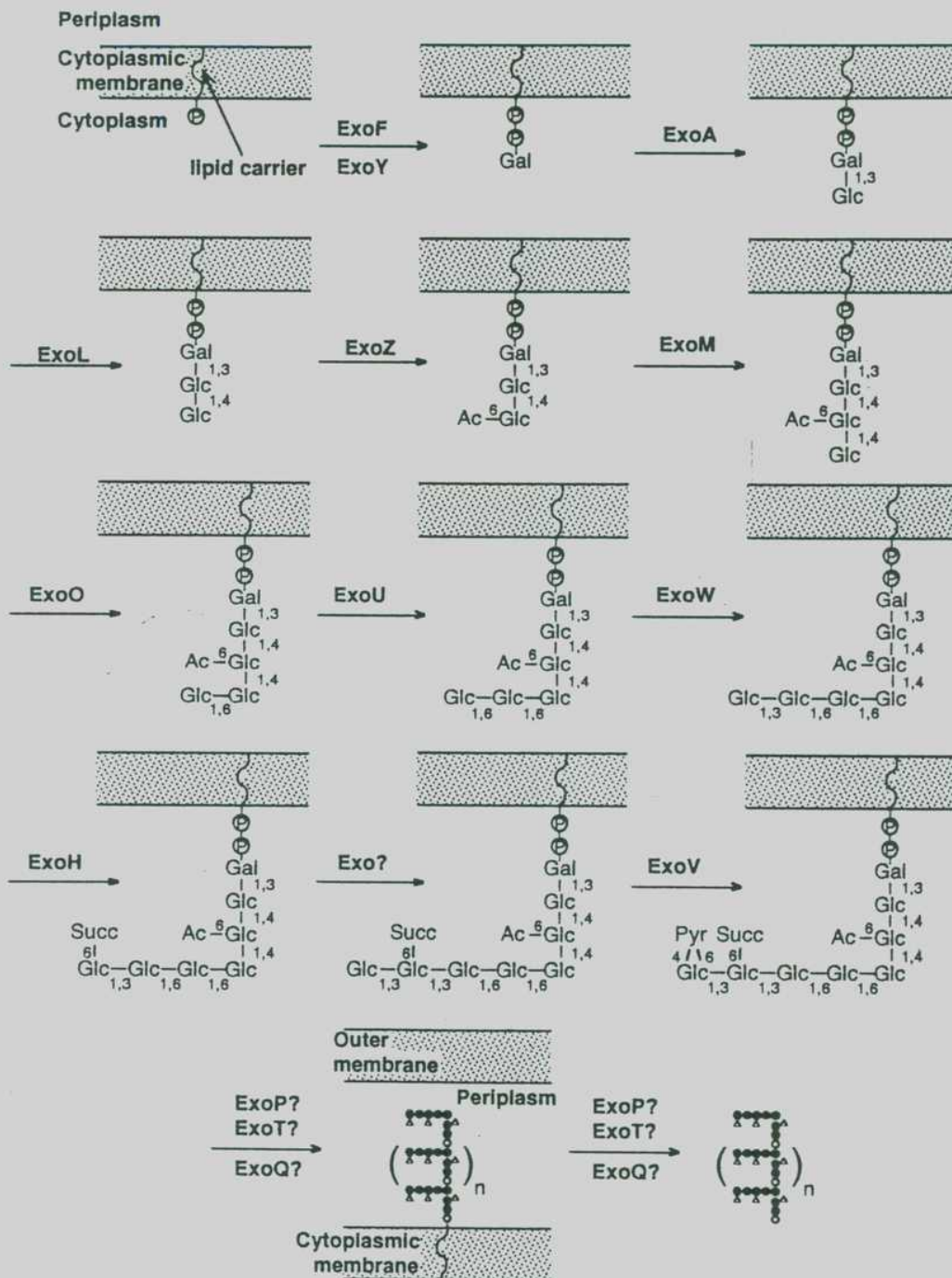


FIGURA 5: Modelo propuesto para la síntesis del succinoglicano (tomado de Reuber y Walker, 1993b).

CAPITULO 1: INTRODUCCION GENERAL

Tabla 3:

locus	función/fenotipo	localización	referencia
<i>exoF</i>	galactosiltransferasa	pSymb	Reuber y Walker, 1993b
<i>Y (G)</i>	"	"	"
<i>A</i>	glucosiltransferasa1		
<i>L</i>	2		
<i>M</i>	3		
<i>O</i>	4		
<i>U</i>	5		
<i>W</i>	6 (y 7?)		
<i>P</i>	polimer. y transporte		
<i>Q</i>	" "		
<i>T</i>			
<i>H</i>	succinilación		Leigh et al., 1987
<i>Z</i>	acetilación		Reuber y Walker, 1993a
<i>B</i>	pleiotrópico		esta tesis
<i>X (J)</i>	regul.(-) posttraduc.		Reed, et al., 1991a
<i>K</i>	$\beta(1-3)\beta(1-4)$ glucanasa		Glucksmann et al., 1993b
<i>N</i>	UDP-glc sintetasa		"
<i>V</i>	piruvilación		Reuber y Walker, 1993b
<i>I</i>	?		Glucksmann et al., 1993b
<i>C (pscA)</i>	pleiotrópico	cromosoma	esta tesis
<i>R</i>	regul.(-) transcrip.	"	Doherty et al., 1988
<i>S</i>	" " (?)		"
<i>D</i>	?/pleiotrópico		Reed y Walker, 1991

En *A.tumefaciens* se han identificado sólo alguno de estos genes, los que fueron denominados en forma equivalente: *exoA*, *B*, *C*, *D*, *F* y *G*; todos parecen ser cromosomales e intercambiables con los de *R.meliloti*, indicando que la semejanza entre especies no es solo estructural, sino también a nivel genético (Cangelosi et al., 1987).

La síntesis de EPS I parece estar regulada a nivel transcripcional y post-traduccional. El producto de los genes *exoR* y *exoS* actúan como reguladores negativos de la transcripción de muchos de los genes *exo*. Ambos son cromosomales y, mientras muy poco se conoce sobre *exoS*, se ha determinado que *exoR* es regulado por el contenido de NH_4^+ . Es conocido el hecho que medios ricos en nitrógeno inhiben la síntesis de EPS I (Doherty et al., 1988; Reed et al., 1991a y b; Reuber et al., 1991; Leigh y Coplin, 1992).

El producto de *exoY* y *exoF* han sido descritos como responsables de la transferencia de galactosa desde UDP-galactosa al lípido intermediario, dando comienzo a la síntesis del EPS I. ExoY presenta homología con glicosil transferasas, sin embargo, está involucrado en la regulación post-traducciona de la síntesis de EPS I al interactuar con el producto de *exoX*, el que tendría efectos inhibitorios (Reuber y Walker, 1993b; Glucksmann et al., 1993a; Leigh y Coplin, 1992; Reed et al., 1991a).

Se ha descrito que *syrA* y *syrM*, localizados en la región *nod* del megaplásmido pSyma actúan en forma concertada con *nodD* aumentando la expresión de los genes *nod*, pero también afectan positivamente la expresión de los genes *exo* (Leigh y Coplin, 1992).

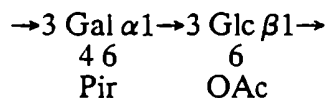
En *A.tumefaciens*, el gen *ros* regula positivamente la síntesis de succinoglicano. Mutaciones sobre este gen tienen efectos pleiotrópicos que incluyen la aparición de colonias rugosas, la incapacidad de crecer a temperaturas menores a 24°C y la imposibilidad de sintetizar EPS (Close et al., 1987).

Como se aprecia en la Tabla 3, mutaciones sobre dos genes *exo*, presentan un fenotipo pleiotrópico. Las mutantes *exoB* de *R.meliloti* no sintetizan EPS I ni EPSII y tienen un lipopolisacárido alterado, y las mutantes *exoC* de ambas especies son incapaces de sintetizar EPS I, EPS II y glucano $\beta(1-2)$ cíclico. En *R.meliloti* las mutantes *exoC* presentan también un lipopolisacárido alterado, pero diferente al de las *exoB* (Cangelosi et al., 1987; Leigh y Lee, 1988). La caracterización de estas dos mutantes es objeto de la presente tesis.

Exopolisacárido II (EPS II): En *R. meliloti*, la mutación del locus cromosomal *expR*, también denominado *mucR* o *rexA* (Glazebrook y Walker, 1989; Zhan et al., 1989; Puhler et al., 1991), conduce a la inhibición de la síntesis del succinoglicano (EPS I) y a la desrepresión de un conjunto de genes encargados de la síntesis de un segundo polisacárido denominado EPS II. La baja concentración de fosfatos, pero no de nitrógeno o sulfatos, sería el responsable fisiológico de la estimulación de la síntesis

de EPS II en un proceso independiente de la acción del gen *mucR* (Zhan et al., 1991); un aumento de la osmolaridad tiene efectos inhibitorios (Zevenhuizen y Faleschini, 1991).

La estructura del EPS II es la siguiente (Her et al., 1990; Levery et al., 1991):

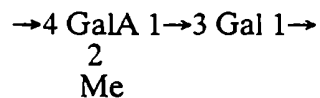


Los genes *exoB* y *exoC* (ver Tabla 3) y un grupo de genes denominados *exp* localizados en el megaplásmido pSymb son los responsables de su síntesis (Glazebrook y Walker, 1989; Zhan et al., 1989). La expresión de este polisacárido restaura el fenotipo infectivo de mutantes no productoras de succinoglicano, sobre alfalfa (*Medicago sativa*) pero no sobre otras especies (Glazebrook y Walker, 1989). Esto indicaría que los exopolisacáridos podrían tener alguna función en la determinación de la especificidad de hospedador.

Otros exopolisacáridos: Algunas cepas de *R.meliloti* sintetizan EPSs distintos a los descritos anteriormente. *R.meliloti* IFO13336 sintetiza un polímero de un octasacárido similar al EPS I, pero posee ácido glucurónico unido $\beta(1-4)$ en lugar de la séptima glucosa y ácido riburónico unido $\beta(1-4)$ en lugar de la octava glucosa. No posee piruvato ni succinato (Amemura et al., 1981).

R.meliloti 201 sintetiza dos EPS denominados APS-I y II. APS-I es un polímero de tres unidades repetitivas diferentes (OP), en la proporción OP1 55%, OP2 25% y OP3 20%, donde OP1 es un pentasacárido que contiene manosa, ácido glucurónico y glucosa en la relación 2:1:2 (Yu et al., 1983).

R.meliloti 102 F51 LA y GR4 sintetizan un polisacárido del tipo teicurónico, que contiene la siguiente unidad repetitiva (Coira et al., 1987):



La presencia de este EPS correlaciona con un aumento en la competitividad de la infección de nódulos de alfalfa (Cavaignac, 1988; Ugalde et al., 1986).

Lipopolisacáridos (LPS):

El LPS consiste de: a) Lípido A, que tiene la función de anclar el LPS a la membrana externa

b) El "core", conteniendo azúcares específicos de los LPS, como 2-ceto 3-deoxi octonato (KDO)

c) El antígeno O, que es altamente variable en su composición de azúcares, incluso entre cepas de la misma especie.

La estructura del LPS es desconocida en ambas especies. Solo se ha analizado su composición cualitativa.

En *A.tumefaciens* se determinó la presencia de KDO, glucosa, galactosa, manosa, ramnosa, glucosamina y los ácidos grasos 3-hidroxitetradecanoico y 3-hidroxihexadecanoico en la relación 3:1 (Salkinoja-Salonen y Boeck, 1978).

En *R.meliloti* solo se ha podido detectar la presencia de galactosa, glucosa, KDO, hexosaminas y ácidos urónicos (Zevenhuizen et al., 1980)

Curdulano:

Es un glucano $\beta(1-3)$ que recubre las células de *A.tumefaciens* como una sustancia gelatinosa. Puede ser extraído con agua caliente o hidróxido de sodio (Harada et al., 1968; Harada y Amemura, 1981).

Celulosa:

Es un polímero de glucosa unidas $\beta(1-4)$. Ambas especies la sintetizan en forma de microfibrillas, que han sido involucradas en el anclaje de las bacterias sobre la pared de las células vegetales. Este anclaje no parece ser imprescindible, ya que, por ejemplo, mutantes de *A.tumefaciens* no productoras de celulosa siguen siendo virulentas, aunque la cinética de unión está alterada. Todos los genes involucrados en la síntesis de celulosa son cromosomales en *A.tumefaciens*, requiriéndose además al gen *pscA* (*exoC*) (Matthysse, 1983; Thomashow et al., 1987; Napoli et al., 1975).

Glucano β (1-2) cíclico:

Es un polímero cíclico de glucosas con un grado de polimerización promedio de 18 (17 a 40) (Dell et al., 1983; Koizumi et al., 1984b), substituído con grupos fosfoglicerol (Miller et al., 1987 y 1988). Este oligosacárido se acumula en el espacio periplásmico (Abe et al., 1982; Miller et al., 1986), aunque parece ser secretado al medio extracelular en baja proporción (York et al., 1980; Zevenhuizen, 1981). Su rol fisiológico no ha sido aclarado todavía, pero a semejanza del MDO (Membrane Derived Oligosaccharide) en *E.coli*, podría actuar como osmoregulador del espacio periplásmico; en ambos casos su síntesis se ve inhibida a alta osmolaridad (Miller et al., 1986; Kennedy, 1982; Schneider et al., 1979; Dylan et al., 1990; Cangelosi et al.,

1990; Zorreguieta et al., 1990). Está involucrado en los procesos infectivos de ambas especies. Mutantes que no producen glucano son incapaces de unirse a las células de la planta (Puvanesarajah et al., 1985; Geremia et al., 1987; Zorreguieta et al., 1988). Hasta el momento sólo se conocen tres genes (cromosomales en ambas especies) necesarios para su síntesis: *exoC* (esta tesis; Cangelosi et al, 1987; Thomashow et al., 1987), *chvA* en *A.tumefaciens* o *ndvA* en *R.meliloti*, y *chvB* (*ndvB*) (Dylan et al., 1986). El gen *chvA* (*ndvA*) codifica una proteína de membrana interna de 65 kDa (67 kDa) que actúa como secretora del glucano recién sintetizado, hacia el espacio periplásmico (Iñon de Iannino y Ugalde, 1989; Cangelosi et al., 1989; Stanfield et al., 1988). ChvB (NdvB) es una proteína intrínseca de membrana interna con un peso molecular aparente de 235 kDa (319 kDa, según datos de secuencia; Ielpi et al., 1990) que actúa como la maquinaria biosintética del glucano cíclico (Geremia et al., 1987; Zorreguieta et al., 1988, Zorreguieta y Ugalde, 1986). Una proteína ChvB truncada, de aproximadamente 150 kDa, conserva estas funciones (Zorreguieta et al., 1988). ChvA y ChvB estarían asociadas formando un complejo proteico sobre la membrana (Iñon de Iannino y Ugalde, 1989). La síntesis del glucano se realiza en dos etapas: a) elongación del polímero de glucosas sobre la proteína de 235 kDa con UDP-glucosa como sustrato; b) ciclación del oligosacárido y liberación de la proteína (Zorreguieta y Ugalde, 1986). Los lípido-azúcares intermediarios en la síntesis de otros polisacáridos parecen no intervenir en la síntesis del glucano $\beta(1-2)$ cíclico (Zorreguieta y Ugalde, 1986).

Glucógeno:

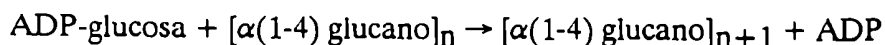
Es el principal polímero de reserva en bacterias y ha sido descrito en más de 40 especies distintas incluyendo bacterias fotosintéticas, Gram negativas, Gram positivas y arqueobacterias. Es un polímero de glucosas linealmente unidas ($\alpha 1,4$) en un 90%, con ramificaciones $\alpha 1,6$ (Preiss, 1984). *A.tumefaciens* y *R.meliloti* sintetizan glucógeno preferencialmente en fase estacionaria, sobre medios ricos en fuentes de carbono o limitantes en nitrógeno (Preiss, 1984; Madsen, 1961; Zevenhuizen, 1981). Las enzimas involucradas en su síntesis son:

1) ADP-glucosa pirofosforilasa (o sintetasa, EC 2.7.7.27):



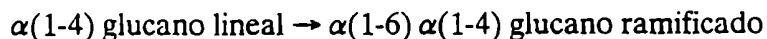
Es una enzima homotetramérica cuyas subunidades están codificadas por el gen *glgC* en *E.coli* y *S.typhimurium* (Leung y Preiss, 1987; Baecker et al., 1983).

2) Glucógeno sintetasa (EC 2.4.1.21):



Está codificada por el gen *glgA* (Kumar et al., 1986).

3) Enzima ramificante o 1,4 α D-glucano: 1,4 α D-glucano 6 α D 1,4 α D-glucano transferasa (EC 2.4.1.18):

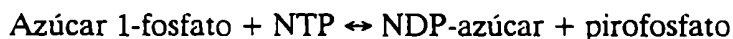


Está codificada por el gen *glgB* (Baecker et al., 1986).

La síntesis de glucógeno está regulada a nivel transcripcional, con (p)ppGpp y cAMP como posibles moduladores, y a nivel post-traducciona, siendo la ADP-glucosa sintetasa una enzima alostérica cuya actividad es regulada por intermediarios del metabolismo de azúcares. Así, dependiendo del tipo de metabolismo predominante en la célula variarán los metabolitos reguladores. Por ejemplo, en bacterias entéricas, la vía glucolítica es la de Embden-Meyerhof y la ADP-glucosa sintetasa es activada por fructosa 1,6-bisfosfato e inhibida por AMP, mientras que en *A.tumefaciens* la glucólisis se realiza preferentemente por la vía de Entner-Doudoroff y la activación de la enzima está a cargo de fructosa 6-fosfato y piruvato y la inhibición por AMP y ADP (Preiss, 1984).

METABOLISMO DE LA GALACTOSA Y NUCLEOTIDO-AZUCARES:

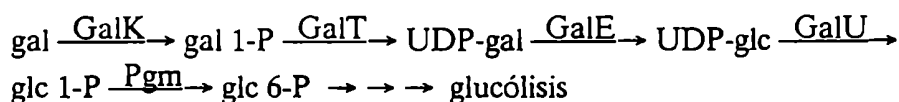
La síntesis de los polisacáridos que hemos descrito anteriormente se lleva a cabo utilizando nucleótido-azúcares como intermediarios. Es un hecho común en la naturaleza la necesidad de "activar" los carbohidratos que serán polimerizados. Esto incluye su fosforilación y la posterior formación de un nucleótido-azúcar. Esta última reacción la llevan a cabo las pirofosforilasas (o sintetosas):



In vivo, el equilibrio de esta reacción está desplazado hacia la derecha, por la acción de enzimas que hidrolizan el pirofosfato (pirofosfatasa). La hidrólisis del enlace glicosídico del nucleótido-azúcar proporciona la energía necesaria en la polimerización. En la Fig. 6 se suman las reacciones conocidas en diferentes especies que involucra el metabolismo de algunas hexosas y la formación de una amplia variedad de nucleótido-azúcares (Gabriel, 1987).

Como se aprecia, los nucleótido-azúcares no solo actúan como intermediarios en la síntesis de polisacáridos, sino también en la síntesis de otros azúcares y nucleótido-azúcares. Una función adicional es la de permitir la metabolización de distintos carbohidratos por conexión con la vía glucolítica.

El caso típico es el catabolismo de la galactosa mediante la vía de Leloir (Maxwell et al., 1962):



Las enzimas GalK (galactokinasa), GalT (galactosa 1-fosfato uridililtransferasa) y GalE (UDP-galactosa 4-epimerasa) se encuentran formando un operón que mapea en el minuto 17 del cromosoma de *E.coli*, finamente regulado a nivel transcripcional por el producto de los genes *galR*, *galS* y *crp* (por cyclic AMP receptor protein). GalU (UTP: α D-glucosa 1-fosfato uridililtransferasa) y Pgm (fosfoglucomutasa) se expresan constitutivamente y no parecen estar reguladas; mapean en forma aislada (min 28 y 15 respectivamente) del operón galactosa. (Adhya, 1987; Weickert y Adhya, 1993).

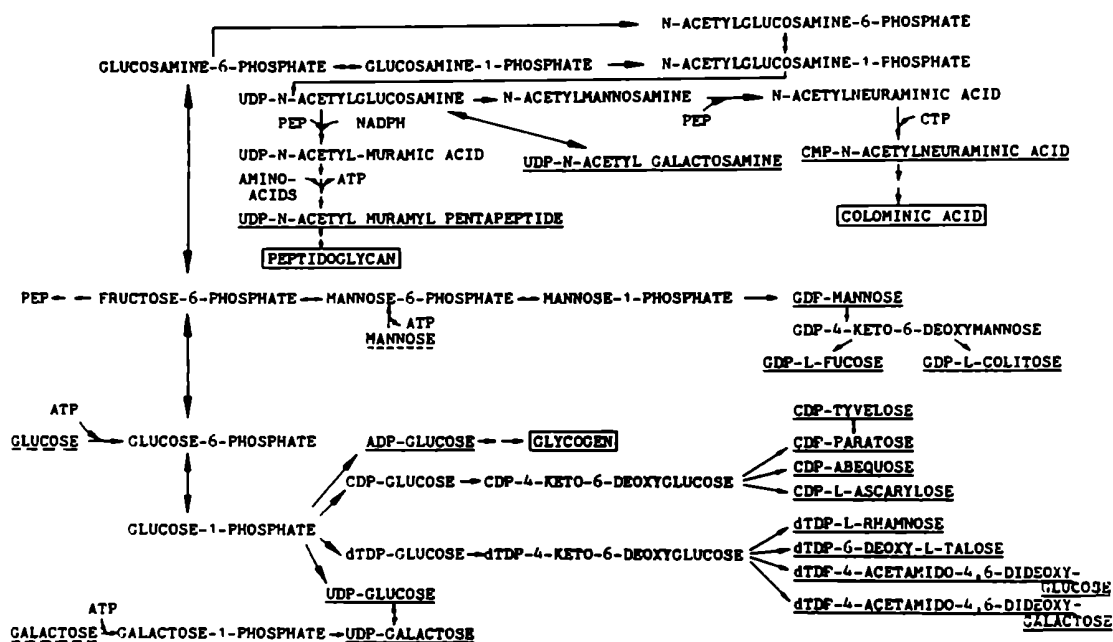


FIGURA 6: Metabolismo de azúcares y nucleótido-azúcares. Salvo que se indique, todos los carbohidratos son D-azúcares. Subrayado discontinuo se indican los azúcares primarios. Subrayado se indican los precursores en la síntesis de polisacáridos. Algunos polisacáridos se indican recuadrados.

Existe una vía alternativa para la metabolización de la galactosa que fue descrita por primera vez en *Pseudomonas saccharophila* (Doudoroff et al., 1956; DeLey y Doudoroff, 1957; Lessie y Phibbs, 1984) (Fig. 7). Esta ruta es inducible por galactosa y no está conectada con el metabolismo de los nucleótido-azúcares. Se trata de una vía oxidativa similar a la de Entner-Doudoroff (1952) para glucosa 6-fosfato y ácido glucónico (Lessie y Phibbs, 1984), compuesta por las enzimas D-galactosa dehidrogenasa (EC 1.1.1.48), δ lactonasa (EC 3.1.1.25), D-galactono

CAPITULO 1: INTRODUCCION GENERAL

dehidratasa (EC 4.2.1.6), 2-ceto 3-deoxigalactono kinasa (EC 2.7.1.58) y 2-ceto 3-deoxi 6-fosfogalactono aldolasa (EC 4.1.2.21).

Esta vía fue detectada también en *Gluconobacter liquefaciens* (Stouthamer, 1961), *R.leguminosarum* (Ronson y Primrose, 1979; Canter-Cremers et al., 1990) y *R.meliloti* (Arias y Cerveñansky, 1986).

Galactosa → galactono δ lactona → ác. galactónico → ác. 2-ceto 3-deoxi galactónico → ác. 2-ceto 3-deoxi 6-fosfo galactónico ↔ ác. pirúvico + gliceraldehido 3-fosfato

FIGURA 7: Ruta metabólica de DeLey-Doudoroff para la metabolización de la galactosa.

Curiosamente *E.coli* es capaz de crecer sobre ác. galactónico induciendo la síntesis de las mismas enzimas descritas en *P.saccharophila*, con la sola excepción de la primer enzima (galactosa dehidrogenasa) cuyo gen parece estar ausente en bacterias entéricas (Deacon y Cooper, 1977), donde la galactosa es incapaz de inducir estas enzimas pero sí las del camino de Leloir.

OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS:

Como se ha querido reseñar en esta introducción, las macromoléculas superficiales bacterianas cumplen un rol fundamental en la interacción con el hospedador. Durante años se han obtenido un gran número de mutantes incapaces de sintetizar algunos de estos compuestos, con el fin de identificar su relación en el proceso infectivo. Hemos prestado especial atención a dos mutaciones, *exoB* y *exoC*, descritas en *R.meliloti* y *A.tumefaciens*, por su fenotipo pleiotrópico en cuanto a la incapacidad de sintetizar más de un polisacárido.

Los objetivos de la presente tesis consisten en la caracterización bioquímica y genética de estas dos mutantes y su relación con el metabolismo general de azúcares y nucleótido-azúcares.

Como se verá más adelante, el estudio de estas mutaciones ha permitido revelar algunos aspectos interesantes del metabolismo de la galactosa y la síntesis de glucógeno en *A.tumefaciens*.

CAPITULO 2

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS MUTACIONES *exoC*

RESUMEN: La síntesis del glucano $\beta(1-2)$ cíclico es necesaria para la formación de tumores de agalla en plantas infectadas por *A.tumefaciens* y la nodulación efectiva de las raíces de alfalfa por *R.meliloti*, el que también requiere de la síntesis del exopolisacárido succinoglicano. El locus *exoC* es requerido en ambas especies para la síntesis de este glucano, del succinoglicano y del lipopolisacárido completo. Aquí se presentan resultados que indican que el fenotipo pleiotrópico de estas mutantes se debe a un defecto en la síntesis de un intermediario común en el camino biosintético de varios polisacáridos. Extractos citosólicos de cepas salvajes y de mutantes complementadas con un plásmido que contiene el locus *exoC* sintetizaron in vitro UDP-glucosa a partir de glucosa, glucosa 1-fosfato y glucosa 6-fosfato. Extractos de mutantes *exoC* sintetizaron in vitro UDP-glucosa solo a partir de glucosa 1-fosfato, pero no de glucosa o glucosa 6-fosfato, como sustratos. Las membranas internas de las mutantes *exoC* sintetizaron in vitro glucano $\beta(1-2)$ cíclico a partir de UDP-glucosa exogenamente agregado y contienen la proteína intermediaria de 235 kDa, responsable de la síntesis de este glucano en cepas salvajes. Puede concluirse que la incapacidad de estas mutantes para sintetizar esta amplia gama de polisacáridos es debida a la deficiencia en la actividad de la enzima fosfoglucomutasa (EC 2.7.5.1) que convierte reversiblemente glucosa 6-fosfato en glucosa 1-fosfato, intermediario directo en la síntesis de UDP-glucosa.

INTRODUCCION:

El succinoglicano (EPS I) y el glucano $\beta(1-2)$ cíclico son necesarios en el proceso infectivo de *R.meliloti*. Las mutantes que no los producen forman pseudonódulos en raíces de alfalfa, blancos y vacíos de bacterias, incapaces de fijar N_2 (Leigh et al. 1985; Leigh y Lee, 1988). En *A.tumefaciens*, solo el glucano $\beta(1-2)$ cíclico es necesario en la formación de tumores sobre plantas (Cangelosi et al, 1987; Puvanesarajah et al., 1985). Las mutantes *exoC* (*pscA*) de *A.tumefaciens* son las únicas mutantes *exo* (no productoras de EPS I) avirulentas (Cangelosi et al., 1987; Marks et al., 1987; Thomashow et al., 1987). Estas mutantes fueron aisladas

originalmente en *R.meliloti* (Leigh et al., 1985), presentando un fenotipo pleiotrópico para la síntesis de diversos polisacáridos (Leigh y Lee, 1988). En *R.meliloti*, el locus *exoC* es requerido en la síntesis de EPS I, EPS II, glucano $\beta(1-2)$ y lipopolisacárido (Leigh y Lee, 1988; Glazebrook y Walker, 1989; Zhan et al., 1989), mientras que en *A.tumefaciens* ha sido involucrado en la síntesis de succinoglicano, glucano $\beta(1-2)$, celulosa y glucógeno (Cangelosi et al., 1987; Thomashow et al., 1987; Lepek, 1993). El fenotipo avirulento de las mutantes *exoC* de *A.tumefaciens* puede deberse a la incapacidad de sintetizar glucano.

En este capítulo, se presentan evidencias de que estas mutantes carecen de glucosa 1-fosfato, intermediario en la síntesis de UDP-glucosa, que es el intermediario común en la síntesis de los polisacáridos citados anteriormente.

RESULTADOS:

Síntesis in vivo de glucano $\beta(1-2)$ cíclico y succinoglicano: En trabajos previos (Cangelosi et al., 1987) se demostró que mutantes *exoC* de *A.tumefaciens* no secretan glucano $\beta(1-2)$ al medio extracelular. Sin embargo no se llevaron a cabo trabajos para determinar la acumulación celular de este oligosacárido. Para determinar la existencia de glucano periplásmico en estas mutantes, se realizaron extracciones de células de *A.tumefaciens* salvajes y mutantes con ácido tricloroacético. Estos extractos fueron cromatografiados en una columna de Bio Gel P4. Los extractos provenientes de células mutantes (cepas A5129 y A5503) presentaron menos del 1% de material detectable por el método Antrona-SO₄H₂ respecto de las células salvajes, eluyendo en la posición correspondiente al glucano $\beta(1-2)$ cíclico ($K_{av}=0,2$) (Geremia et al., 1987). El plásmido pFC6251, que contiene el locus salvaje *exoC* fue introducido por conjugación en ambas cepas mutantes, restaurando la acumulación de glucano celular a niveles similares (0,66 mg equivalentes de glucosa/g de células húmedas) a los de la cepa salvaje (1,08 mg/g). Estos resultados son similares a los descritos por Leigh y Lee (1988) para mutantes *exoC* de *R.meliloti*, y muestran que el locus *exoC* es requerido para la síntesis in vivo del glucano.

Como se describió anteriormente (Cangelosi et al., 1987; Leigh y Lee, 1988; Marks et al., 1987), las mutantes *exoC* no producen polisacáridos extracelulares detectables de ningún tipo. El plásmido pFC6251 restauró la síntesis de succinoglicano a niveles comparables a los de la cepa salvaje.

Síntesis in vitro de glucano $\beta(1-2)$ cíclico: La incapacidad de las mutantes *exoC* de sintetizar glucano $\beta(1-2)$ puede deberse a un bloqueo en la transferencia de glucosa desde UDP-glucosa al glucano, o a un paso previo.

Para discernir entre estas posibilidades, se ensayó la capacidad de fracciones de membranas internas de mutantes *exoC*, de sintetizar in vitro glucano $\beta(1-2)$ en presencia del substrato (UDP-glucosa) exogenamente agregado. Los resultados demuestran que las membranas de las mutantes fueron activas en la síntesis in vitro de [^{14}C]glucano a partir de UDP- ^{14}C]glucosa (Tabla 4). A diferencia de las membranas de cepas salvajes, se requirió de incubaciones prolongadas (90 min) y del agregado de UDP-glucosa no radioactivo en una concentración final de 16 mM (Tabla 4). En la Figura 8 se muestra el perfil de elución en una columna de Bio Gel P4, de los productos de las incubaciones in vitro. Se observa que los productos formados por las mutantes son similares a los sintetizados in vitro por la cepa salvaje y eluyen con un K_{av} de 0,06 a 0,3 (Zorreguieta y Ugalde, 1986).

TABLA 4: Producción in vitro de glucano $\beta(1-2)$ y acumulación de intermediarios.

Cepa	Condición	Acumulación de proteína intermediaria ^a	Producción de glucano $\beta(1-2)$ ^b
A348	Pulso ^c chase ^d	20020 3565	2,7
A5503 (pFC6251)	Pulso chase	30170 4620	9,2
A5503	Pulso chase	163580 38220	2,2
A5129	Pulso chase	264805 67430	2,9

a: cpm x min⁻¹ x mg⁻¹ de proteínas en la fracción insoluble con ácido tricloroacético 10%. b: pmoles de glucosa x min⁻¹ x mg⁻¹ de proteínas recuperados en la fracción neutra (eluato de DEAE-Sephadex A-25) del sobrenadante de las incubaciones. c: Incubación de membranas internas con 400 kcpm de UDP- ^{14}C]glucosa a 10°C 10 min. d: Las mismas incubaciones seguidas del agregado de UDP-glucosa 16 mM e incubación durante 90 min. más.

La naturaleza cíclica de los glucanos producidos in vitro fue confirmada por la resistencia de los mismos a la acción de la Glusulasa, enzima que, bajo condiciones controladas, solo digiere polisacáridos lineales (Zorreguieta et al., 1985a). Se

confirma entonces que membranas internas de mutantes *exoC* de *A.tumefaciens* son activas en la síntesis in vitro de glucano $\beta(1-2)$ cíclico.

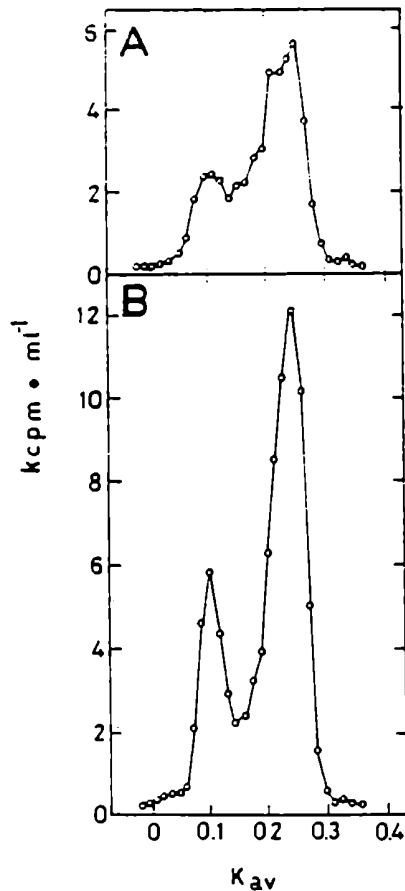


FIGURA 8: Cromatografía en columna de Bio Gel P4. La fracción neutra (eluato de la columna de DEAE-Sephadex A-25) obtenida luego de la incubación de membranas internas con UDP- $[^{14}\text{C}]$ glucosa (act. espec. 500kcpm/umol) fue sembrada en una columna de 1,8 x 78 cm y eluida con 0,1 M de acetato de piridina (pH 5,5). A, *A.tumefaciens* A348 (cepa salvaje). B, *A.tumefaciens* A5129 (mutante *exoC*).

Presencia y actividad de la proteína de membrana interna de 235 kDa: Para determinar si las mutantes *exoC* contienen niveles normales de la proteína de membrana interna de 235 kDa o ChvB, y si esta proteína es activa en la formación del intermediario ChvB-glucano (Zorreguieta et al., 1988, 1985b; Zorreguieta y Ugalde, 1986), se incubaron membranas internas con UDP- $[^{14}\text{C}]$ glucosa y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. La Figura 9A muestra la tinción con Coomassie Blue del gel, donde se aprecia que las preparaciones de membranas internas de cepas salvaje y mutantes tienen niveles similares de la proteína ChvB (la que migra muy cerca del marcador de peso molecular de 200kDa). En la Figura 9B y Tabla 4 se muestra que la acumulación de $[^{14}\text{C}]$ glucosa sobre la proteína ChvB de las cepas mutantes fue muy superior al de la cepa salvaje o mutantes complementadas. Luego del chase con UDP-glucosa 16 mM, el decrecimiento de radioactividad sobre el intermediario fue inferior en cepas

mutantes que en la salvaje o mutantes complementadas. Los experimentos de chase en las condiciones descritas previamente (20 min. de incubación con UDP-glucosa 2 mM; Zorreguieta et al., 1985b) no resultaron en una reducción de la marca en el intermediario ChvB-glucano de las mutantes *exoC*, sino en un aumento de más de 10 veces respecto de la cepa salvaje. Fue necesario una incubación de 90 min. con 16 mM UDP-glucosa para obtener los resultados mostrados anteriormente, los que indican que las mutantes *exoC* contienen la proteína de 235 kDa de membrana interna activa en la síntesis de glucano, aunque su comportamiento como intermediario presenta algunas diferencias con respecto a la de la cepa salvaje.

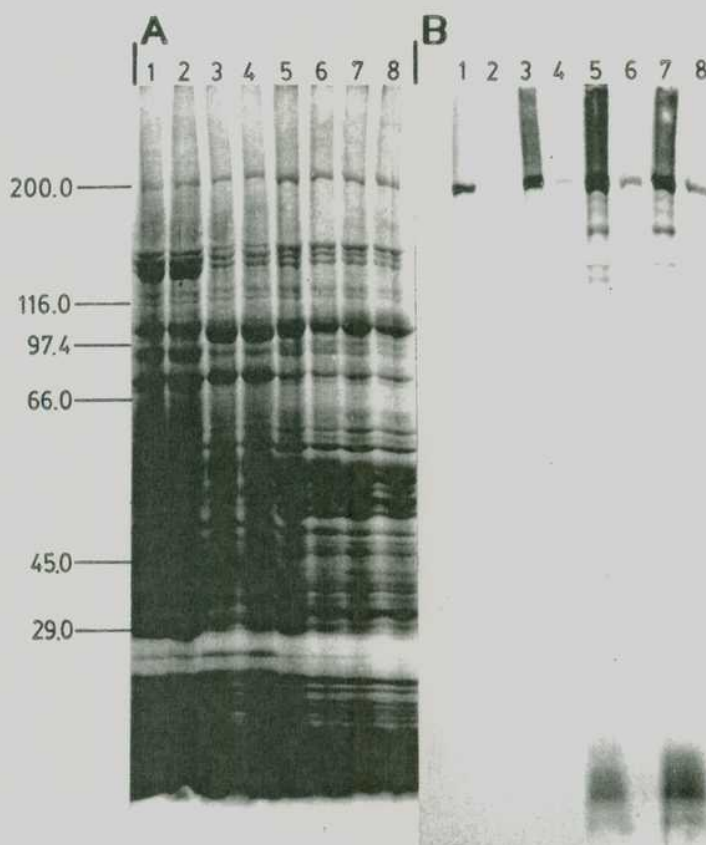


FIGURA 9: Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas de membrana interna de *A. tumefaciens*. Las membranas internas (200 ug de proteínas) fueron incubadas con UDP-¹⁴C]glucosa por 10 min. La reacción fue interrumpida por calentamiento, la mezcla fue lavada con ácido tricloroacético, y el precipitado fue sometido a una electroforesis según lo descrito por Zorreguieta y Ugalde (1986). Las proteínas fueron teñidas con Coomassie Blue (A), y la radioactividad fue detectada por fluorografía y autorradiografía (B). Los carriles 2, 4, 6 y 8 corresponden a experimentos de chase, en los que, luego de la incubación anterior de 10 min., se agregó UDP-glucosa a una concentración de 16 mM y se incubó 90 min. Carriles 1 y 2: cepa salvaje (A348); 3 y 4: cepa complementada [A5503(pFC6251)]; 5 y 6: cepa mutante *exoC* (A5503); 7 y 8: mutante *exoC* (A5129). Los números a la izquierda representan los pesos moleculares de los marcadores, en kDa.

Síntesis in vitro de UDP-glucosa: Como se ha demostrado anteriormente, las membranas de las mutantes *exoC* son capaces de sintetizar in vitro glucano $\beta(1-2)$ cíclico, cuando la mezcla de reacción se incuba con UDP-glucosa. La incapacidad de sintetizar glucano in vivo puede ser debida a algún defecto en la síntesis de UDP-glucosa. Para probar esta posibilidad, se incubaron extractos citosólicos con distintos substratos y se estudió la formación de UDP-glucosa; los productos fueron analizados por técnicas cromatográficas en papel. En la Figura 10 se muestra una cromatografía desarrollada con el solvente A, con los productos formados luego de la incubación de extractos citosólicos con los siguientes substratos:

- $[^{14}\text{C}]$ glucosa, glucosa 1,6 bifosfato, ATP y UTP (paneles A, D, G y J)
- $[^{14}\text{C}]$ glucosa 6-fosfato, glucosa 1,6 bifosfato y UTP (paneles B, E, H y K)
- $[^{14}\text{C}]$ glucosa 1-fosfato y UTP (paneles C, F, I y L)

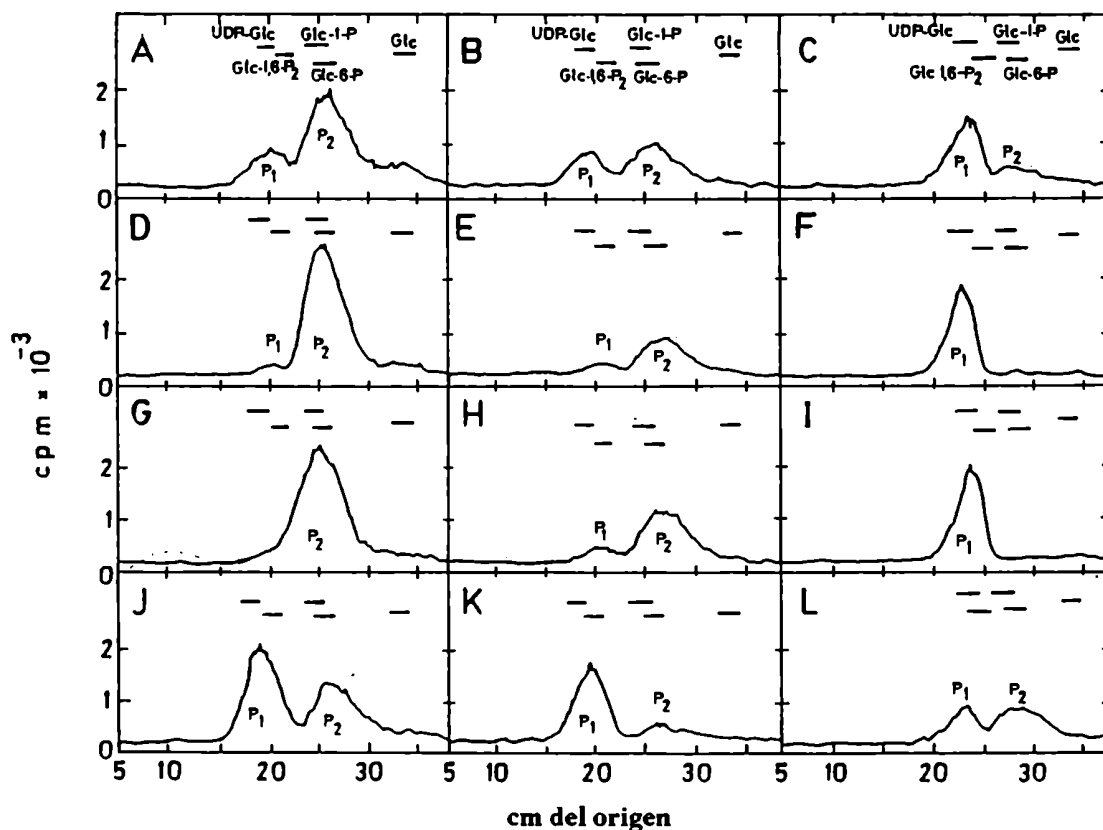


FIGURA 10: Síntesis in vitro de UDP-glucosa. El producto de las incubaciones con extractos citosólicos de la cepa salvaje A348 (paneles A, B y C), mutante *exoC* A5129 (paneles D, E y F), mutante *exoC* A5503 (paneles G, H e I) y de la cepa complementada A5129(pFC6251) (paneles J, K y L), incubados con los substratos: $[^{14}\text{C}]$ glucosa (paneles A, D, G y J), $[^{14}\text{C}]$ glucosa 6-fosfato, (paneles B, E, H y K) y $[^{14}\text{C}]$ glucosa 1-fosfato (paneles C, F, I y L), fueron sometidos a una cromatografía en papel con el solvente A. La radioactividad fue detectada con un radiocromatógrafo. En los paneles superiores se indica la movilidad de los estándares.

CAPITULO 2: CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS MUTACIONES *exoC*

Los compuestos con movilidad similar a UDP-glucosa y glucosa 1,6 bifosfato (P1 en la Figura 10) o glucosa monofosfato (P2), fueron eluidos y analizados según lo descrito en Materiales y Métodos. En la Tabla 5 se resumen los resultados.

TABLA 5: Productos formados in vitro por extractos citosólicos de *A.tumefaciens*.

Cepa	Substrato	Productos formados, en cpm x min ⁻¹ x mg ⁻¹ de proteínas. (%)					
		Fru1,6P2	Glc1,6P2	UDP-Glc	Fru6P	Glc6P	Glc1P
A348	Glc	49560(7,3)	34440(5,1)	77000(11,4)	139827(20,6)	323173(47,7)	54000(7,9)
	Glc6P	18473(5,3)	71193(20,7)	64667(18,8)	78887(22,9)	89313(25,9)	22200(6,4)
	Glc1P			302000(77,5)	20447(5,3)	36353(9,3)	17200(4,4)
A5129	Glc	22600(3,9)	<100	<100	169280(29,6)	380320(66,5)	<100
	Glc6P	26666(33,6)	<100	<100	24933(31,5)	27667(34,9)	<100
	Glc1P	<100	<100	302000(100)	<100	<100	<100
A5503	Glc	... ^a	... ^a	... ^a	191227(32,4)	398973(67,6)	<100
	Glc6P	51833(17,4)	<100	<100	87820(29,5)	158180(53,1)	<100
	Glc1P	ND	ND	307200(100)	<100	<100	<100
A5129 (pFC6251)	Glc	76307(9,4)	317027(39,0)	139833(17,2)	82547(10,1)	154653(19,0)	42800(5,3)
	Glc6P	26627(8,1)	228867(69,3)	12500(3,8)	29427(8,9)	21573(6,5)	11400(3,4)
	Glc1P			98200(40,0)	42820(17,4)	66980(27,3)	19800(8,1)
A5503 (pFC6251)	Glc	64800(8,3)	385200(49,2)	146333(18,7)	43740(5,6)	106060(13,5)	37200(4,7)
	Glc6P	28127(6,3)	327873(73,4)	215000(4,8)			13800(3,1)
	Glc1P			104400(45,8)	30273(13,3)	76327(33,4)	<100

^a: No determinado. La cantidad de hexosa bifosfato producida por A348, A5129 (pFC6251) y A5503 (pFC6251) con glucosa 1-fosfato como sustrato fue de 13600(3,5), 17600(7,2) y 17200(7,5), respectivamente. La cantidad de hexosa 6-fosfato producida por A5503(pFC6251) con glucosa 6-fosfato como sustrato fue 55600(12,4).

Como puede observarse, cuando se utilizó [¹⁴C]glucosa 1-fosfato como sustrato, todas las cepas sintetizaron UDP-glucosa; más aún, las mutantes *exoC* convirtieron totalmente el sustrato en UDP-glucosa. Con [¹⁴C]glucosa o [¹⁴C]glucosa 6-fosfato como sustrato, no se produjeron cantidades detectables de UDP-glucosa con las mutantes, pero se sintetizaron cantidades variables de fructosa 6-fosfato, glucosa 6-fosfato y fructosa 1,6-bifosfato. Con las cepas salvaje o mutantes complementadas, además de los compuestos anteriores se sintetizaron cantidades variables de glucosa 1-fosfato y glucosa 1,6-bifosfato.

CAPITULO 2: CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS MUTACIONES *exoC*

Estos resultados son consistentes con la ausencia de actividad fosfoglucomutasa (EC 2.7.5.1) en las mutantes *exoC* (ver Figura 11).

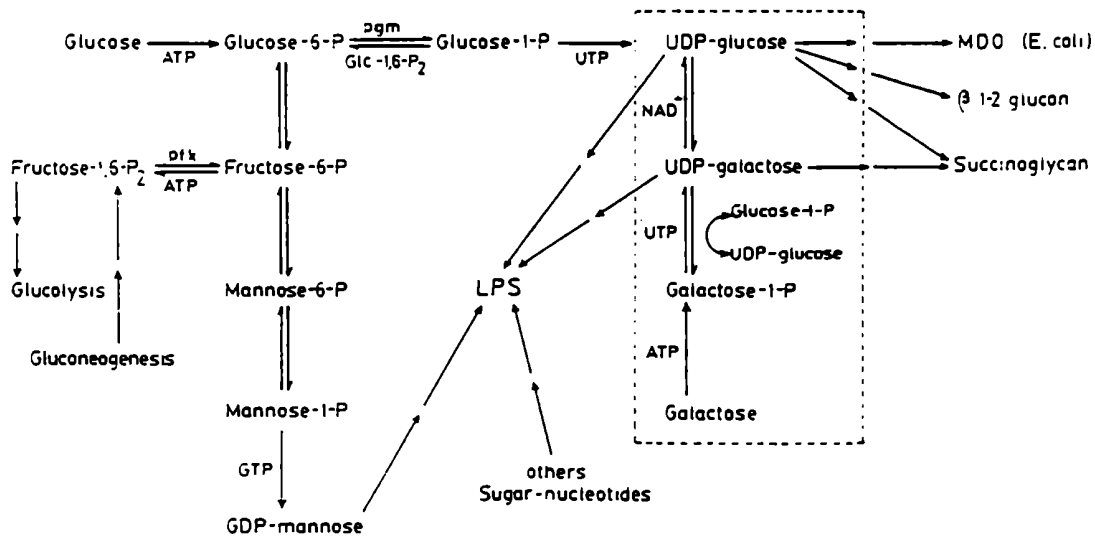


FIGURA 11: Metabolismo de los azúcares y nucleótidos azúcares. El recuadro punteado representa la vía de Leloir. Pgm, fosfoglucomutasa; Pfk, fosfofructoquinasa; LPS, lipopolisacárido; MDO, membrane-derived oligosaccharide; P, fosfato (tomado de Uttaro et al., 1990).

DISCUSION:

Se ha demostrado que mutantes *exoC* de *A. tumefaciens* son incapaces de sintetizar in vitro UDP-glucosa, utilizando glucosa o glucosa 6-fosfato como sustrato. Sin embargo, la síntesis de UDP-glucosa ocurre cuando se utiliza glucosa 1-fosfato. Estos resultados indican que en estas mutantes, la enzima fosfoglucomutasa (EC 2.7.5.1) es inactiva o no está presente (ver Figura 11). Esta enzima cataliza la reacción: glucosa 6-fosfato \leftrightarrow glucosa 1-fosfato, y ha sido purificada de diferentes fuentes, requiriendo glucosa 1,6-bisfosfato como cofactor (Joshi y Handler, 1964; Najjar, 1962; Ray y Peck, 1972). UDP-glucosa es un intermediario obligado en la síntesis de succinoglicano y glucano $\beta(1-2)$ cíclico, los que están ausentes en estas mutantes (Cangelosi et al., 1987; Leigh y Lee, 1988). En *R. meliloti*, las mutantes *exoC* son también defectivas en el componente sacarídico del lipopolisacárido (Leigh y Lee, 1988) que está formado por glucosa y galactosa, entre otros azúcares (Zevenhuizen et al., 1980). Presumiblemente, mutantes *exoC* de *A. tumefaciens* posean el mismo defecto, ya que su lipopolisacárido también está formado por estas hexosas (Salkinoja-Salonen y Boeck, 1978). La incapacidad de sintetizar UDP-glucosa, por la ausencia de la

actividad fosfoglucomutasa, explicaría el defecto en la síntesis de todos estos polisacáridos en las mutantes *exoC*. Por el momento, estos datos no indican si *exoC* es el gen estructural de la fosfoglucomutasa o si es un locus requerido para la expresión de esta enzima (ver Capítulo 5).

La imposibilidad de las mutantes *exoC* de *A.tumefaciens*, de unirse a las células de las plantas y formar tumores, es probablemente debido a la incapacidad de sintetizar glucano $\beta(1-2)$ cíclico (Cangelosi et al., 1987). Las membranas internas de estas mutantes sintetizan in vitro un glucano normal si se provee exogenamente de su sustrato (UDP-glucosa), lo que es consistente con que el único defecto de estas mutantes reside a nivel de la fosfoglucomutasa. Se han observado algunas diferencias entre las cepas salvaje y mutantes, en la síntesis in vitro del glucano y la acumulación de glucosa sobre la proteína intermediaria de 235 kDa. Fue necesario el agregado de altas concentraciones de UDP-glucosa e incubaciones prolongadas con membranas de las cepas mutantes, para la obtención de glucano $\beta(1-2)$. Más aún, la cantidad de radioactividad acumulada sobre la proteína intermediaria fue 10 veces superior en las cepas mutantes. Aunque la radioactividad descendió luego del chase con UDP-glucosa, la radioactividad remanente fue más de 10 veces superior en las membranas de las cepas mutantes. La más simple interpretación de estos resultados es que la proteína intermediaria de las mutantes están totalmente libres de cadenas nacientes de glucano por la carencia de UDP-glucosa endógeno. Cuando se agrega UDP- $[^{14}\text{C}]$ glucosa in vitro, la reacción de elongación procede normalmente, sin dilución isotópica, resultando en una mayor marcación de la proteína. Los resultados obtenidos luego de los experimentos de chase podrían ser explicados suponiendo que la porción más interna de la cadena de glucosas polimerizadas no es ciclada y liberada, permaneciendo sobre la proteína sin posibilidades de dilución isotópica. No puede descartarse el hecho de que el complejo encargado de la síntesis del glucano esté alterado en sus propiedades enzimáticas por estar insertado en una membrana interna que representa un ambiente anormal, por la carencia de una amplia gama de polisacáridos.

Es interesante notar que estas mutantes son inmóviles (Cangelosi et al., 1987), al igual que las mutantes *pgm* (fosfoglucomutasa) de *Bacillus licheniformis* (Fein, 1979). Las mutantes *chvB* de *A.tumefaciens* y *ndvB* de *R.meliloti*, que también son deficientes en la síntesis de glucano $\beta(1-2)$, son inmóviles (Douglas et al., 1985; Geremia et al., 1987), sugiriendo una relación directa de este oligosacárido con la movilidad.

El camino metabólico de la Figura 11 fue propuesto en *E.coli* y levaduras y aparenta ser parcialmente válido en *A.tumefaciens*. Como se verá luego, la vía de Leloir parece no ser funcional en esta especie (Capítulo 4). La vía de Entner-Doudoroff y el ciclo de las pentosas han sido propuestos como las rutas metabólicas utilizadas por *Agrobacterium* spp. para la utilización de la glucosa (Arthur et al., 1973; Vardanis y Hochster, 1961). Se ha propuesto que la vía de Embden-Meyerhof-Parnas no es funcional y que la enzima clave, fosfofructoquinasa (EC 2.7.1.11), es inactiva (Arthur et al., 1973) o tiene muy baja actividad (Vardanis y Hochster, 1961). Bajo nuestras condiciones de ensayo, hemos podido detectar la formación de fructosa 6-fosfato y fructosa 1,6-bifosfato, indicando la presencia de esta enzima.

CAPITULO 3

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS MUTACIONES *exoB*

RESUMEN: Las mutantes *exoB* de *A.tumefaciens* y *R.meliloti* sintetizan glucano $\beta(1-2)$ cíclico normalmente, pero no sintetizan succinoglicano. En *R.meliloti*, ha sido descrito que estas mutantes sintetizan un lipopolisacárido anormal. Las mutantes *exoB* tienen un fenotipo no infectivo para *R.meliloti*, pero en *A.tumefaciens*, la virulencia no se ve afectada. Estas mutantes no presentan UDP-galactosa endógeno detectable. Células permeabilizadas de las cepas mutantes son capaces de formar in vitro lípido-azúcares intermediarios de la síntesis de succinoglicano, mostrando un requerimiento estricto del agregado exógeno de UDP-galactosa. Ensayos in vitro han demostrado la ausencia de la actividad UDP-glucosa 4-epimerasa (EC 5.1.3.2), enzima que convierte UDP-glucosa en UDP-galactosa, un intermediario directo en la síntesis de polímeros que contienen galactosa, como el succinoglicano y lipopolisacárido.

INTRODUCCION:

Las mutantes *exoB* son defectivas en la síntesis de polisacáridos que contienen galactosa, como EPS II y lipopolisacárido en *R.meliloti* y succinoglicano o EPS I en *A.tumefaciens* y *R.meliloti*, pero la síntesis de glucano $\beta(1-2)$ cíclico no se ve afectada (Cangelosi et al., 1987; Glazebrook y Walker, 1989; Leigh y Lee, 1988; Zhan et al., 1989), lo que justifica el fenotipo virulento de las mutantes *exoB* de *A.tumefaciens*. El EPS I es sintetizado por la polimerización de una unidad repetitiva formada por glucosa y galactosa en la proporción 7:1, la que se sintetiza sobre un intermediario lipídico (undecaprenol-fosfato) por transferencia de galactosa 1-fosfato desde UDP-galactosa, y el agregado sucesivo de las restantes glucosas desde UDP-glucosa (Staneloni et al., 1984; Tolmasky et al., 1982).

La UDP-galactosa es sintetizada a partir de UDP-glucosa, por acción de la enzima UDP-glucosa 4-epimerasa que, en otras especies, forma parte del camino de Leloir, perteneciendo al operón galactosa (Maxwell et al., 1962).

Los resultados aquí expuestos, demuestran que la inactividad de esta enzima en las mutantes *exoB*, justifica la ausencia del intermediario UDP-galactosa, necesario para la biosíntesis de estos polisacáridos.

RESULTADOS

Síntesis in vitro de lípido-azúcares intermediarios: La incapacidad de las mutantes *exoB* de sintetizar succinoglicano puede ser la consecuencia de un bloqueo en la transferencia de galactosa desde UDP-galactosa, o a un paso previo. Para distinguir entre estas posibilidades, se ensayó la capacidad de células permeabilizadas de cepas mutantes, de sintetizar in vitro los lípido-azúcares intermediarios de este polisacárido. Incubando células permeabilizadas con nucleótido-azúcares radioactivos, los lípido-azúcares marcados resultantes pueden ser extraídos con solventes orgánicos (Staneloni et al., 1984; Tolmasky et al., 1980, 1982). Los resultados obtenidos con células permeabilizadas de cepas salvaje y mutantes *exoB* de *A.tumefaciens* incubadas con UDP-[¹⁴C]glucosa o UDP-[¹⁴C]galactosa son mostrados en la Tabla 6.

TABLA 6: Formación in vitro de lípido-azúcares extraíbles en solventes orgánicos.

Cepa	Substrato	Producto (cpm/mg de proteínas, en extractos 1103)
A348	UDP-[¹⁴ C]glucosa	19205
	UDP-[¹⁴ C]galactosa	10170
	UDP-[¹⁴ C]glucosa + UDP-galactosa	10561
A5094	UDP-[¹⁴ C]glucosa	1851
	UDP-[¹⁴ C]galactosa	22893
	UDP-[¹⁴ C]glucosa + UDP-galactosa	46562
A5129	UDP-[¹⁴ C]glucosa	2322
	UDP-[¹⁴ C]galactosa	27510
	UDP-[¹⁴ C]glucosa + UDP-galactosa	44676

Cuando se utilizó UDP-[¹⁴C]glucosa como único sustrato, solo las células permeabilizadas de la cepa salvaje sintetizaron cantidades significativas de lípido-azúcares extraíbles. Fue necesario el agregado de UDP-galactosa o la incubación con UDP-[¹⁴C]galactosa cuando se utilizaron células permeabilizadas de las mutantes. En este caso las mutantes incorporaron de 2 a 5 veces más radioactividad que las cepas salvajes. Para confirmar que las sustancias extraídas con los solventes orgánicos estaban relacionados con los lípido-azúcares intermediarios en la síntesis de succinoglicano, 10.000 cpm de cada extracto fueron sometidos a una hidrólisis ácida suave, con el fin de liberar la parte sacarídica del intermediario lipídico. El

producto de la hidrólisis fue sometido a una cromatografía en capa delgada (TLC) con el solvente E (Figura 12). Las mutantes *exoB* incubadas con UDP-[¹⁴C]glucosa incorporaron trazas de radioactividad con movilidad similar a un octasacárido en TLC (Figura 12, carriles 3 y 6), formando bandas compactas como las descritas por Tolmasky et al. (1982) para compuestos fosforilados. Este compuesto fue eluido y sometido a una cromatografía en columna de Bio Gel P2, y aunque no pudo ser identificado, presentó una movilidad similar a un monosacárido. Con células mutantes y UDP-[¹⁴C]galactosa como sustrato, se detectó [¹⁴C]galactosa y trazas de otros oligosacáridos (Figura 12, carriles 4 y 7). Las células permeabilizadas de la cepa salvaje incubadas con UDP-[¹⁴C]glucosa o UDP-[¹⁴C]galactosa (Figura 12, carriles 1 y 2) o cepas mutantes incubadas con UDP-[¹⁴C]glucosa suplementado con UDP-galactosa (Figura 12, carriles 5 y 8) produjeron lípido-oligosacáridos similares. Estos productos fueron similares a los descritos previamente como intermediarios en la síntesis de succinoglicano en *A.tumefaciens* y *R.meliloti* (Staneloni et al., 1984; Tolmasky et al., 1980, 1982).

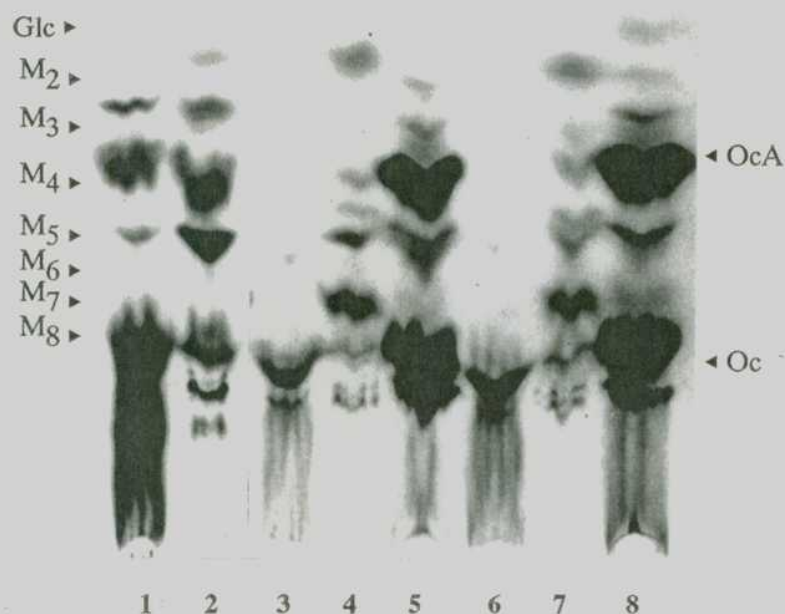


FIGURA 12: Identificación de los lípido-azúcares extraídos en la fracción 1103. 10000 cpm de cada extracto orgánico, fue hidrolizado con HCl 10mM 10 min. a 100°C. Los compuestos solubles en agua resultantes se cromatografiaron en una placa de sílica-gel con el solvente E y detectados por autoradiografía. M_x indica el grado de polimerización de los maltooligosacáridos utilizados como estándares. Glc, glucosa. Oc, octasacárido. OcA, octasacárido acilado. Las células permeabilizadas fueron incubadas con UDP-[¹⁴C]glucosa (carriles 1, 3 y 6), UDP-[¹⁴C]galactosa (carriles 2, 4 y 7) o UDP-[¹⁴C]glucosa y 1mM de UDP-galactosa (carriles 5 y 8). Cepa salvaje A348: carriles 1 y 2); mutantes *exoB* A5094: carriles 3, 4 y 5, y A5126: carriles 6, 7 y 8.

Los compuestos con la movilidad esperada para el octasacárido o el octasacárido sustituido por un resto acilo, fueron eluidos de la TLC y sometidos a una cromatografía en columna de Bio Gel P2. En la Figura 13 se muestra el perfil de elución de los octasacáridos de la mutante A5126 incubada con UDP-[¹⁴C]glucosa y UDP-galactosa. Perfiles similares fueron obtenidos con la mutante A5094 y la cepa salvaje.

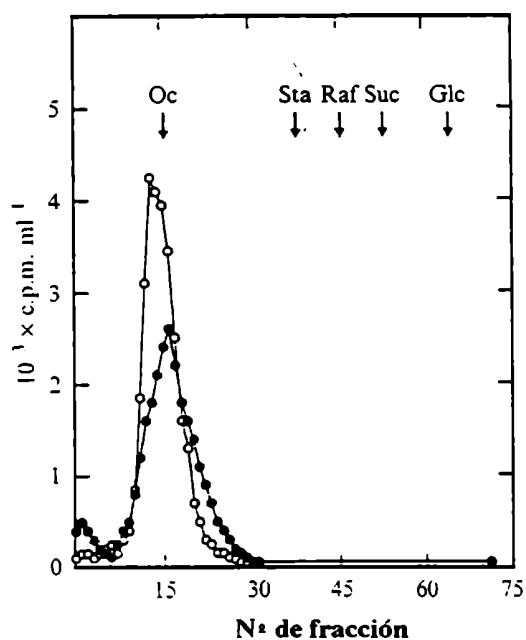


FIGURA 13: Cromatografía en Bio Gel P2. Los productos con movilidad similar al octasacárido (●) u octasacárido acilado (○) producido por la cepa A5126 fueron eluidos de la TLC (Figura 12), sembrados en una columna de 1,2 x 100 cm y eluidos con 0,1 M acetato de piridina (pH 5,5). Las flechas indican los volúmenes de elución de los estándares: Glc, glucosa; Suc, sacarosa; Raf, rafinosa; Sta, estaquirosa; Oc, octasacárido de *A.tumefaciens* (Staneloni et al., 1984).

Estos resultados indican que las cepas salvaje y mutantes sintetizan in vitro intermediarios lipídicos del succinoglicano, cuando se las provee de nucleótido-azúcares. Fue observado un requerimiento estricto por UDP-galactosa en las mutantes *exoB*. Estos resultados también confirman que la iniciación de la síntesis del lípido-octasacárido ocurre con la transferencia de galactosa (Staneloni et al., 1984; Tolmasky et al., 1982).

Contenido in vivo de nucleótido-azúcares: Los resultados anteriores pueden deberse a la incapacidad de las mutantes *exoB* de sintetizar UDP-galactosa. Para demostrar esta hipótesis, se analizó el contenido endógeno de nucleótido-azúcares de las cepas salvaje y mutantes *exoB* y *exoC*.

Las células fueron extraídas con ácido fórmico y los extractos sometidos a una cromatografía de alta presión (HPLC) según lo descrito en materiales y métodos. Como se muestra en la Figura 14, en los extractos de la cepa salvaje pudo identificarse la presencia de UDP-glucosa, UDP-galactosa, GDP-manosa, UDP-galacturonato y UDP-glucuronato. En las mutantes *exoB* pudo identificarse la presencia de los mismos compuestos salvo UDP-galactosa. En las mutantes *exoC* solo se detectó la presencia de GDP-manosa, lo cual confirma la caracterización de las mismas como deficientes en UDP-glucosa (ver Figura 11 en Capítulo 2).

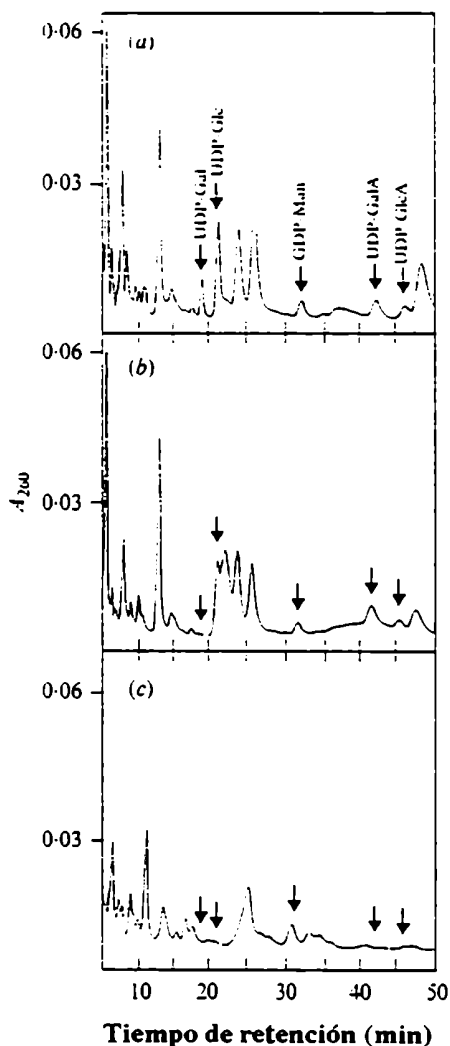


FIGURA 14: Contenido endógeno de nucleótido-azúcares. HPLC de los extractos fórmicos de las cepas salvaje A348 (panel A), mutante *exoB* A5126 (panel B) y mutante *exoC* A5129 (panel C). Las flechas indican los tiempos de retención de los estándares.

Síntesis in vitro de UDP-galactosa: La carencia de UDP-galactosa puede ser debida a la ausencia de la actividad UDP-glucosa 4-epimerasa, enzima que convierte reversiblemente UDP-glucosa en UDP-galactosa. Para probar esta posibilidad, se incubaron extractos citosólicos de las cepas salvajes y mutantes *exoB* de

CAPITULO 3: CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS MUTACIONES *exoB*

A.tumefaciens y *R.meliloti* con UDP-[¹⁴C]glucosa o UDP-[¹⁴C]galactosa como sustratos, y los productos fueron analizados por técnicas cromatográficas. En la Tabla 7 se resumen los resultados.

TABLA 7: Determinación in vitro de la epimerización de nucleótido-azúcares.

Cepa	Sustrato	Productos (cpm)		UDP-glucosa/ UDP-galactosa
		UDP-glucosa	UDP-galactosa	
A348	UDP-glucosa	109680	35360	3,1 2,9
	UDP-galactosa	98500	33560	
A5094	UDP-glucosa	151800	<100	
	UDP-galactosa	<100	102450	
A5126	UDP-glucosa	165230	<100	
	UDP-galactosa	<100	100050	
Rm1021	UDP-glucosa	95777	34306	2,8 2,7
	UDP-galactosa	89229	32503	
Rm7094	UDP-glucosa	119090	<100	-- --
	UDP-galactosa	<100	98731	

Las cepas salvajes produjeron UDP-glucosa y UDP-galactosa en una relación de 3:1, similar a los valores que se alcanzan en el equilibrio de la reacción de epimerización descrito para *E.coli*, levadura o mamíferos (Maxwell et al., 1962; Wilson y Hogness, 1964). Con extractos de las cepas mutantes A5094 y A5126 de *A.tumefaciens* y Rm 7094 de *R.meliloti*, no se detectó la formación de epímeros con ninguno de los sustratos, indicando que el defecto de las mutaciones *exoB* reside sobre la enzima UDP-glucosa 4-epimerasa.

DISCUSION

Extractos citosólicos de las mutantes *exoB* de *A.tumefaciens* no contienen cantidades detectables de UDP-galactosa. Se ha determinado en mutantes *exoB* de *A.tumefaciens* y *R.meliloti* que este defecto se debe a la ausencia de actividad UDP-glucosa 4-epimerasa, enzima que convierte reversiblemente UDP-glucosa en UDP-galactosa. Este defecto justifica la incapacidad de ambas especies de sintetizar polisacáridos que contienen galactosa.

Estos resultados fueron confirmados posteriormente, por Canter-Cremers et al. (1990) y Buendia et al. (1991), quienes caracterizaron las mutantes *exoB* de *R.leguminosarum* y *R.meliloti*, respectivamente. Estos últimos autores secuenciaron el locus *exoB* de *R.meliloti*, encontrando una gran homología con el gen *galE* de *E.coli*, que codifica para la enzima UDP-glucosa 4-epimerasa. Esto confirma que las mutaciones *exoB* residen en el gen estructural de la enzima.

Del contenido endógeno de nucleótido-azúcares de la cepa salvaje, se ha podido detectar la presencia de UDP-glucosa, UDP-galactosa, GDP-manosa, UDP-galacturonato y UDP-glucuronato. En mutantes *exoB*, todos estos compuestos están presentes, con la sola excepción de UDP-galactosa, mientras que en mutantes *exoC*, solo se detectó GDP-manosa (ver Figura 11, Capítulo 2). Estos resultados son consistentes con la síntesis de UDP-glucuronato y UDP-galacturonato por oxidación de UDP-glucosa y una posterior epimerización a UDP-galacturonato por acción de la enzima UDP-glucuronato 4-epimerasa. Esta actividad fue detectada en *R.meliloti* (Ugalde et al., 1986). La secuencia de reacciones sería la siguiente:



La síntesis *in vitro* de los lípido-azúcares intermediarios en la síntesis de succinoglicano transcurre normalmente en células permeabilizadas de mutantes *exoB*, pero con el requerimiento estricto de UDP-galactosa, confirmando lo descrito por Tolmasky et al. (1982), quienes reportaron que el primer paso en la síntesis de estos intermediarios era la transferencia de galactosa 1-fosfato desde UDP-galactosa al lípido monofosfato. El contenido endógeno de UDP-glucosa justificaría las trazas de intermediarios detectados en incubaciones con células de mutantes *exoB* y UDP-[¹⁴C]galactosa (Figura 12, carriles 4 y 7).

CAPITULO 4

METABOLISMO DE LA GALACTOSA EN *Agrobacterium tumefaciens*

RESUMEN: Las mutantes *exoC* y *exoB* de *A.tumefaciens* y *R.meliloti*, crecen con galactosa como única fuente de carbono, o con galactosa y glucosa, sin que se observe la restitución de la capacidad de sintetizar polisacáridos. Estos resultados son incompatibles con la existencia en estas especies, de la vía de Leloir. Los estudios realizados demuestran que esta vía está ausente en *A.tumefaciens* y *R.meliloti*. Ambas especies carecen de las actividades enzimáticas galactoquinasa (EC 2.7.1.6) y galactosa 1-fosfato uridililtransferasa (EC 2.7.7.10). En *A.tumefaciens* se ha detectado la existencia de la vía oxidativa de DeLey-Doudoroff, para la metabolización de la galactosa. Esta ruta no es constitutiva, y su expresión requiere la inducción con D-galactosa o L-arabinosa. La actividad de la UDP-glucosa 4-epimerasa es constitutiva y no requiere de galactosa para su expresión.

INTRODUCCION:

La galactosa es metabolizada en la mayoría de las especies por la vía de Leloir, que se conecta con la vía glucolítica utilizando UDP-galactosa y UDP-glucosa como intermediarios. Las enzimas involucradas son inducibles por crecimiento con galactosa (Gabriel, 1987; Maxwell et al., 1962). DeLey y Doudoroff (1957) describieron que en *Pseudomonas saccharophila*, donde la vía de Leloir está ausente, la galactosa es metabolizada por una vía oxidativa que genera ácido pirúvico y gliceraldehído 3-fosfato (ver Figuras 7 y 17). Arias y Cerveñansky (1986) identificaron por métodos espectrofotométricos la existencia de esta vía en *R.meliloti*.

En este capítulo se muestran evidencias de la ausencia del camino de Leloir en *A.tumefaciens* y la identificación de una vía oxidativa similar a la de DeLey-Doudoroff.

RESULTADOS:

Crecimiento de las mutantes *exoC* y *exoB* con galactosa como única fuente de carbono: Las mutaciones *exoC* fueron caracterizadas como deficientes en la actividad fosfoglucomutasa (Capítulo 2), y las mutaciones *exoB* como carentes de la actividad UDP-glucosa 4-epimerasa (Capítulo 3). Estas mutaciones deberían impedir el uso de la galactosa como fuente de carbono, ya que estarían aislando la vía de Leloir de la ruta glucolítica. Sin embargo, el crecimiento sobre galactosa y otra fuente de carbono simultáneamente, debería restaurar la capacidad de sintetizar UDP-glucosa y UDP-galactosa, y por lo tanto de succinoglicano y glucano $\beta(1-2)$ cíclico (ver Figura 11, Capítulo 2 o Figura 17). Para probar esta posibilidad, se crecieron mutantes *exoC* y *exoB* de *A.tumefaciens* y *R.meliloti* en medios mínimos con glucosa (0,2%) y galactosa (0,2%) como fuentes de carbono. En ningún caso se detectó la presencia de glucano celular o succinoglicano en el medio de cultivo, aunque el crecimiento fue normal. Más aún, cuando estas mutantes fueron crecidas sobre placas de medio rico Luria-Cellufluor, suplementadas con galactosa (0,2%), ninguna recuperó el fenotipo brillante que delata la síntesis de exopolisacárido, aunque el crecimiento fue mayor. Las cepas salvajes y mutantes crecieron en medio mínimo con galactosa o glucosa como única fuente de carbono a igual ritmo. En cualquiera de las condiciones, sólo las cepas salvajes sintetizaron glucano $\beta(1-2)$ cíclico (5 mg/g de células húmedas). Estos resultados indican que el camino de Leloir está ausente en estas especies y que existe una vía alternativa para la metabolización de la galactosa.

Ensayo de las actividades galactoquinasa y galactosa 1-fosfato uridililtransferasa: Para confirmar la ausencia de la vía de Leloir (Figura 17), se obtuvieron extractos citosólicos de las cepas salvajes de *A.tumefaciens* (A348), *R.meliloti* (Rm1021) y *E.coli* (Y1090) crecidas en medios mínimos con galactosa como única fuente de carbono. Estos extractos fueron incubados con [^{14}C]galactosa, ATP, UTP y UDP-glucosa como sustratos, y los productos fueron analizados por técnicas cromatográficas, según lo descrito en materiales y métodos. En estas condiciones, la [^{14}C]galactosa fue totalmente convertida en UDP-glucosa y UDP-galactosa por extractos de *E.coli*. Sin embargo los extractos de *A.tumefaciens* y *R.meliloti* no produjeron cantidades detectables de nucleótido-azúcares o azúcares-fosfato (ver Tabla 8). Parte de la galactosa fue convertida en un compuesto cargado negativamente que fue identificado como ác. galactónico, por su movilidad en cromatografías con los solventes A y D, y electroforesis con el buffer B.

TABLA 8: Actividad galactoquinasa

Cepas ^b	Productos (%) ^a		
	UDP-glc	UDPgal	ác. galactónico
<i>E.coli</i>	79	21	ND
<i>A.tumefaciens</i>	ND	ND	30
<i>R.meliloti</i>	ND	ND	13

a: % de radioactividad recuperada en cada producto. b: Cepas salvajes crecidas sobre medio mínimo con galactosa (0,2%) como única fuente de carbono.
 ND: No detectado (< 100 cpm).

En incubaciones con [¹⁴C]galactosa 1-fosfato, UTP y UDPglucosa, solo los extractos citosólicos de *E.coli* convirtieron totalmente la radioactividad en UDP-glucosa (82%) y UDP-galactosa (18%). *R.meliloti* y *A.tumefaciens* no presentaron actividad alguna sobre el sustrato. Estos resultados indican que, en estas dos especies, las dos primeras enzimas del camino de Leloir (galactoquinasa y galactosa 1-fosfato uridililtransferasa) están ausentes.

Metabolismo oxidativo de la galactosa: En las incubaciones anteriores, el sustrato ([¹⁴C]galactosa) era transformado en un 30% en un compuesto que fue identificado como ácido galactónico. En incubaciones posteriores con extractos citosólicos de *A.tumefaciens* y los sustratos NAD⁺ y [1-¹⁴C]galactosa se observó, en una hora, la conversión total de la radioactividad en ácido galactónico y un compuesto con una movilidad similar a ácido 2-ceto glucónico (2-ceto hexónico o compuesto 3) sugiriendo la existencia de una vía oxidativa para el metabolismo de la galactosa.

En la Figura 15 se muestran las electroforesis en papel con el buffer B de los productos formados en las incubaciones de extractos citosólicos de *A.tumefaciens* (crecido con galactosa) con [1-¹⁴C]galactosa, con el agregado de distintos sustratos requeridos en la vía de DeLey-Doudoroff. Como se observa en la Figura 15A, sin el agregado de NAD⁺, se produce una conversión del 40% de la galactosa en ácido galactónico (compuesto 2) y ácido 2-ceto hexónico (compuesto 3), probablemente por el contenido endógeno de NAD⁺. El agregado de NAD⁺ (o NADP⁺) a la

por el contenido endógeno de NAD^+ . El agregado de NAD^+ (o NADP^+) a la mezcla de incubación produce la total conversión de la galactosa en estos dos productos, y es evidente la aparición de pequeñas cantidades de un cuarto compuesto (C4) de mayor movilidad (Figura 15B). El agregado de NAD^+ y ATP desplaza la reacción hacia la formación del compuesto 4 y ácido pirúvico (Figura 15C). El compuesto 4, sometido al tratamiento con fosfatasa alcalina, adquiere la movilidad del compuesto 3 (ác. 2-ceto hexónico), indicando que se trataría de un ác. 2-ceto fosfo hexónico. Los picos correspondientes a los compuestos neutros fueron analizados, conteniendo galactosa (>90%) y galactonolactona (Fig. 15A) o galactonolactona (Fig. 15B y C).

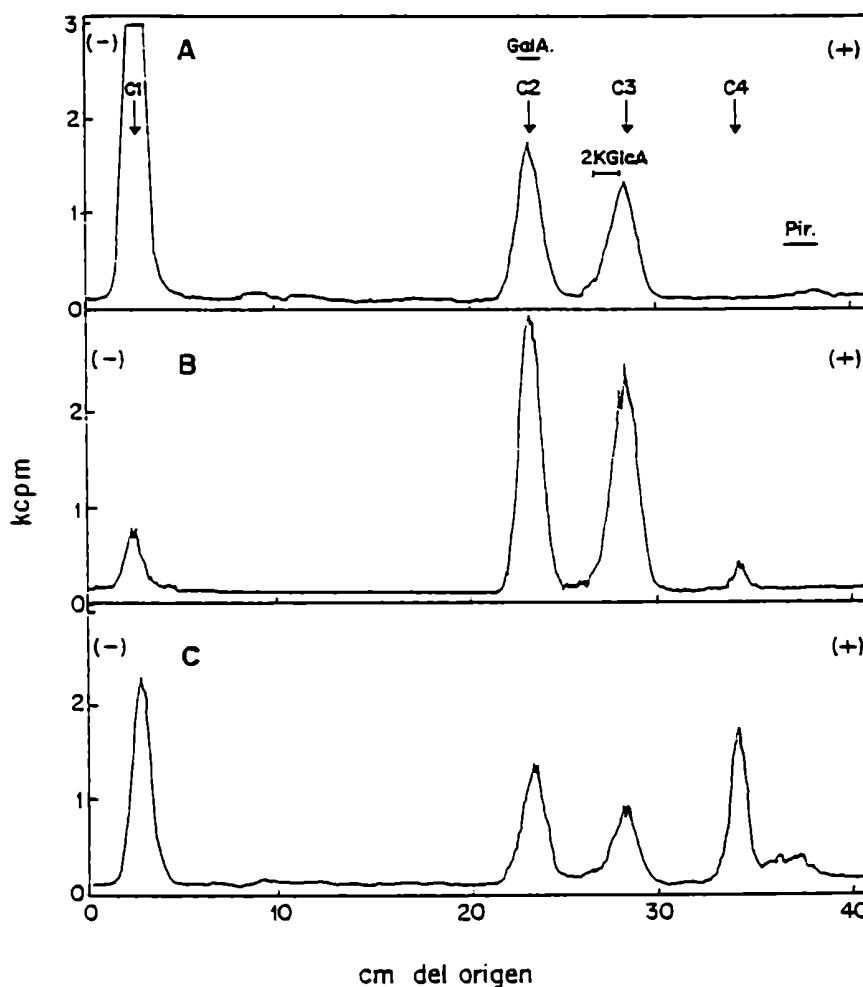


FIGURA 15: Electroforesis de los productos formados luego de las incubaciones de extractos citosólicos de *A. tumefaciens* A348 (crecido con galactosa) con $[1-^{14}\text{C}]$ galactosa (A), $[1-^{14}\text{C}]$ galactosa + NAD^+ (B), o $[1-^{14}\text{C}]$ galactosa + NAD^+ + ATP (C). Las reacciones se incubaron durante una hora a 30°C y se sometieron a una electroforesis en papel con el buffer B. GalA: ác. galactónico; 2kGlcA: ác. 2-ceto glucónico. Pir: ác. pirúvico. Las flechas indican la movilidad de los compuestos C1 a C4.

En la Figura 16 se muestra que incubaciones que contienen $[1-^{14}\text{C}]$ galactosa, NAD^+ y ATP, acumulan en función del tiempo, compuestos de mayor movilidad, identificados como galactonolactona (en C1), ác. galactónico (C2), ác. 2-ceto hexónico (C3), ác. 2-ceto fosfohexónico (C4) y ác. pirúvico (Pir).

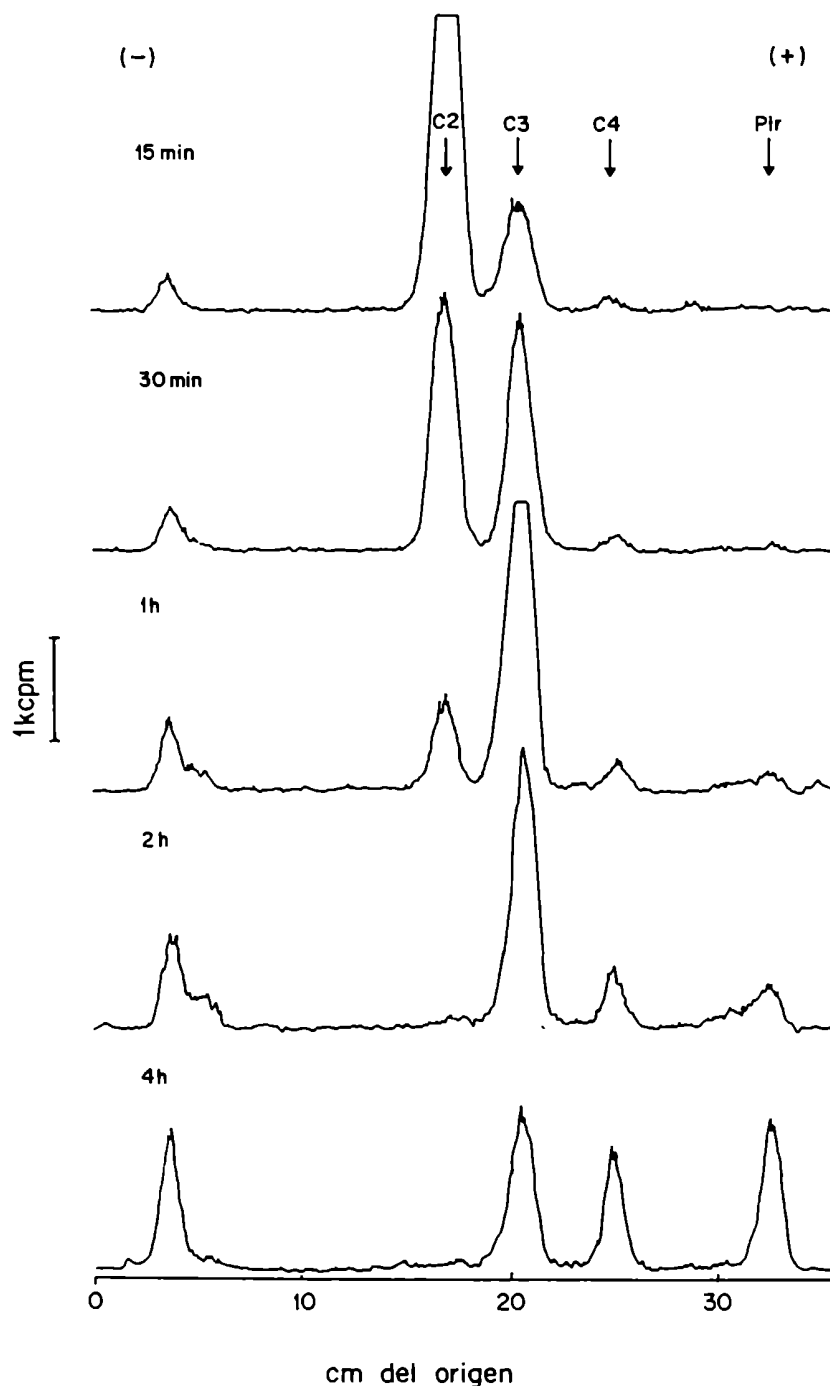
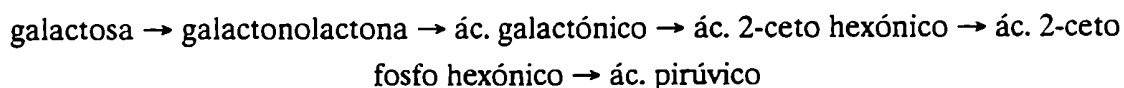


FIGURA 16: Evolución de los productos de reacción en función del tiempo. Las incubaciones de extractos citosólicos de *A. tumefaciens* A348 (crecido con galactosa) con $[1-^{14}\text{C}]$ galactosa, NAD^+ y ATP, se sometieron a una electroforesis como la indicada en la Figura 15.

Estos datos, tomados en conjunto, indicarían que la secuencia de reacciones para la metabolización de la galactosa en *A.tumefaciens*, sería la siguiente:



Las actividades galactosa dehidrogenasa (EC 1.1.1.48) y galactonato dehidratasa (EC 4.2.1.6) fueron cuantificadas espectrofotométricamente como se describe en materiales y métodos, en extractos citosólicos de *A.tumefaciens* crecido en medios mínimos con D-glucosa, D-galactosa o L-arabinosa como fuentes de carbono. Como se muestra en la Tabla 8, estas enzimas fueron inducibles por L-arabinosa y D-galactosa, tal como ha sido descrito en otras especies (DeLey y Doudoroff, 1957; Arias y Cerveñansky, 1986). También se ensayó la inducibilidad de la UDP-glucosa 4-epimerasa, comprobándose que esta enzima es constitutiva, no obteniéndose diferencias de actividad significativas con las distintas fuentes de carbono (Tabla 8).

TABLA 9:

Fuente de carbono	Actividad enzimática (nmoles de producto x min ⁻¹ x mg ⁻¹ de proteínas)		
	UDP-glucosa 4-epimerasa	galactosa dehidrogenasa	galactonato dehidratasa
D-glucosa	2,1	0	2
D-galactosa	2,0	8,1	35
L-arabinosa	2,6	9,6	16

La actividad 6-fosfo 2-ceto 3-deoxigalactonato aldolasa, que transforma reversiblemente 6-fosfo 2-ceto 3-deoxigalactonato en piruvato y gliceraldehido 3-fosfato, fue ensayada por un método indirecto que mide la aparición de piruvato a partir de galactonato y ATP, por la no disponibilidad comercial del sustrato. Los extractos de células crecidas con D-galactosa y L-arabinosa produjeron 14 y 13 nmoles de piruvato x min⁻¹ x mg⁻¹ de proteínas, respectivamente. No se observó

producción de piruvato en extractos de células crecidas en D-glucosa o en ensayos sin el agregado de ATP. Los datos presentados en los Capítulos 3 y 4, permiten modificar la Figura 11 (Capítulo 2) según lo descrito en la Figura 17, que describe el metabolismo de azúcares y nucleótido-azúcares en *A.tumefaciens* y *R.meliloti*.

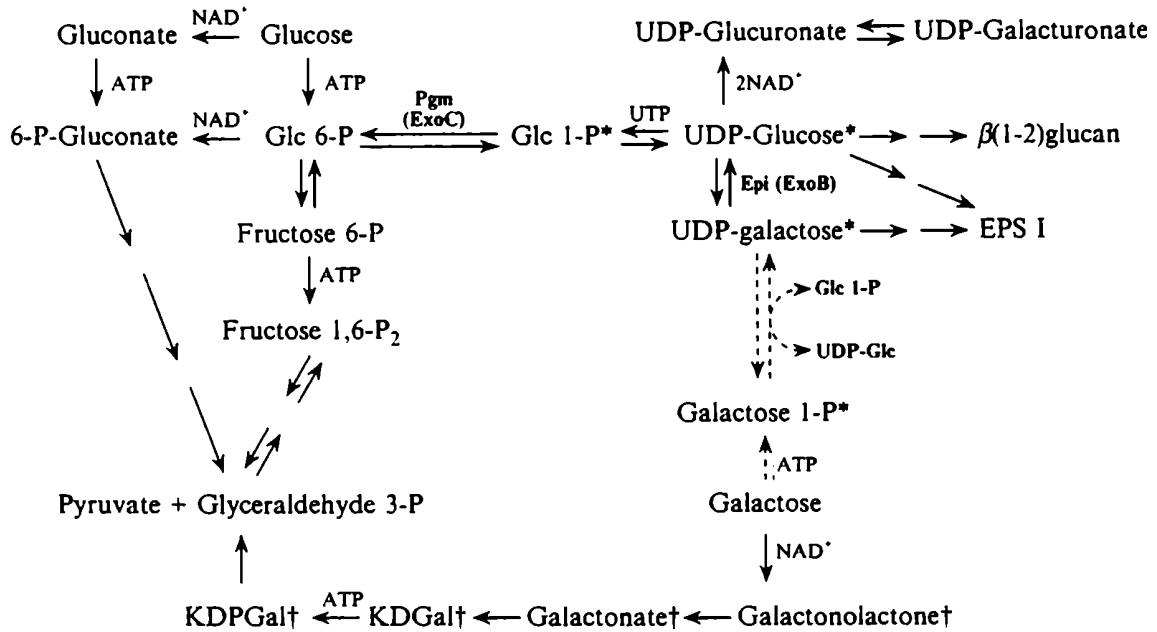


FIGURA 17: Metabolismo de azúcares y nucleótido-azúcares en *Rhizobiaceae*. Pgm: fosfoglucomutasa, Epi: UDP-glucosa 4-epimerasa. *: intermediarios del camino de Leloir, †: intermediarios del camino de DeLey-Doudoroff, Glc: glucosa, KDGal: 2-ceto 3-deoxigalactonato, KDPGal: 2-ceto 3-deoxi 6-fosfogalactonato, P: fosfato. En líneas de punto se indica la vía ausente (tomado de Uttaro et al., 1993).

DISCUSION:

Las mutantes *exoC* y *exoB* de *A.tumefaciens* y *R.meliloti*, crecen con galactosa como única fuente de carbono, o con galactosa y glucosa, sin que se restituya la capacidad de sintetizar polisacáridos, indicando que la vía de Leloir no existe en estas especies. Esto fue confirmado al comprobar la carencia de las dos primeras enzimas de esta vía, la galactoquinasa y la galactosa 1-fosfato uridililtransferasa. Se detectó la existencia de una vía oxidativa para el catabolismo de la galactosa en *A.tumefaciens*. DeLey y Doudoroff (1957) describieron una vía similar en *P.saccharophila* que fue detectada en *R.meliloti* por Arias y Cerveñansky (1986). Si bien la identificación de esta vía no fue completa, por carecer del estándar correspondiente al intermediario

2-ceto 3-deoxigalactonato, se puede concluir que *A.tumefaciens* posee la vía de DeLey-Doudoroff según los siguientes argumentos:

- a) Tanto en *A.tumefaciens* como en *P.saccharophila* y *R.meliloti* esta vía es inducible por D-galactosa y por el inductor gratuito L-arabinosa.
- b) Los perfiles electroforéticos de las incubaciones realizadas con extractos citosólicos de *R.meliloti* presentan compuestos con movilidades similares a los de *A.tumefaciens*.
- c) Se ha obtenido ác. galactónico y un ác. 2-ceto hexónico (ác. 2-ceto galactónico o ác 2-ceto 3-deoxigalactónico) como intermediarios.
- d) El ác. 2-ceto hexónico es fosforilado y convertido en ác.pirúvico y, probablemente en gliceraldehido 3-fosfato. Este compuesto no fue detectado porque se utilizó galactosa con marca en carbono 1, que formará parte de la molécula de ác.pirúvico.
- e) La formación de ác. pirúvico sólo puede llevarse a cabo a partir de la aldolización de un 2-ceto 3-deoxiácido.

En bacterias que poseen el camino de Leloir, la enzima UDP-glucosa 4-epimerasa está codificada en el operón galactosa, cuya expresión es inducida por D-galactosa. En *A.tumefaciens*, esta enzima es constitutiva y su expresión no se ve alterada por la fuente de carbono.

La carencia del camino de Leloir parece ser un hecho común en bacterias del suelo. Recientemente, Canter-Cremers et al. (1990) detectaron su ausencia, y la presencia de la ruta de DeLey-Doudoroff en *R.leguminosarum* (ver también Ronson y Primrose, 1979). Datos preliminares indicarían la presencia de esta ruta en *Azospirillum brasilense*.

CAPITULO 5

CARACTERIZACION GENETICA DE LAS MUTACIONES *exoC*

RESUMEN: Se ha clonado y secuenciado una región de DNA cromosomal de *A.tumefaciens* que complementa las mutaciones *exoC* (*pgm*). El análisis de esta secuencia reveló la existencia de tres marcos de lectura abiertos (ORFs) orientados en la misma dirección, involucrados en la síntesis de glucógeno y otros polisacáridos. El ORF 1 codifica una proteína de 420 aminoácidos que presenta una homología de 55,9% con GlgC de *E.coli* (ADP-glucosa sintetasa, EC 2.7.7.27). El ORF 2 codifica una proteína de 480 aminoácidos con una homología de 42,2% con GlgA de *E.coli* (glucógeno sintasa, EC 2.4.1.21). El ORF 3 fue identificado como el gen estructural de la fosfoglucomutasa (Pgm, EC 2.7.5.1). Esta es una proteína de 542 aminoácidos que presenta una homología de 52,6% con la Pgm de conejo. La posición de la inserción del transposón Tn5 en la cepa mutante A5129 de *A.tumefaciens* (*exoC::Tn5*) fue mapeada 430 bases río abajo del codón de iniciación del ORF 3.

INTRODUCCION:

Como se describió anteriormente (Capítulo 2), las mutantes *exoC* carecen de la actividad fosfoglucomutasa (Pgm). El plásmido pFC6251 (Cangelosi et al., 1987) contiene un fragmento de DNA de aproximadamente 30 kbases, que una vez introducido en estas mutantes restaura el fenotipo salvaje, indicando que contiene el gen *pgm* (*exoC*). Esta enzima cataliza la reacción glucosa 6-fosfato ↔ glucosa 1-fosfato, utilizando glucosa 1,6-bifosfato como cofactor. La reacción está desplazada hacia la izquierda, y su expresión parece ser constitutiva (Adhya, 1987; Ray y Peck, 1972; Weickert y Adhya, 1993). La enzima ha sido purificada de muchas fuentes, y su centro activo fue secuenciado aprovechando la propiedad de la Pgm de algunas fuentes, de poseer un intermediario fosforilado lo suficientemente estable para ser aislado. De esta forma, pudo establecerse la existencia de una secuencia consenso para el sitio activo, en donde una serina es fosforilada en el primer paso de la reacción (Ray y Peck, 1972).

La glucosa 1-fosfato es un intermediario en la síntesis de UDP-glucosa y ADP-glucosa, lo que justifica en las mutantes *exoC*, no solo la incapacidad de sintetizar EPS I y glucano (Leigh y Lee, 1988; Cangelosi et al., 1987), sino también glucógeno (Lepek, 1993). En este capítulo se presenta la caracterización genética de las mutantes *exoC* por subclonado del plásmido pFC6251 y la secuenciación de un fragmento de DNA cromosomal de *A.tumefaciens* de 4,4 kbases que demuestra la presencia de una agrupación de genes involucrados en la síntesis de glucógeno, incluyendo el gen estructural de la enzima fosfoglucomutasa.

RESULTADOS:

Análisis por subclonado del plásmido pFC6251 y complementación de mutantes *exoC* de *A.tumefaciens*: El plásmido pFC6251 que complementa las mutaciones *exoC*, fue sometido a una digestión con la enzima de restricción *XhoI*, obteniéndose fragmentos de DNA de 1,7, 6,5, 10 y 13 kbases. Cada uno de estos fragmentos fueron clonados en el cósmido vector pVK102 e introducidos por conjugación en *A.tumefaciens* A5129 (mutante *exoC*). La búsqueda de cepas transconjugantes se realizó sobre placas de medio Luria suplementadas con el colorante Cellufluor White. De esta manera, las colonias complementadas que recuperaron la capacidad de sintetizar succinoglicano adquirieron una fluorescencia azul-verdosa bajo luz ultravioleta (Finan et al., 1985; Matthyse, 1983). Con este procedimiento pudo aislarse el plásmido pX1089, que contenía el fragmento de 10 kbases. Este plásmido fue digerido con la enzima *HindIII*, produciendo fragmentos de DNA de 2,4 y 3,5 kbases, los que fueron clonados en pVK102, introducidos en *A.tumefaciens* A5129 y seleccionadas las cepas transconjugantes, como lo descrito anteriormente. Con este procedimiento se aisló el plásmido pH21, que contiene el fragmento *HindIII* de 3,5 kbases capaz de complementar la mutación *exoC*. En la Figura 18 se observa un mapa de restricción de este fragmento. Todos los sitios fueron confirmados por secuenciación, incluyendo dos sitios *ClaI* bloqueados por superposición con sitios de metilación *dam*.

Los extractos citosólicos de las cepas complementadas con los plásmidos pX1089 y pH21 presentaron actividad fosfoglucomutasa equivalente a la cepa salvaje (dato no mostrado).

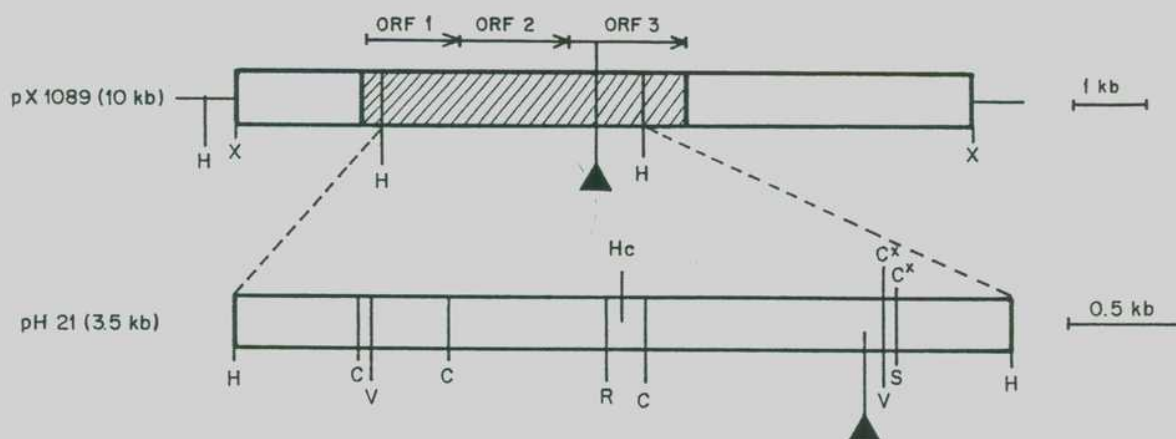


FIGURA 18: Representación esquemática de pX1089 y pH21. Se muestra el mapa de restricción de pH21. X: *Xho*I; H: *Hind*III; Hc: *Hinc*II; R: *Eco*RI; V: *Eco*RV; S: *Sal*I; C: *Cla*I; C^{*}: *Cla*I bloqueado por sitios de metilación *dam*. La región sombreada representa el fragmento de 4,4 kbases secuenciado. Se indica con flechas la orientación de los tres ORFs detectados. ▲: Inserción Tn5 en *A.tumefaciens* A5129.

Análisis de la secuencia de DNA: La Figura 19 muestra la secuencia nucleotídica de un fragmento de 4.408 bases del plásmido pX1089 (región sombreada en la Figura 18) que incluye el fragmento *Hind*III de 3,5 kbases clonado en pH21.

El análisis de esta secuencia reveló la existencia de tres marcos de lectura abiertos (ORFs) orientados en la misma dirección, que fueron identificados por el análisis de homología de las secuencias traducidas a aminoácidos, ingresando a la base de datos del GenBank. El primer ORF (1.260 bases), desde el nucleótido 40 al 1.300, codifica una proteína de 420 aminoácidos, con una masa molecular relativa (M_r) de 47.027. Esta proteína presenta un índice de similaridad (Lipman y Pearson, 1985) de 55,9 con el producto del gen *glgC* de *E.coli* que codifica la ADP-glucosa sintetasa (EC 2.7.7.27) (ver Figura 20, Baecker et al., 1983). Se identificó una posible secuencia de unión de ribosomas (o Shine-Dalgarno), GGAGG, a seis pares de bases del propuesto codón ATG de iniciación.

El ORF 2 (1.440 bases), desde el nucleótido 1.308 al 2.748, codifica una proteína de 480 aminoácidos, con un M_r calculado de 51.706. Esta proteína exhibe un índice de similaridad de 42,2 con el producto del gen *glgA* de *E.coli*, que codifica la glucógeno sintasa (EC 2.4.1.21) (ver Figura 21, Kumar et al., 1986). La secuencia de Shine-Dalgarno propuesta para este gen (GAG) se encuentra a 4 bases del codón de iniciación ATG.

El ORF 3 (1.626 bases), desde el nucleótido 2.755 al 4.381, codifica una proteína de 542 aminoácidos con un M_r calculado de 57.799. El codón de iniciación ATG de este gen está precedido, a 12 bases, por la secuencia AGG, como posible sitio de unión de ribosomas. Este ORF termina con dos codones de terminación consecutivos. La comparación entre la secuencia traducida a aminoácidos del ORF 3 y la secuencia protéica de la fosfoglucomutasa (Pgm) de conejo (EC 2.7.5.1, Ray et al., 1983) muestra un índice de similaridad de 52,6 (Figura 22). El sitio activo propuesto para esta enzima (aminoácidos 107 a 129 en la Pgm de conejo) está muy conservado, especialmente el péptido Thr-Ala-Ser-His-Asn, (Figura 22, posición 114-118), descrito como secuencia consenso en diferentes géneros, incluyendo conejo, humano, peces y *E.coli*, en donde la serina es fosforilada durante la reacción (Ray y Peck, 1972; Whitehouse et al., 1992). Es interesante hacer notar que el sitio activo de la Pgm de *A.tumefaciens* tiene una serina adicional en lugar de la treonina.

La única secuencia completa del gen *pgm* de bacterias que ha sido informado es el gen *xanA* de *Xantomonas campestris*, por Koplín et al. (1992). El ORF 3 no presenta homología significativa con XanA (índice de similaridad menor a 20), lo que indica que la Pgm de *A.tumefaciens* y XanA son enzimas no relacionadas, como será confirmado luego por ensayos de especificidad de sustratos.

CAPITULO 5: CARACTERIZACION GENETICA DE LAS MUTACIONES *exoC*

1 CTGAACCGGAAAACCTGACAGACAGAGAGGAGGACACCCATGTCGGAAAAAGAGTTGAGCCTTTGGCGCGTGATGCAATGGCCTATGTCCTCGCAGCGGAAGAGGAAGCCGTCTGAAG
 * M S E K R V Q P L A R D A M A Y V L A G G R G S R L K

121 GAACTGACGGACCGCCGGGCAAACCCGCGTTTATTTTGGCGGCAAGGCGCGCATCATCGATTTTGGCCTTTCCAACGCGCTCAATTCGGGCATCCGCGCATCGGCGTCGCCACGCAA
 E L T D R R A K P A V Y F G G K A R I I D F A L S N A L N S G I R R I G V A T Q

241 TATAAGGCTCACTCCCTCATCCGCCACCTGCAACGCGGCTGGGACTTCTCCGTCCCGAGCGTAACGAAAGCTTCGACATTCTGCGCGCTTCGCAGCGGTGTCCGAAACGCAATGGTAC
 Y K A H S L I R H L Q R G W D F F R P E R N E S F D I L P A S Q R V S E T Q W Y

361 GAAGGCACCGCCGACGCGGTTTACCAGAACATCGACATCATCGAGCCCTATGCCCGGAATATATGGTCATTCTGGCCGGCGACCATATTTACAAAATGGACTACGAATACATGCTGCAA
 E G T A D A V Y Q N I D I I E P Y A P E Y M V I L A G D H I Y K M D Y E Y M L Q

481 CAGCATGTGGATTCCGGTGCCGACGTACGATCGGCTGCCTTGAAGTCCCGCGCATGGAAGCGACCGGCTTCGGCGTGATGATGTGAACGAAAAGACGAGATCATCGACTTCATCGAA
 Q H V D S G A D V T I G C L E V P R M E A T G F G V M H V N E K D E I I D F I E

601 AAGCCGGCGATCCGCGCGCATTCGCGCAATGAAGTTTGGCGCTGCCTCGATGGGCATCTACGCTTCCACACGAAGTTCCTGATGGAAGCCGTGCGCGCGATGCCCGCATCCG
 K P A D P P G I P G N E G F A L A S M G I Y V F H T K F L M E A V R R D A A D P

721 ACCTCCAGCCGCGACTTCGCAAGGACATCATTCCCTATATCGTCGAACACGGTAAAGCCGTTGCGCACCGCTTCGCTGATTCTCGTGCCTGCGGATTTCGAGCACGAACCCCTACTGG
 T S S R D F G K D I I P Y I V E H G K A V A H R F A D S C V R S D F E H E P Y W

841 CGAGACGTCCGCCACCATCGATGCCTATGGCAGGCCAATATCGACCTCACGGATGGTGCCGGACCTCGATATCTACGACAAGTCTGGCCGATCTGGACCTATCGGAAATCACCCCG
 R D V G T I D A Y W Q A N I D L T D V V P D L D I Y D K S W P I W T Y A E I T P

961 CCGCGCAAATTCGTGCATGACGATGAAGATCGCCGTGGTTCGGCCGATCGTCCGTGCTCGGGCGACTGCATCATTTCGGTGCAGCGCTCAACCGCAGCCTGCTGTTACAGGCGTG
 P A K F V H D D E D R R G S A V S S V V S G D C I I S G A A L N R S L L F T G V

1081 CGCGCAATTCATACTCCCGCCTTGAAGTCCCGTAGTACTGCCGAGTGAAGATCGGGCGTATGCTCAGCTCAGCAATGCTGCATCGACCATGGCGTGGTCATTCCGGAAGGACTG
 R A N S Y S R L E N A V V L P S V K I G R H A Q L S N V V I D H G V V I P E G L

1201 ATTGTAGGAGAAGACCCGAACTGGATGCCAAACGCTTCGCGCGCACGGAAGCGGCATCTGCCTTATCACCCAATCGATGATCGACAAGTGGACCTGTAGAGCCCATGAATGTCCTTT
 I V G E D P E L D A K R F R R T E S G I C L I T Q S M I D K L D L * M N V L S

1321 CGGTTTCATCCGAAATTTATCCCTGATCAAGACCGGAGGGCTCGCCGACGTTGTGGCGCGCTCCCATCGCGCTCGAAGCCCATGGCGTCAGAACCGGGACATTGATACCCGGCTATC
 V S S E I Y P L I K T G G L A D V V G A L P I A L E A H G V R T R T L I P G Y P

1441 CCGCGGTGAAAGCCGCGTACGCGACCCCGTCAAATGTTTTGAGTTCACCGACCTGCTGGCGAAAAGCGCGATCTGCTCGAAGTCCAACACGAGAGGCTAGACCTTTTGTCTCGACG
 A V K A A V T D P V K C F E F T D L L G E K A D L L E V Q H E R L D L L I L D A

1561 CGCCCGCCTATTACGAGCGTTCGCGCGGCCCTATCTCGGCCAGACCGGCAAGGATTATCCTGATAACTGGAAGCGTTTTGCGCGCTGTCACTGGCGCGCGCGGATCGGCGCCGGTG
 P A Y Y E R S G G P Y L G Q T G K D Y P D N W K R F A A L S L A A A R I G A G V

1681 TGCTCCCGGCTGGCGCGCGGATATGGTGCACGCGATGACTGGCAGGCCCGCATGACGCCTGTCTATATGCGTTACGCCGAAACACCGGAAATTCGAGCCTTCTCACCATCCACAACA
 L P G W R P D M V H A H D W Q A A M T P V Y M R Y A E T P E I P S L L T I H N I

1801 TTGCCTTTCAGGGCCAGTTCGGCGCAAACATCTTCAGCAAACCTGCCCTGCCCGCCACGCTTCGGCATGGAGGGCATCGAATATTACAACGACGTGAGCTTCTCAAGGGCGGCTTGC
 A F Q G Q F G A N I F S K L A L P A H A F G M E G I E Y Y N D V S F L K G G L Q

1921 AGACGGCAACCGCGCTCAGCACGGTCAGCCATCTATGCGGAAGAAATCCTGACCGCGGAATTCGGCATGGGGCTTGAAGGGGTGATCGGCAGCCGCGCCATGTGCTGCACGGCATCG
 T A T A L S T V S P S Y A E E I L T A E F G M G L E G V I G S R A H V L H G I V

2041 TCAACGGCATCGACGCGGATGTCTGGAACCCGGCCACCGACCATCTGATCCACGACAATTATTCGCGCCCAATCTCAAGAACCCTGCCCTGAACAAGAAGGCGGTCGCCAACATTTCC
 N G I D A D V W N P A T D H L I H D N Y S A A N L K N R A L N K K A V A E H F R

2161 GTATCGATGATGATGGCAGCCCGTATTCTGCGTCATCTCCCGCTCACCTGGCAGAAGGGCATCGACCTCATGGCGGAAGCCGTGGATGAGATCGTTTCCCTCGGCGCCCGCTGGTGG
 I D D D G S P L F C V I S R L T W Q K G I D L M A E A V D E I V S L G G R L V V

2281 TGCTGGGCGCGGCGATGTGGCACTGGAAGGCGCGCTTCTTGGCGCGCATCCCGCCACCATGGACGCGTGGTGTGCCATCGGTTACAACGAGCCGCTGTGCGATCTCATGACGGCGG
 L G A G D V A L E G A L L A A A S R H H G R V G V A I G Y N E P L S H L M Q A G

2401 GTTGGCAGCGGATCATCATTCCCTCTCGCTTCGAGCCCTGCGGCGTACCCAGCTTACGCGTTGCGTTACGGCTGCATTCCGGTCTGCGCCCGCACCGCGGCTTCCGACACCGTGA
 C D A I I I P S R F E P C G L T Q L Y A L R Y G C I P V V A R T G G L A D T V I

CAPITULO 5: CARACTERIZACION GENETICA DE LAS MUTACIONES *exoC*

2521 TTGACGCCAACCATGCCGCCCTCGCCAGCAAGGCGGCAACTGGCGTACAATTTTACCCTGCACACTTGACGGTCTGAAACAGGCGATCCGCCGGACCGTCCGTTATTATCACGACCCGA
D A N H A A L A S K A A T G V Q F S P V T L D G L K Q A I R R T V R Y Y H D P K

2641 AACTGTGGACACAAATGCAGAAACTCGGAATGAAATCCGATGTTTCTGGGAAAAAGCGCCGGTCTCTACGCCGCGCTTTATAGCCAGCTTATTTCGAAAGGCCATTGAACCAATGATC
L W T Q M Q K L G M K S D V S W E K S A G L Y A A L Y S Q L I S K G H * M I

2761 AAGACTATCAAGACGACGCCTTATCAGGACCAGAAGCCGGGCACATCCGGCCTGCGCAAGAAGGTGCCAGTCTTCGCCCAGGAAAATTATGCCGAGAAGTTCATCCAGTCGATCTTCGAC
K T I K T T P Y Q D Q K P G T S G L R K K V P V F A Q E N Y A E N F I Q S I F D

2881 GCGCTTGAAGGTTTTGAGGGCCAGACGCTGGTGGTATCGGCGGCGACGGCCGTTATTACAACCGGAAGTCCAGAAGGCGATCAAAATGGCCGCCCGCCGGTTTCGGCAAGGTGCTG
A L E G F E G Q T L V I G G D G R Y Y N R E V I Q K A I K M A A A A G F G K V L

3001 GTCGGTCAGGGCGGCATTCTCTCGACGCCCGCCCTCCAACGTTATCCGCAATACAAGGCCCTCGGCGGCATCGTGCTTCCGCCAGCCATAATCCCGCGGCGCCGACCGAAGATTC
V G Q G G I L S T P A A S N V I R K Y K A F G G I V L S A S H N P G G P T E D F

3121 GGCATCAAATACAATATCGGCAATGGCGGCCAGCACCAGGAAAAGATCACCAGCCGATCTATGCTCGCTCTAAGGTCATCGACAGCTACAAAATCTCTGATCGACCCGATATCGATCTC
G I K Y N I G N G G P A P E K I T D A I Y A R S K V I D S Y K I S D A A D I D L

3241 GACAAGATCGGCAGTTC AAGGTGGATGAAC TAACGGTTCGACGTTATCGATCCGGTTGCCGATTATGCTGCGCTGATGGAAGAGCTGTTGATTTTGGCGCCATCCGTTCTCTCATCGCC
D K I G S F K V D E L T V D V I D P V A D Y A A L M E E L F D F G A I R S L I A

3361 GGCGGCTTCAAGGTCGTCGTCGATCCATGAGCGCCGTCAACGGCCCTATGCCGTTGAGATCCTCGAAAAGCGTCTCGGCGCTCCCAAGGGCTCCGTCGCAACGCAACACCGCTGCC
G G F K V V V D S M S A V T G P Y A V E I L E K R L G A P K G S V R N A T P L P

3481 GATTTTCGGCGCCACCATCCCGATCCGAACCTTGTCCATGCCAAGGAGCTTTATGACGACGTCATGAGCCCGAAAGGCCGGATTTTCGGCGCGGCTTCGATGGTGGTGGCGACCGCAAT
D F G G H H P D P N L V H A K E L Y D D V M S P E G P D F G A A S D G D G D R N

3601 ATGGTTGTCGGCAAGGGCATGTTTCGTCACCTCCCTCCGATAGTCTCGCGATCATCGCCGCCAATGCCAAGCTGGCGCCCGGTTATGCCCGCCGGCATTCCGGCATCGCCCGCTCGATGCCG
M V V G K G M F V T P S D S L A I I A A N A K L A P G Y A A G I S G I A R S M P

3721 ACCAGTGGCGAGCCGACCGCGTCCGCTGAAAAGCTCGGGCTTGGAAATGTACGAAACCCGACCGGCTGGAAATCTTTCGGCAATCTCATGGATGCCGGCAAGGTGACGATCTGCGGCGAG
T S A A A D R V A E K L G L G M Y E T P T G W K F F G N L M D A G K V T I C G E

3841 GAAAGCTTTGGCACCGGTTTCGAACCATGTGCGTGAAAAGGATGGCCTGTGGCCGTGCTTTACTGGCTGAACATTGTGCGGCGCGCAAGGAAAGCGTGAAGGACATCGTCACCAAGCAC
E S F G T G S N H V R E K D G L W A V L Y W L N I V A A R K E S V K D I V T K H

3961 TGGCGGAATATGGCCGCAACTATTATTCGCGCCACGACTATGAGGAAGTGGATTTCGGATGCCGCAATACGCTGGTGGCCATCCTGCGCGAAAAACTCGCGACACTGCCCGCACCCAGC
W A E Y G R N Y Y S R H D Y E E V D S D A A N T L V A I L R E K L A T L P G T S

4081 TACGGCAATCTGAAGGTTCGCGCGCGCGGATGATTTGCCTATCAGATCCGGTCGACAGTCTGTCAGCAAGAACCAGGGCATCCGCATCCTGTTTCGAAGGCGGCTCGCGCATCGTGCTG
Y G N L K V A A A D D F A Y H D P V D Q S V S K N Q G I R I L F E G G S R I V L

4201 CGCCTTTCGGCACCGGTA CTGCGGGCGGACGCTTCGACTCTACGTCGAGCGTTACGAGCCGGATGCGGCGCCGACCGCATCGAAACGCAAGTTCGGCGCTCGCGCATCTGATTTCCGTT
R L S G T G T A G A T L R L Y V E R Y E P D A A R H G I E T Q S A L A D L I S V

4321 GCCGATACCATCGCCGGCATCAAGGCCATACGGCCGACGCAACCGACTGTCATTACCTGATAACGTCGCGCCGCTCATGAGGGAC
A D T I A G I K A H T A D S E P T V I T * *

FIGURA 19: Secuencia nucleotídica de un fragmento de DNA cromosomal de *A.tumefaciens* de 4.408 pares de bases clonado en pX1089. La secuencia deducida de aminoácidos se indica debajo, en el código de una letra. Los asteriscos indican codones de terminación. Los posibles sitios de unión de ribosomas están subrayados. Los sitios de restricción *Hind*III que determinan el fragmento de 3,5 kbases clonado en pH21, están doblemente subrayados.

CAPITULO 5: CARACTERIZACION GENETICA DE LAS MUTACIONES *exoC*

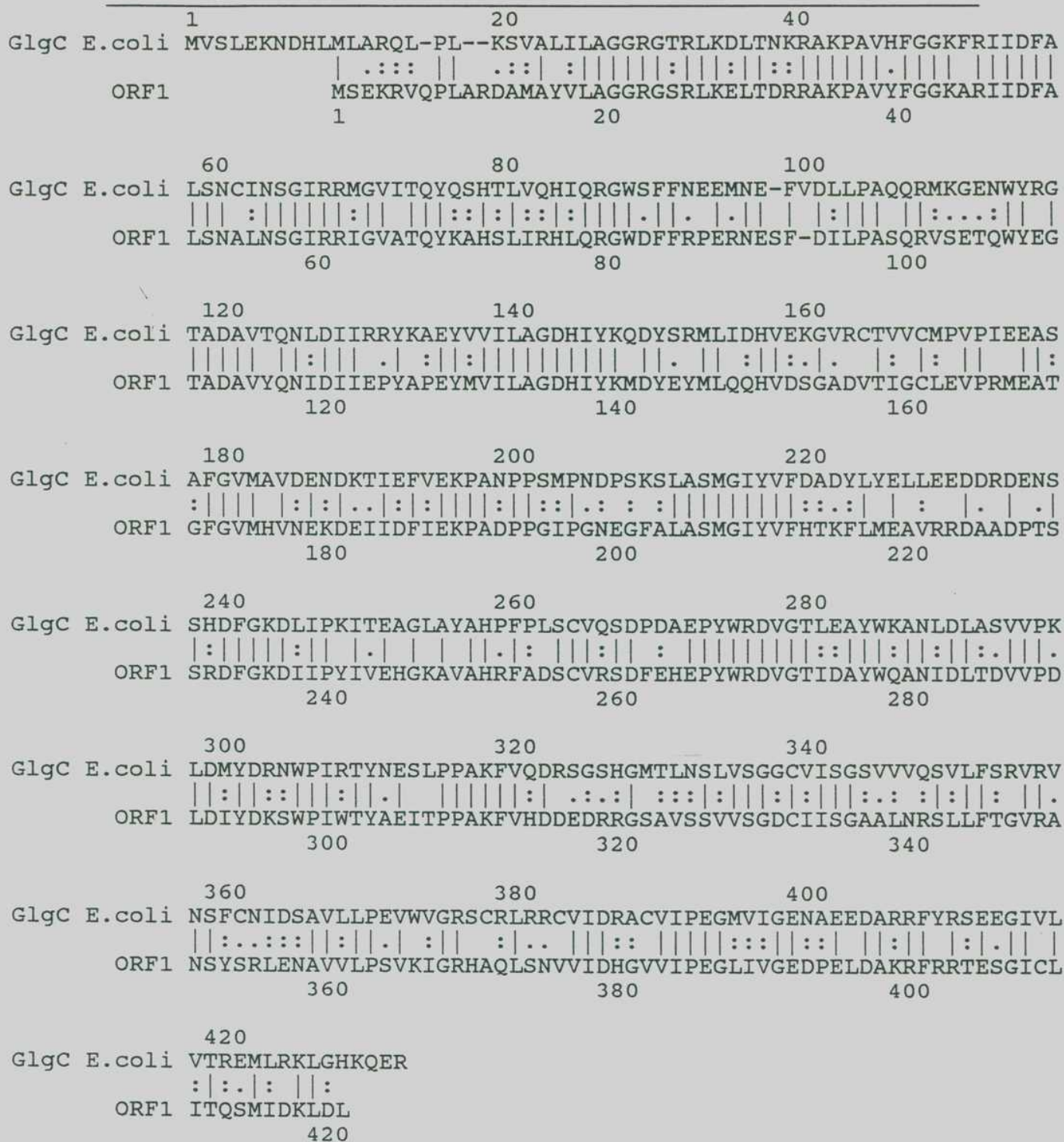


FIGURA 20: Comparación entre las secuencias de aminoácidos deducidas de ORF 1 y el gen *glgC* de *E.coli*, usando el algoritmo desarrollado por Lipman y Pearson (1985). La identidad en aminoácidos está indicada por una barra vertical; las sustituciones no conservativas o conservativas están indicadas por uno o dos puntos, respectivamente. Se han introducido espacios para maximizar el alineamiento.

Actividad fosfomanomutasa: Fue descrito que el producto del gen *xanA* tiene las actividades fosfoglucomutasa (Pgm) y fosfomanomutasa (Pmm), que convierte manosa 6-fosfato en manosa 1-fosfato, un intermediario en la síntesis de GDP-manosa (Koplin et al., 1992). En el Capítulo 3 (Figura 14), se ha descrito que las mutantes *exoC* presentan un contenido endógeno detectable de GDP-manosa. Este resultado sugiere que la actividad Pmm no fue afectada por la mutación *exoC*. Para confirmar esto, se ensayó la actividad Pmm en extractos citosólicos de las cepas salvaje A348 y mutante *exoC* A5129. Como se muestra en la Tabla 9, luego de la incubación de los extractos con [¹⁴C]manosa 1-fosfato, se aprecia una conversión similar en las cepas salvaje y mutante, de manosa 1-fosfato a manosa 6-fosfato y otras hexosas 6-fosfato, indicando que las actividades Pgm y Pmm son independientes en *A.tumefaciens*.

TABLA 10: Actividad fosfomanomutasa^a

Cepa	Productos ^b			
	Man 1-P	Man 6-P	Fru 6-P	Glc 6-P
A348	10217 (22)	11081 (24)	9827 (21)	15434 (33)
A5129	11140 (30)	7618 (21)	6400 (17)	11781 (32)

^a: Los extractos citosólicos fueron incubados con [¹⁴C]Manose 1-phosphate según materiales y métodos. ^b: Radioactividad (cpm) recuperada despues de 30 min. de incubación. Entre paréntesis, % de radioactividad total recuperada en forma de hexosa fosfato.

Mapeo de la inserción *exoC::Tn5*: La cepa A5129 de *A.tumefaciens* (mutante *exoC*) es incapaz de sintetizar glucógeno in vivo. Sin embargo extractos libres de células producen glucógeno in vitro cuando se utiliza ADP-glucosa como sustrato (Lepek, 1993), indicando que la actividad glucógeno sintasa está presente. Se ha ensayado la actividad ADP-glucosa sintetasa, encontrándose valores similares en las cepas salvaje A348 y A5129 (44 y 48 mU/mg de proteínas respectivamente). Como se mostró anteriormente, estas dos enzimas y la fosfoglucomutasa están codificadas juntas, probablemente formando una unidad transcripcional. Esto indica que en la cepa A5129 (*exoC::Tn5*) la mutación polar debe estar localizada en el gen *pgm* (ORF 3).

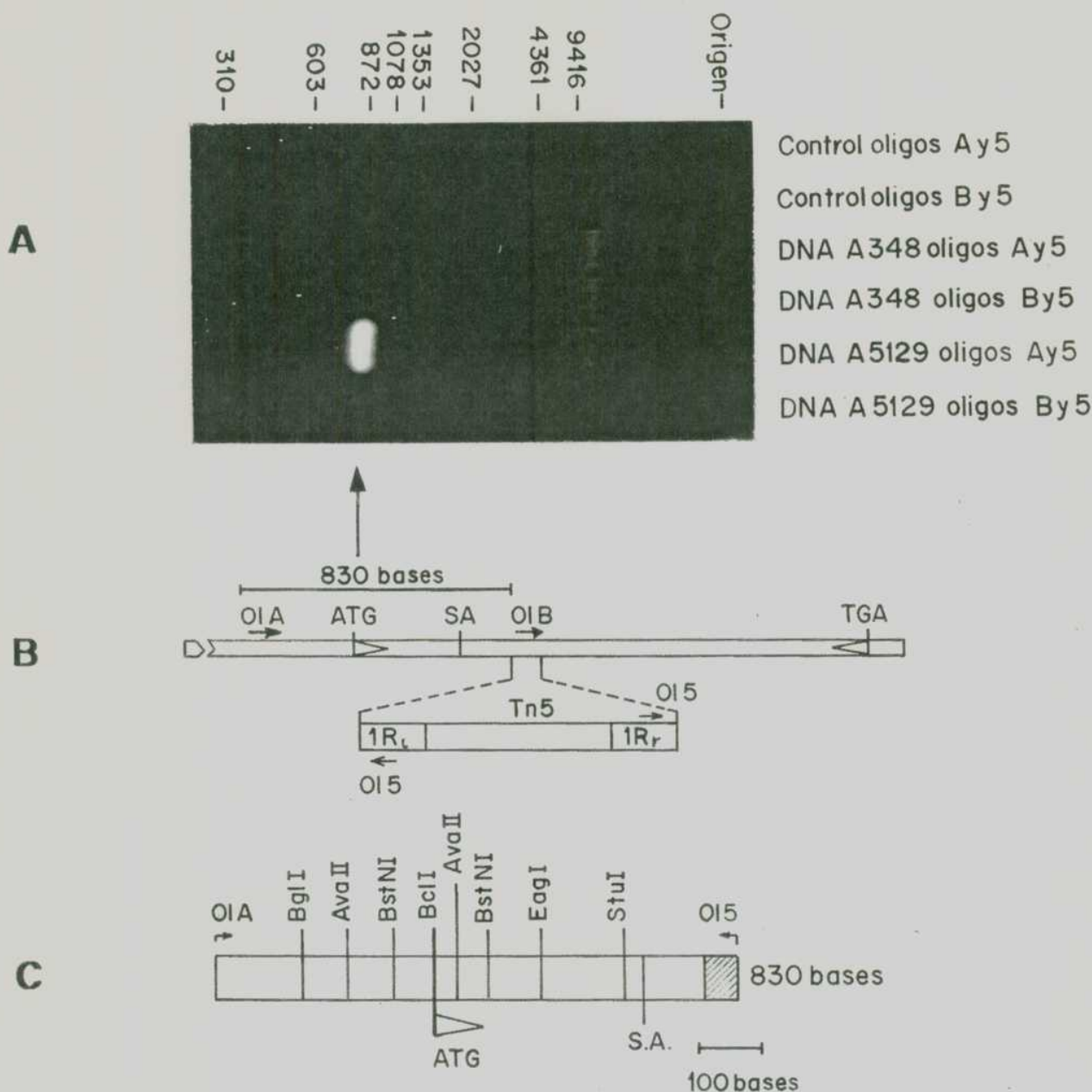


FIGURA 23. **A:** Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de amplificación por PCR de DNA cromosomal de las cepas salvaje A348 y mutante A5129 (*exoC::Tn5*). Los controles representan reacciones de amplificación sin el agregado de DNA cromosomal. **B:** Representación esquemática de la estrategia utilizada en el mapeo de la inserción del transposón Tn5. OI A, B o 5 indica oligonucleótidos A, B o 5 respectivamente. ATG y TGA, codones de iniciación y terminación del ORF 3 (Pgm) respectivamente. SA, sitio activo de la Pgm. IR, repeticiones invertidas del Tn5. **C:** Mapa de restricción deducido del análisis de la secuencia de DNA de la Fig. 19, y confirmado por digestión con las mismas enzimas sobre el fragmento de DNA de 830 pares de bases amplificado utilizando los oligos A y 5. La región sombreada representa el fragmento de DNA correspondiente a la inserción Tn5.

Para mapear esta inserción, se diseñó un oligonucleótido río arriba del ORF 3 (oligo A), que corresponde a la secuencia entre los nucleótidos 2.409 y 2.426 de la Figura 19, y un oligonucleótido complementario a la secuencia que corresponde a las bases 30-52 (oligo 5) del extremo del transposón (Auerswald et al., 1981). Con estos oligonucleótidos y DNA cromosomal de la cepa A5129 (y A348 como control negativo), se amplificó por PCR un fragmento de DNA de 830 bases (Fig. 23). Este fragmento fue identificado y su tamaño determinado con un error de ± 10 bases, por mapeo de restricción y electroforesis en gel de poliacrilamida. Utilizando el oligonucleótido B (ver Fig. 23), según la secuencia entre los nucleótidos 3246 y 3262 de la Fig. 19 del ORF 3, a 837 bases del oligo A, no se detectó amplificación alguna. Estos resultados permiten localizar la inserción 430 bases río abajo del codón de iniciación del ORF 3, 100 bases río abajo del centro activo propuesto de la Pgm de *A.tumefaciens*.

DISCUSION:

Se ha secuenciado y analizado un fragmento de DNA cromosomal de 4.408 bases de *A.tumefaciens*, presente en el plásmido pFC6251, que restaura el fenotipo salvaje de las mutantes *exoC* (Cangelosi et al., 1987). Se detectaron tres ORFs sobre este fragmento, involucrados en la síntesis de glucógeno y otros polisacáridos. Por análisis de homología, los ORF 1, ORF 2 y ORF 3 fueron identificados como *glgC*, *glgA* y *pgm*, respectivamente (Baecker et al., 1983; Kumar et al., 1986; Ray et al., 1983). *glgC* codifica la ADP-glucosa sintetasa y *glgA* la glucógeno sintasa, en *E.coli* y *S.typhimurium*, mapeando en el minuto 75 y 74 de sus respectivos cromosomas (Bachmann, 1983; Sanderson y Roth, 1983). En *E.coli*, el gen *pgm* mapea en el minuto 15 (Bachmann, 1983), sin embargo, en *A.tumefaciens*, los tres genes están unidos formando, probablemente, una unidad transcripcional, a juzgar por el casi inexistente espacio intergénico. En un estudio preliminar no se han podido identificar secuencias consenso para promotores.

Un mapeo de la inserción Tn5 de la mutante *exoC* A5129 reveló que esta se localiza 430 pares de bases río abajo del inicio del gen *pgm* (ORF 3). Esto justifica la incapacidad de expresar una fosfoglucomutasa activa y por consiguiente la ausencia de UDP-glucosa y ADP-glucosa. Esta mutación polar no afecta la expresión de los dos genes anteriores (*glgC* y *glgA*), lo cual explica que extractos de cepas mutantes puedan sintetizar glucógeno in vitro, cuando se les provee de ADP-glucosa exógeno

(Lepek, 1993). Más aún, se ha detectado una actividad ADP-glucosa sintetasa normal en extractos de mutantes *exoC*.

El plásmido pH21 contiene un gen *pgm* truncado (365 de 542 aminoácidos), sin embargo es capaz de complementar las mutantes *exoC*. Esto podría indicar que esta proteína posee un extremo carboxilo terminal redundante. Es interesante notar que la Pgm es una proteína particularmente grande para una enzima monomérica. Otra posibilidad, tal vez la más factible, es que la complementación se haya producido luego de un evento de recombinación homóloga, reconstituyéndose una Pgm normal en tamaño y en actividad.

La expresión de esta enzima parece ser constitutiva en diferentes géneros (Ray y Peck, 1972; Weickert y Adhya, 1993). No se puede afirmar que este sea el caso en *A.tumefaciens*, pero debido a su relación con genes que están regulados a diferentes niveles en este género (Preiss, 1984), es muy factible algún tipo de modulación de su expresión. Si esto es cierto, la síntesis de diferentes polisacáridos debería estar coordinada.

Se ha determinado que las actividades Pgm y Pmm residen sobre diferentes enzimas en *A.tumefaciens*. Estas dos actividades están codificadas por el mismo gen (*xanA*) en *X.campestris* (Koplin et al., 1992). Aquí se ha detectado una muy baja homología entre XanA y ORF 3. El gen *xanA* codifica una proteína más pequeña que ORF 3 (448 y 542 aminoácidos respectivamente) y presenta una alta homología con el gen *algA* de *P.aeruginosa*, que codifica la Pmm (Koplin et al., 1992). ORF 3 presenta una alta homología con la Pgm de mamíferos. Como se muestra en la Figura 22, el sitio activo está muy conservado, incluyendo el péptido Thr-Ala-Ser-His-Asn, que es una secuencia consenso en Pgm, donde la serina es fosforilada durante la reacción. En *A.tumefaciens*, la treonina está substituida por una serina, lo cual es de interés, debido al rol asignado a la serina en el mecanismo de reacción. Desafortunadamente, no se dispone de secuencias completas de fosfoglucomutasas de otras fuentes. Esto permitiría comparar el ORF 3 con los genes *pgm* de, por ejemplo, otras bacterias o plantas, pudiendo especular sobre el posible origen de este gen en *A.tumefaciens*.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se han caracterizado bioquímicamente las mutantes *exoB* y *exoC* de *A.tumefaciens*, las que carecen de las actividades UDP-glucosa 4-epimerasa (EC 5.1.3.2) y fosfoglucomutasa (EC 2.7.5.1), respectivamente.

Estos resultados pueden extenderse a *R.meliloti*, por la equivalencia genética y funcional de los loci *exoB* y *exoC* en ambas especies.

La ausencia de actividad UDP-glucosa 4-epimerasa, enzima que interconvierte UDP-glucosa en UDP-galactosa, intermediario en la síntesis de polisacáridos que contienen galactosa, justifica la incapacidad de las mutantes *exoB* de sintetizar succinoglicano (EPS I), EPS II y lipopolisacáridos.

La ausencia de actividad fosfoglucomutasa, enzima que interconvierte glucosa 6-fosfato en glucosa 1-fosfato, intermediario en la síntesis de UDP-glucosa y ADP-glucosa, justifica la incapacidad de las mutantes *exoC* de sintetizar glucano β (1-2) cíclico, succinoglicano, EPS II, lipopolisacáridos y glucógeno.

La caracterización genética de las mutantes *exoC* de *A.tumefaciens* reveló que la mutación polar *exoC::Tn5* está localizada en el gen estructural de la fosfoglucomutasa (Pgm).

Se ha secuenciado una región cromosómica de 4.408 bases que reveló la existencia de los genes *glgC* (ADP-glucosa sintetasa, EC 2.7.7.27), *glgA* (glucógeno sintetasa, EC 2.4.1.21) y *pgm* (fosfoglucomutasa).

No se detectaron secuencias consenso identificables para promotores ni espacio intergénico, lo que sugiere la posibilidad de que estos tres genes estén formando una unidad transcripcional.

El producto del gen *pgm* (*exoC*) de *A.tumefaciens* presenta una homología del 52,6% con la Pgm de conejo.

ExoC tiene una homología menor del 20% con el producto del gen *xanA* de *Xantomonas campestris*. XanA posee las actividades Pgm y fosfomanomutasa (Pmm).

En *A.tumefaciens*, las actividades Pgm y Pmm residen en proteínas distintas.

CONCLUSIONES

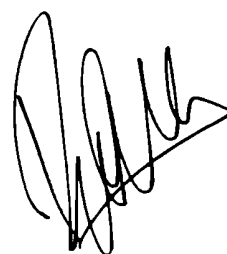
El centro activo de la Pgm de *A.tumefaciens* presenta muy alta homología con el de la enzima de conejo.

En *A.tumefaciens*, el centro activo presenta la característica de poseer una serina en lugar de la treonina en el péptido Thr-Ala-Ser-His-Asn, secuencia consenso de fosfoglucomutasas de géneros diversos.

A.tumefaciens y *R.meliloti* no metabolizan la galactosa por la vía de Leloir por carecer de las enzimas galactoquinasa (EC 2.7.1.6) y galactosa 1-fosfato uridililtransferasa (EC 2.7.7.10).

La actividad UDP-glucosa 4-epimerasa es constitutiva y no inducible por crecimiento en galactosa, a diferencia de las enterobacterias.

Se ha detectado la existencia de una vía alternativa para la metabolización de la galactosa, inducible por crecimiento en medios conteniendo este azúcar o L-arabinosa, similar a la identificada en *Pseudomonas saccharophila* por DeLey y Doudoroff. La ausencia del camino de Leloir y el uso de la vía oxidativa de DeLey-Doudoroff parece ser común en bacterias del suelo, como *R.meliloti* y *R.leguminosarum*.



MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo:

Las cepas y plásmidos utilizados están listados en la Tabla 11.

Tabla 11:

Cepa o plásmido	características relevantes	referencia
<i>A. tumefaciens</i>		
A348	Rif ^r Cm ^r pTiA6, cepa parental	Garfinkel et al., 1981
A5129	ExoC ⁻ Neo ^r , mutación Tn5 de A348	Cangelosi et al., 1987
A5503	ExoC ⁻ , mutación química de A348	"
A5126	ExoB ⁻ Neo ^r , mutación Tn5 de A348	"
A5094	ExoB ⁻ Neo ^r , mutación Tn5 de A348	"
<i>R. meliloti</i>		
Rm1021	Sm ^r , cepa parental	Leigh et al., 1985
Rm7025	ExoC ⁻ Neo ^r , mutación Tn5 de Rm1021	Leigh y Lee, 1988
Rm7094	ExoB ⁻ Neo ^r , mutación Tn5 de Rm1021	"
<i>E. coli</i>		
Y1090	Tc ^r , Cb ^r , Sm ^r , Tp ^r	Young y Davis, 1983
HB101	Sm ^r , GalK ⁻ , RecA ₂	Bolivar y Backman, 1979
DH5 α F'IQ	Km ^r , F ⁻ , RecA ⁻	Jessee y Blodgett, 1988
Plásmidos		
pVK102	Cósmido vector, Km ^r , Tc ^r	Knauf y Nester, 1982
pFC6251	pVK102 con un fragmento de DNA de 30 kbases (<i>exoC</i>) de A348, Km ^r	Cangelosi et al., 1987
pX1089	pVK102 con un fragmento de DNA de 10 kbases (<i>exoC</i>) de pFC6251, Tc ^r	esta tesis
pH21	pVK102 con un fragmento de DNA de 3,5 kbases de pX1089, Tc ^r	esta tesis

Todas las cepas fueron crecidas en medio Luria (Tryptona, 10 g/l; Extracto de levadura, 5 g/l; NaCl, 5 g/l), salvo que se especifique lo contrario, a 28°C para *A. tumefaciens* y *R. meliloti*, y a 37°C para *E. coli* (Maniatis et al., 1982).

Otros medios de cultivo utilizados:

M9: Na₂HPO₄ 12,8 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH₄Cl 1 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,2 g/l, fuente de carbono 2-10 g/l (Maniatis et al., 1982).

MATERIALES Y METODOS

Albersheim modificado: manitol 10 g/l, glutamato de sodio 2,33 g/l, KH_2PO_4 0,5 g/l, NaCl 0,2 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l, biotina 2 mg/l, glucosa 3 g/l (Robertsen et al, 1981).

Ty: triptona 5g/l, extracto de levadura 3 g/l (Zorreguieta y Ugalde, 1986).

Cuando fue necesario, los medios se suplementaron con: cloranfenicol (Cm) 20 ug/ml, neomicina (Neo) 100 ug/ml, kanamicina (Km) 50 ug/ml, estreptomycin (Sm) 100 ug/ml, tetraciclina (Tc) 20 ug/ml, carbenicilina (Cb) 150 ug/ml, rifampicina (Rif) 100 ug/ml y trimetoprima (Tp) 25 ug/ml.

Para la detección del fenotipo Exo, se utilizaron placas de medio Luria-agar suplementadas con 0,02% del colorante Cellufluor White (Polysciences, Inc., Warrington, Pa.) (Finan et al., 1985; Matthyse, 1983).

Determinación del contenido de exopolisacáridos en el medio de cultivo:

Cepas de *A.tumefaciens* o *R.meliloti*, fueron crecidas durante 24 horas. Las células fueron centrifugadas 15 minutos a 6.000 g. El sobrenadante fue recuperado y concentrado 6 veces. El exopolisacárido se precipitó con 3 volúmenes de etanol 96% y centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos (Geremia et al., 1987).

Obtención de glucano $\beta(1-2)$ cíclico:

Células provenientes de 100 ml de cultivo fueron resuspendidas en 5 ml de ácido tricloroacético 1% y mantenidas a 0°C durante 30 min. (Miller et al., 1986). El sobrenadante de centrifugación a 10.000 g, 10 min. fue neutralizado con NH_3 , concentrado 5 veces y sometido a una cromatografía en columna de BioGel P4 (1,8 x 78 cm), con acetato de piridina 100mM (pH 5,5) como solvente. El glucano eluido con un K_{av} de 0,12-0,27 fue recuperado y cuantificado por el método Antrona- SO_4H_2 (Dische, 1962). El K_{av} fue calculado como $(V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, donde V_e = volumen de elución, V_0 = volumen de exclusión y V_t = volumen total de la columna.

Preparación de citosoles y membranas internas:

Células de un cultivo en fase exponencial (1 litro) fueron recuperadas por centrifugación y resuspendidas en 10 ml de buffer 30mM Tris-HCl (pH 8), 20% sacarosa, 10mM EDTA, 1mg/ml lisozima (de clara de huevo, Sigma). Se mantuvo a 0°C durante 45 min. y se centrifugó a 3.000 g, 10 min. El precipitado celular fue resuspendido en buffer 30mM Tris-HCl (pH 8), 20% sacarosa, 10mM MgSO_4 , 1mg/ml DNasa (de páncreas bovino, tipo IV, Sigma) y lisado utilizando una French Press. Las membranas totales fueron recuperadas luego de una centrifugación a 100.000 g durante 5 horas. El sobrenadante fue recuperado como la fracción citosólica. Las membranas internas se obtuvieron sometiendo las membranas totales a una centrifugación (16 horas a 68.000 g) sobre un colchón de sacarosa según lo descrito por Zorreguieta et al. (1985b).

Preparación de células permeabilizadas:

200 ml de cultivo en medio Luria en fase exponencial tardía, fueron centrifugados, y el precipitado lavado a 0°C cuatro veces con 5 ml de buffer 10 mM EDTA/Tris (pH 8). El precipitado fue resuspendido en el mismo buffer y congelado en nitrógeno líquido y descongelado tres veces inmediatamente antes de usar.

Ensayo in vitro para la síntesis de glucano $\beta(1-2)$ y marcación de la proteína intermediaria:

Membranas internas (200 ug de proteínas totales) fueron incubadas con 400 kcpm de UDP-[U- ^{14}C]glucosa (actividad específica 285.1 uCi/umol) en buffer 50 mM Tris-HCl (pH 8,2), 10 mM MgCl_2 en un volumen final de 50 ul, a 10°C durante 10 min. Cuando fue requerido, al cabo de los 10 min. de incubación se agregó UDP-glucosa no radioactiva (16 mM final) y se incubó durante 90 min. a igual temperatura. La reacción fue interrumpida por calentamiento a 100°C durante 3 min. Se agregó 300 ul de agua y se centrifugó 10 min. a 1.000 g. El sobrenadante se cromatografió en una columna de DEAE-Sephadex A-25 (0,5 x 3 cm) y la fracción no retenida (neutra) fue recuperada como glucano (Zorreguieta y Ugalde, 1986; Zorreguieta et al., 1985b). La estructura lineal o circular del glucano fue confirmada por incubación con la glicosidasa de intestino de caracol Glusulasa (Endo Laboratories Inc., Du Pont) bajo condiciones controladas: 16 h a 30°C bajo atmósfera de tolueno, en buffer acetato

MATERIALES Y METODOS

de sodio 10 mM pH 5.5, con 0,5 mg de enzima (Zorreguieta et al., 1985a). La fracción insoluble fue lavada con ác. tricloroacético 10%, desnaturalizada durante 2 min a 100°C con SDS 2%- β mercaptoetanol 2%-urea 8M, y sometida a una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. La tinción de proteínas y la fluorografía fue desarrollada según lo descrito por Zorreguieta y Ugalde (1986).

Ensayos in vitro para la síntesis de UDP-glucosa (actividad fosfoglucomutasa):

La síntesis in vitro de UDP-glucosa fue ensayada incubando extractos citosólicos (150 μ g de proteínas totales) en 50 μ l finales de una mezcla de reacción conteniendo buffer 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 8mM MgCl₂, 20 mM UTP y tres mezclas alternativas de sustratos: a) 180 kcpm de [U-¹⁴C]glucosa (actividad específica 300 uCi/ μ mol), glucose 1,6-bifosfato 2 mM, ATP 10mM; b) 60 kcpm de [U-¹⁴C]glucosa 6-fosfato (actividad específica 285 uCi/ μ mol), glucose 1,6-bifosfato 2 mM; c) 66 kcpm de [U-¹⁴C]glucosa 1-fosfato (actividad específica 322 uCi/ μ mol). Se incubó durante 30 min. a 37°C y se detuvo la reacción con el agregado de 100 μ l de etanol. Se centrifugó 5 min. a 3.000 g, y el sobrenadante se sometió a una cromatografía en papel con el solvente A. Los compuestos con movilidad similar a UDP-glucosa (P1) fueron eluidos y recromatografiados con el solvente B de modo de separar los azúcares bifosfato de los nucleótido-azúcares, los cuales fueron eluidos, hidrolizados con HCl 10mM a 100°C durante 10 min. (nucleótido-azúcares) o con fosfatasa alcalina (de *E.coli*, tipo III-S, Sigma) (azúcares bifosfato) y sometidos a una cromatografía en papel con el solvente C de modo de identificar las hexosas (García et al., 1974). Los compuestos con movilidad similar a las hexosas monofosfato con el solvente A (P2) fueron eluidos y sometidos a una hidrólisis ácida y a una cromatografía con el solvente C; en estas condiciones las hexosas 6-fosfato no son hidrolizadas y permanecen en el lugar de siembra, por lo que se las eluyó, hidrolizó con fosfatasa alcalina y recromatografió en el mismo solvente, permitiendo identificar y determinar la proporción de hexosas 6-fosfato y hexosas 1-fosfato. Se contó la radioactividad de cada compuesto recuperado y se refirió como porcentaje de la radioactividad total recuperada en la primer cromatografía.

Determinación de la actividad fosfomanomutasa:

El ensayo se realizó incubando extractos citosólicos y [U-¹⁴C]manosa 1-fosfato (actividad específica 285,1 uCi/ μ mol) como sustrato, según lo descrito anteriormente. Los compuestos con movilidad similar a hexosas monofosfato en cromatografías con el solvente A fueron analizados de igual modo que para la fosfoglucomutasa.

Determinación de la actividad UDP-Glucosa 4-epimerasa:

La epimerización reversible de UDP-glucosa a UDP-galactosa fue realizada incubando fracciones citosólicas (150 μ g de proteínas totales) en una mezcla de reacción conteniendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 8 mM MgCl y 300 kcpm de UDP-[U-¹⁴C]glucosa o UDP-[U-¹⁴C]galactosa (actividad específica 285,1 uCi/ μ mol en ambos casos) en un volumen final de 50 μ l. Se incubó durante 30 min. a 30°C y se detuvo la reacción con el agregado de 100 μ l de etanol. Se centrifugó 5 min. a 3.000 g, y el sobrenadante se sometió a una cromatografía en papel con el solvente A. Los compuestos con movilidad similar a UDP-hexosas fueron eluidos, sometidos a hidrólisis ácida y cromatografiados con el solvente C para identificar las hexosas, según lo descrito anteriormente.

La actividad UDP-glucosa 4-epimerasa fue determinada también por métodos espectrofotométricos, midiendo el incremento de absorción a 340 nm por la conversión de NAD⁺ en NADH mediante la reacción acoplada con la enzima UDP-glucosa dehidrogenasa utilizando UDP-galactosa como sustrato (Postma, 1977).

Determinación de las actividades galactoquinasa y galactosa 1-fosfato uridililtransferasa:

Los extractos citosólicos fueron incubados durante 30 min. a 30°C, en un volumen final de 50 μ l, con 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 8mM MgCl, 1 mM UTP, 1 mM UDP-glucosa y 300 kcpm de [1-¹⁴C]galactosa (actividad específica 55 uCi/ μ mol), 1mM ATP, para la determinación de la galactoquinasa o 80 kcpm de [U-¹⁴C]galactosa 1-fosfato (actividad específica 285,1 uCi/ μ mol) para la transferasa. Los productos de reacción fueron analizados por cromatografía en papel según lo descrito anteriormente para la fosfoglucomutasa.

Ensayos in vitro para la identificación del metabolismo de la galactosa:

Se incubaron extractos citosólicos (150 ug de proteínas totales) de *A.tumefaciens* A348 crecido en medio mínimo-galactosa 1%, en mezclas de reacción conteniendo buffer 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 8 mM MgCl₂, 2 mM NAD⁺ (o NADP⁺), 2 mM ATP y 50 kcpm de [1-¹⁴C]galactosa (actividad específica 55 uCi/umol) en un volumen final de 50 ul. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C durante una hora. Se agregó 100 ul de etanol y se centrifugó 5 min a 3.000 g. El sobrenadante se sometió a una electroforesis en papel con el buffer B. Los compuestos con movilidad similar a la galactosa (compuesto C1 o neutros) fueron eluidos y analizados por cromatografía en papel con el solvente D, comprobando que se trataba de galactosa y una pequeña fracción con movilidad similar a la gluconolactona. Este compuesto fue eluido, alcalinizado con NH₃ y recromatografiado con el mismo sistema, adquiriendo la movilidad del ácido galactónico. Los compuestos con movilidad similar a piruvato y C2 fueron eluidos y analizados por cromatografía en papel con los solventes C y D, confirmando su identidad como ác. pirúvico y ác. galactónico, respectivamente. C3 mostró movilidades cercanas al estándar de ác. 2-ceto glucónico en ambos sistemas cromatográficos. C4 presentó muy baja movilidad en ambos sistemas; una vez tratado con fosfatasa alcalina (de *E.coli*, tipo III-S, Sigma; García et al, 1974), adquirió la movilidad del compuesto C3 en todos los sistemas anteriores.

Determinación de la actividad galactosa dehidrogenasa:

Se determinó espectrofotométricamente según lo descrito por Arias y Cerveñansky (1986) monitoreando a 340 nm la reducción de NAD⁺ a NADH, incubando a temperatura ambiente los extractos citosólicos y galactosa como sustrato.

Determinación de la actividad galactonato dehidratasa:

Se determinó por el método de la semicarbazona según lo descrito por Dahms et al. (1982). Los extractos citosólicos y el sustrato (galactonato de sodio) se incubaron 30 min. a temperatura ambiente. La reacción se interrumpió por el agregado del reactivo de semicarbazida, y luego de 15 min. se midió la absorbancia a 250 nm.

Determinación de la actividad 6-fosfo 2-ceto 3-deoxigalactonato aldolasa:

Debido a la no disponibilidad del sustrato (ác. 6-fosfo 2-ceto 3-deoxigalactónico), se recurrió a un método indirecto, acoplado la reacción con la reducción de piruvato a lactato mediante la enzima lactato dehidrogenasa. La mezcla de reacción, en un volumen final de 0,5 ml, conteniendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 8 mM MgCl₂, extracto citosólico, 2 mM ATP, 10 mM galactonato de sodio, 0,2 mM NADH y lactato dehidrogenasa (9 U), fue incubada a temperatura ambiente en una cubeta UV, monitoreándose la reducción del piruvato producido, por la disminución de la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Gilford Response II.

Determinación de la actividad ADP-glucosa sintetasa:

La pirofosforólisis de ADP-glucosa (reacción inversa, ADP-glucosa pirofosforilasa, EC 2.7.7.27) fue seguida por la formación de [³²P]ATP a partir de ADP-glucosa y [32P]PPi (pirofosfato), en mezclas de reacción conteniendo buffer 80mM Tris-HCl (pH 8,5), 8 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 100ug de albúmina bovina, 2 mM [³²P]PPi (3000 cpm/nmol), 1,6 mM ADP-glucosa y extractos citosólicos, en un volumen final de 0,25 ml. La reacción se incubó 10 min a 37°C, se interrumpió con 3 ml de ác. tricloroacético 5% frío y el [³²]ATP formado fue medido según lo descrito por Shen y Preiss (1964).

Ensayos in vitro para la síntesis de lípido-azúcares intermediarios:

Las células permeabilizadas (1 mg de proteínas totales) fueron incubadas 30 min. a 10°C con 70 mM Tris-HCl (pH 8,2), 12 mM MgCl₂ y 300 kcpm de UDP-[U-¹⁴C]glucosa o UDP-[U-¹⁴C]galactosa (actividad específica 285.1 uCi/umol en ambos casos) en un volumen final de 50 ul. Cuando fue necesario se agregó UDP-galactosa 1 mM. La reacción se paró con 1 ml de Tris-HCl 10 mM. Se centrifugó, el precipitado se lavó dos veces con el mismo buffer y se extrajo dos veces con cloroformo/metanol/agua (1:1:0,3). Esta fracción, que contiene los lípido-oligosacáridos intermediarios

MATERIALES Y METODOS

se la denominó extracto 1103. Fue evaporada, hidrolizada a 100°C, 10 min. con HCl 10 mM y sometida a una cromatografía en capa delgada (TLC) con el solvente E (Staneloni et al., 1984).

Cromatografías y electroforesis:

Las cromatografías descendentes en papel fueron desarrolladas sobre papel Whatman 1 con los siguientes solventes:

A: etanol/ acetato de amonio 1M (pH 3,8), 5:2 v/v (Paladini y Leloir, 1952).

B: etanol/ acetato de amonio 1M (pH 7,4), 5:2 v/v (Paladini y Leloir, 1952).

C: 1-butanol/ piridina/ agua, 6:4:3 v/v (Jeanes et al., 1951).

D: isopropanol/ác. acético/agua, 27:4:9 v/v (Tung y Nordin, 1968).

Las electroforesis en papel se desarrollaron durante dos horas a 20 V/cm con:

Buffer A: borato de sodio 50 mM, pH 9,2 (Forster, 1957).

Buffer B: acetato de piridina 1,2 M, pH 6,5 (García et al., 1974).

La radioactividad fue detectada con un radiocromatógrafo Scanner Model 7201 (Packard).

Las cromatografías en capa delgada (TLC) fueron desarrolladas sobre sílica gel 60 (0,25 mm, Merck) con el solvente E (1-propanol/ nitrometano/ agua, 5:2:2). La radioactividad fue detectada por autorradiografía.

El estandar de UDP-glucosa fue observado bajo luz ultravioleta; los de hexosas y hexosas fosfato, por los métodos de Trevelyan et al. (1950) y Burrows et al. (1952) respectivamente.

Determinación del contenido endógeno de nucleótido-azúcares:

Cepas de *A.tumefaciens* fueron crecidas hasta fase exponencial en 200 ml de medio Albersheim modificado. Las células se recuperaron por centrifugación a 6.000 g por 15 min., se lavaron dos veces con el mismo medio y se resuspendieron en 1/100 de volumen de igual medio conteniendo glucosa 20 mM. Se incubaron 10 min. con energética agitación, se agregó ácido fórmico hasta una concentración final de 10% agitando con vortex durante 30 segundos y se guardó durante una noche a -20°C. La suspensión fue descongelada, centrifugada, y el sobrenadante liofilizado, para eliminar el ácido fórmico. El liofilizado fue disuelto en 300 ul de agua y sometido a una cromatografía de HPLC (Pharmacia-LKB System) usando una columna (4,6 x 250 mm) Ultrasphere 5 um ODS (Beckman) (Payne y Ames, 1982). Se eluyó con buffer 40 mM trietilamina/H₃PO₄ (pH 6,5). Los nucleótido-azúcares fueron localizados con un detector de UV a 260 nm.

Transformación de bacterias:

Los plásmidos fueron introducidos en *A.tumefaciens* desde *E.coli* HB101, mediante conjugaciones triparentales, utilizando la cepa *E.coli* HB101/pRK2073 como auxiliar (Leong et al., 1982).

En *E.coli*, los plásmidos fueron introducidos por electroporación, utilizando un Gene Pulser Transfection Apparatus (Bio-Rad), según las especificaciones de los fabricantes.

Métodos de recombinación de DNA:

El plásmido pFC6251 fue digerido con la enzima de restricción *Xho*I, produciéndose fragmentos de DNA de 13, 10, 6,5 y 1,7 kbases. Cada fragmento fue recuperado del gel de agarosa, ligado al vector pVK102 digerido con la misma enzima y electroporado en *E.coli* HB101. Los recombinantes fueron seleccionados por su resistencia a la tetraciclina y sensibilidad a la kanamicina. Las cepas recombinantes conteniendo cada construcción, fueron conjugadas con *A.tumefaciens* A5129 y los transconjugantes fueron seleccionados sobre placas de medio Luria conteniendo tetraciclina, neomicina y Cellufluor White. Las colonias que presentaron fluorescencia azul-verdosa bajo luz UV, fueron recuperadas.

El plásmido pX1089, conteniendo un fragmento de 10 kbases fue digerido con la enzima de restricción *Hind*III, produciéndose fragmentos de DNA de 3,5 y 2,4 kbases, los que fueron ligados a pVK102 digerido con la misma enzima. La obtención de cepas transconjugantes de *A.tumefaciens* y la selección de cepas fluorescentes se realizó como anteriormente.

Todas las enzimas de restricción y la T4 DNA ligasa se utilizaron según lo especificado por los fabricantes. Los métodos utilizados han sido descriptos por Maniatis et al. (1982).

MATERIALES Y METODOS

Secuenciación de DNA:

Fragmentos de restricción provenientes de pH21 y pX1089 fueron clonados en los plásmidos Bluescript II KS+ y SK+ (Stratagene) en ambas orientaciones e introducidos en *E. coli* DH5 α FIQ. Se realizaron minipreparaciones de DNA doble cadena (Maniatis et al., 1982) o simple cadena por inducción con el fago R408 (Russel et al., 1986) y se secuenciaron por el método de los dideoxinucleótidos de Sanger et al. (1977), con Sequenase version 2.0 (United States Biochemical Corp.).

Las secuencias de DNA y proteínas fueron analizadas con el programa de computación personal DNA Strider. La búsqueda de homología con secuencias conocidas se llevó a cabo en el NCBI, usando el servicio BLAST network.

Las proteínas homólogas fueron alineadas usando el programa DNASTAR, mediante el algoritmo desarrollado por Lipman y Pearson (1985).

Mapeo de la inserción Tn5:

Se realizaron amplificaciones por PCR sobre DNA cromosomal de *A. tumefaciens* A348 y A5129 (*exoC::Tn5*) con los oligonucleótidos 5'-GCGATCATTCCTC-3' (oligo A) que corresponde a las bases 2409 a 2426 de la Figura 19, sobre el ORF2 o 5'-GATCGGCAGCTTCAAGG-3' (oligo B) que corresponde a las bases 3246 a 3262 de la Figura 19, sobre el ORF3 y el oligonucleótido 5'-CTGGAAAACGGGAAAGTTCCG-3' complementario a las bases 30 a 52 (oligo 5) del extremo del transposón Tn5 (Auerswald et al., 1981). Las reacciones de amplificación se realizaron en 100 μ l de volumen final usando buffer, reactivos y condiciones recomendadas por Perkin-Elmer Cetus, utilizando un ciclador térmico de la misma marca. Una desnaturalización inicial de 5 min. fue seguida de 30 ciclos de desnaturalización de 30 seg. a 94°C, 1 min. de hibridización a 55°C y 2 min. de polimerización a 72°C. El producto de la amplificación fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 1%. El fragmento de DNA de 830 bases amplificado fue mapeado por digestión con las siguientes enzimas de restricción: *Ava*II, *Bcl*II, *Bgl*II, *Bsr*NI, *Eag*I y *Stu*I. El tamaño de los fragmentos de restricción fueron estimados sobre un gel de poliacrilamida de 8% (Maniatis et al., 1982).

Número de acceso de la secuencia de nucleótidos:

Los datos de secuencia de nucleótidos presentados en esta tesis han sido enviados a la base de datos GenBank, y se les ha asignado el número de acceso L24117.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, M., Amemura, A. y Higashi, S.** 1982. *Plant Soil* **64**: 315-324.
- Adhya, S.** 1987. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, y H.E. Umbarger (editores). Vol. 2. Pág. 1503-1512. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Aman, P., McNeil, M., Franzen, L., Darvill, A.G. y Albersheim, P.** 1981. *Carbohydr. Res.* **95**: 263-282.
- Amemura, A., Hisamatsu, M., Ghai, S.K. y Harada, T.** 1981. *Carbohydr. Res.* **91**: 59-65.
- Arias, A. y Cervenansky, C.** 1986. *J.Bacteriol.* **167**: 1092-1094.
- Arthur, L.O., Bulla, L.A., St. Julian, G. y Nakamura, L.K.** 1973. *J.Bacteriol.* **116**: 304-313.
- Auerswald, E.A., Ludwig, G. y Schaller, H.** 1981. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **45**: 107-113.
- Bachmann, B.J.** 1983. *Microbiol. Rev.* **47**: 180-230.
- Baecker, P.A., Furlong, C.E. y Preiss, J.** 1983. *J. Biol. Chem.* **258**: 5084-5088.
- Baecker, P.A., Greenberg, E. y Preiss, J.** 1986. *J. Biol. Chem.* **261**: 8738-8743.
- Battisti, L., Lara, J.C. y Leigh, J.A.** 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5625-5629.
- Bhat, U.R., Mayer, H., Yokota, A., Hollingsworth, R.I. y Carlson, R.W.** 1991. *J. Bacteriol.* **173**: 2155-2159
- Binns, A.N. y Thomashow, M.F.** 1988. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**: 575-606.
- Bolivar, F. y Backman, K.** 1979. *Methods Enzymol.* **68**: 245
- Brewin, N.J.** 1991. *Ann. Rev. Cell Biol.* **7**: 191-226.
- Buendia, A.M., Enenkel, B., Koplín, R., Niehaus, K., Arnold, W. y Puhler, A.** 1991. *Mol. Microbiol.* **5**: 1519-1530.
- Burrows, S., Grills, F.S.M. y Harrison, J.S.** 1952. *Nature (London)* **170**: 800-801.
- Cangelosi, G.A., Hung, L., Puvanesarajah, V., Stacey, G., Ozga, A.D., Leigh, J.A. y Nester, E.W.** 1987. *J. Bacteriol.* **169**: 2086-2091.
- Cangelosi, G.A., Martinetti, G. y Nester, E.W.** 1990. *J.Bacteriol.* **172**: 2172-2174.
- Cangelosi, G.A., Martinetti, G., Leigh, J.A., Lee, C.C., Theines, C. y Nester, E.W.** 1989. *J.Bacteriol.* **171**: 1609-1615.
- Canter-Cremers, H.C.J., Batley, M., Redmond, J.W., Eydem, L., Breedveld, M.W., Zevenhuizen, L.P.T.M., Pees, E., Wijffelman, C.A. y Lugtenberg, B.J.J.** 1990. *J. Biol. Chem.* **265**: 21122-21127.
- Cavaignac, S.** 1988. Tesis doctoral. Universidad de Río Cuarto.
- Close, T.J., Rogowsky, P.M., Kado, C.I., Winans, S.C., Yanofsky, M.F. y Nester, E.W.** 1987. *J.Bacteriol.* **169**: 5113-5118.
- Clover, R.H., Kieber, J. y Signer, E.R.** 1989. *J.Bacteriol.* **171**: 3961-3967.

BIBLIOGRAFIA

- Coira, J.A., Cavaignac, S. y Ugalde, R.A. 1987. *J. Biol. Chem.* **262**: 10601-10607.
- Dahms, A.S., Sibley, D., Huisman, W. y Donald, A. 1982. *Methods Enzymol.* **90**: 294-298.
- Deacon, J. y Cooper, R.A. 1977. *FEBS Letters* **77**: 201-205.
- DeLey, J. y Doudoroff, M. 1957. *J. Biol. Chem.* **227**: 745-757.
- Dell, A., York, W.S., McNeil, M., Darvil, A.G. y Albersheim, P. 1983. *Carbohydr. Res.* **117**: 185-200.
- Dénarié, J., Debellé, F. y Rosenberg, C. 1992. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**: 497-531.
- Dische, Z. 1962. *Methods Carbohydr. Chem.* **1**: 478-492.
- Doherty, D., Leigh, J.A., Glazebrook, J. y Walker, G.C. 1988. *J. Bacteriol.* **170**: 4249-4256.
- Doudoroff, M., DeLey, J., Palleroni, N.J. y Weimberg, R. 1956. *Federation Proc.* **15**: 244.
- Douglas, C.J., Staneloni, R.J., Rubin, R.A. y Nester, E.W. 1985. *J. Bacteriol.* **161**: 850-860.
- Dylan, T., Helinski, D.R. y Ditta, G.S. 1990. *J. Bacteriol.* **172**: 1400-1408.
- Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E.W., Helinski, D.R. y Ditta, G.S. 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 4403-4407.
- Entner, N. y Doudoroff, M. 1952. *J. Biol. Chem.* **196**: 853-862.
- Fein, J.E. 1979. *J. Bacteriol.* **137**: 933-946.
- Finan, T.M., Hirsch, A.M., Leigh, J.A., Johansen, E., Kuldau, G.A., Deegan, S., Walker, G.C. y Signer, E.R. 1985. *Cell* **40**: 869-877.
- Forster, A.B. 1957. *Advan. Carb. Chem.* **12**: 81.
- Gabriel, O. 1987. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, y H.E. Umbarger (editores). Vol. 1. Pág. 504-511. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- García, R.C., Recondo, E. y Dankert, M. 1974. *Eur. J. Biochem.* **43**: 93-105.
- Garfinkel, D.J., Simpson, R.B., Ream, L.W., White, F.F., Gordon, M.P., y Nester, E.W. 1981. *Cell* **27**: 143-153.
- Geremia, R.A., Cavaignac, S., Zorreguieta, A., Toro, N., Olivares, J. y Ugalde, R.A. 1987. *J. Bacteriol.* **169**: 880-884.
- Gharyal, P.K., Ho, S.-C., Wang, J.L. y Schindler, M. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**: 12119-12121.
- Glazebrook, J., y Walker, G.C. 1989. *Cell* **56**: 661-672.
- Glucksmann, M.A., Reuber, T.L. y Walker, G.C. 1993a. *J. Bacteriol.* **175**: 7033-7044.
- Glucksmann, M.A., Reuber, T.L. y Walker, G.C. 1993b. *J. Bacteriol.* **175**: 7045-7055.
- Gray, J.X. y Rolfe, B.G. 1990. *Mol. Microbiol.* **4**: 1425-1431.
- Harada, T. y Amemura, A. 1981. *Mem. Inst. Scient. Industr. Res. Osaka Univ.* **38**: 37-49.
- Harada, T., Misaku, A. y Saito, H. 1968. *Arch. Biochem. Biophys.* **124**: 292-298.
- Her, G.-R., Glazebrook, J., Walker, G.C. y Reinhold, V.N. 1990. *Carbohydr. Res.* **198**: 305-312.
- Hisamatsu, M., Abe, J., Amemura, A. y Harada, T. 1980. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 1049-1055.
- Ielpi, L., Dylan, T., Ditta, G.S., Helinski, D.R. y Stanfield, S.W. 1990. *J. Biol. Chem.* **265**: 2843-2851.
- Iñon de Iannino, N. y Ugalde, R.A. 1989. *J. Bacteriol.* **171**: 2842-2849.

BIBLIOGRAFIA

- Jeanes, A., Wise, L.S. y Dimler, R.J. 1951. *Anal. Chem.* **23**: 415-420.
- Jessee, J. y Blodgett, K. 1988. *Focus* **10**: 69.
- John, M., Schmidt, J., Wieneke, U., Krussmann, H.-D. y Schell, J. 1988. *EMBO J.* **7**: 583-588.
- Johnson, D., Roth, L.E. y Stacey, G. 1989. *J.Bacteriol.* **171**: 4583-4588.
- Jordan, D.C. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. N.R. Krieg y J.G. Holt (editores). Vol. 1. Pág. 234-256.
- Joshi, J.G. y Handler, P. 1964. *J.Biol. Chem.* **239**: 2741-2751.
- Kannenbergh, E.L. y Brewin, N.J. 1989. *J. Bacteriol.* **171**: 4543-4548.
- Kennedy, E.P. 1982. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 1092-1095.
- Knauf, V.C. y Nester, E.W. 1982. *Plasmid* **8**: 45-54.
- Koizumi, K., Okada, Y., Horiyama, S., Utamura, T., Higashiura, T. y Ikeda, M. 1984a. *J. Inclusion Phenomena* **2**: 891-899.
- Koizumi, K., Okada, Y., Utamura, T., Hisamatsu, M. y Amemura, A. 1984b. *J. Chromatogr.* **299**: 215-224.
- Koplin, R., Arnold, W., Hotte, B., Simon, R., Wang, G. y Puhler, A. 1992. *J.Bacteriol.* **174**: 191-199.
- Kumar, A., Larsen, C.E. y Preiss, J. 1986. *J. Biol. Chem.* **261**: 16256-16259.
- Leigh, J.A. y Coplin, D.L. 1992. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**: 307-346
- Leigh, J.A. y Lee, C.C. 1988. *J.Bacteriol.* **170**: 3327-3332
- Leigh, J.A., Signer, E.R. y Walker, G.C. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6231-6235.
- Leigh, J.A., Reed, J.W., Hanks, J.F., Hirsch, A.M. y Walker, G.C. 1987. *Cell* **51**: 579-587.
- Leong, S.A., Ditta, G.S. y Helinski, D.R. 1982. *J. Biol. Chem.* **257**: 8724-8730.
- Lepek, V. 1993. I.I.B. Fundación Campomar. Comunicación personal.
- Lessie, T.G. y Phibbs, P.V. 1984. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**: 359-387
- Leung, P.S.C. y Preiss, J. 1987. *J.Bacteriol.* **169**: 4355-4360.
- Leverly, S.B., Zhan, H., Lee, C.C., Leigh, J.A. y Hakomori, S. 1991. *Carbohydr. Res.* **210**: 339-347.
- Liners, F., Letesson, J.J., Didembourg, C. y van Cutsem, P. 1989. *Plant Physiol.* **91**: 1419-1424.
- Lipman, D.J. y Pearson, W.R. 1985. *Science* **227**: 1435-1440.
- Lugtenberg, B.J.J., Díaz, C., Smit, G., de Pater, S. y Kijne, J.W. 1991. *Adv. Mol. Gen. Plant-Microbe Interac.* H. Hennecke y D.P.S. Verma (editores). Vol. 1. Pág. 174-181. Kluwer Acad. Publishers. Netherlands.
- Madsen, N.B. 1961. *Biochim. Biophys. Acta* **50**: 194-195.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Marks, J.R., Lynch, T.J., Kalinsey, J.E. y Thomashow, M.F. 1987. *J.Bacteriol.* **169**: 5835-5837.
- Matthysse, A.G. 1983. *J.Bacteriol.* **154**: 906-915.
- Maxwell, E.S., Kurahashi, K. y Kalckar, H.M. 1962. *Methods Enzymol.* **5**: 174-189.
- Miller, K.J., Gore, R.S., Johnson, R. y Benesi, A.J. 1988. *J.Bacteriol.* **170**: 4569-4575.

BIBLIOGRAFIA

- Miller, K.J., Kennedy, E.P. y Reinhold, V.N., 1986. *Science* **231**: 48-51.
- Miller, K.J., Reinhold, V.N., Weissborn, A.C. y Kennedy, E.P. 1987. *Biochim. Biophys. Acta* **901**: 112-118.
- Morris, V.J., Brownsey, G.J., Chilvers, G.R., Harris, J.E., Gunning, A.P. y Stevens, B.J.H. 1991. *Food Hydrocoll.* **5**: 185-188.
- Morris, V.J., Brownsey, G.J., Harris, J.E., Gunning, A.P. y Stevens, B.J.H. 1989. *Carbohydr. Res.* **191**: 315-320.
- Najjar, V.A. 1962. *The Enzymes* **6**: 161-178.
- Napoli, C., Dazzo, F. y Hubbell, D. 1975. *App. Microbiol.* **30**: 123-131.
- Paladini, A.C. y Leloir, L.F. 1952. *Biochem. J.* **51**: 426-430.
- Payne, S.M. y Ames, B.N. 1982. *Anal. Biochem.* **123**: 151-161.
- Postma, P.W. 1977. *J.Bacteriol.* **129**: 630-639.
- Preiss, J. 1984. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**: 419-458.
- Puhler, A. et al. 1991. *Adv. Mol. Gen. Plant-Microbe Interac.* H. Hennecke y D.P.S. Verma (editores). Vol. 1. Pág. 189-194. Kluwer Acad. Publishers. Netherlands.
- Puvanesarajah, V., Schell, F.M., Stacey, G., Douglas, C.J. y Nester, E.W. 1985. *J.Bacteriol.* **164**: 102-106.
- Ray, W.J., Jr., Hermodson, M.A., Puvathingal, J.M. y Mahoney, W.C. 1983. *J.Biol. Chem.* **258**: 9166-9174.
- Ray, W.J., Jr. y Peck, E.J., Jr. 1972. *The Enzymes VI*: 407-477.
- Reed, J.W., Capage, M y Walker, G.C. 1991a. *J.Bacteriol.* **173**: 3776-3788.
- Reed, J.W., Glazebrook, J. y Walker, G.C. 1991b. *J.Bacteriol.* **173**: 3789-3794.
- Reed, J.W. y Walker, G.C. 1991. *J.Bacteriol.* **173**: 664-677.
- Reuber, T.L., Long, S. y Walker, G.C. 1991. *J.Bacteriol.* **173**: 426-434.
- Reuber, T.L. y Walker, G.C. 1993a. *J.Bacteriol.* **175**: 3653-3655.
- Reuber, T.L. y Walker, G.C. 1993b. *Cell* **74**: 269-280.
- Robertsen, B.K., Aman, P., Darvill, A.G., McNeil, M. y Albersheim, P. 1981. *Plant Physiol.* **67**: 389-400.
- Ronson, C.W. y Primrose, S.B. 1979. *J.Gen. Microbiol.* **112**: 77-88.
- Russel, M., Kidd, S. y Kelley, M.R. 1986. *Gene* **45**: 333-338.
- Salkinoja-Salonen, M. y Boeck, R. 1978. *J.Gen. Microbiol.* **105**: 119-125.
- Sanderson, K.E. y Roth, J.R. 1983. *Microbiol. Rev.* **47**: 410-453.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Carlson, A.R. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schneider, J.E., Reinhold, V., Rumley, M.K. y Kennedy, E.P. 1979. *J.Biol. Chem.* **254**: 10135-10138.
- Shen, L. y Preiss, J. 1964. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17**: 424-429.
- Smit, G., Logman, T.J.J., Boerrigter, M.E.T.I., Kijne, J.W. y Lugtenberg, B.J.J. 1989. *J. Bacteriol.* **171**: 4054-4062.
- Staneloni, R.J., Tolmasky, M.E. y Leloir, L.F. 1984. *J.Gen. Microbiol.* **130**: 869-879.

BIBLIOGRAFIA

- Stanfield, S.W., Ielpi, L., O'Brochta, D., Helinski, D.R. y Ditta, G.S. 1988. *J.Bacteriol.* **170**: 3523-3530.
- Stouthamer, A.H. 1961. *Biochim. Biophys. Acta* **48**: 484-500.
- Swart, S., Smit, G., Lugtenberg, B.J.J. y Kijne, J.W. 1993. *Mol. Microbiol.* **10**: 597-605.
- Thomashow, M.F., Karlinsey, J.E., Marks, J.R. y Hurlbert, R.E. 1987. *J.Bacteriol.* **169**: 3209-3216.
- Tolmasky, M.E., Staneloni, R.J. y Leloir, L.F. 1980. *A.Biochem. Biophys.* **203**: 358-364
- Tolmasky, M.E., Staneloni, R.J. y Leloir, L.F. 1982. *J.Biol. Chem.* **257**: 6751-6757.
- Trevelyan, W.F., Procter, D.P. y Harrison, J.S. 1950. *Nature (London)* **166**: 444-445.
- Tung, K.K. y Nordin, J.H. 1968. *Biochim. Biophys. Acta* **158**: 154-156.
- Ugalde, R.A., Coira, J.A. y Brill, W.J. 1986. *J.Bacteriol.* **168**: 270-275.
- Uttaro, A.D., Cangelosi, G.A., Geremia, R.A., Nester, E.W. y Ugalde, R.A. 1990. *J.Bacteriol.* **172**: 1640-1646.
- Uttaro, A.D., Ielpi, L. y Ugalde, R.A. 1993. *J.Gen. Microbiol.* **139**: 1055-1062.
- Vardanis, A. y Hochster, R.M. 1961. *Can. J. Biochem. Physiol.* **39**: 1165-1182.
- Weickert, M.J. y Adhya, S. 1993. *Mol. Microbiol.* **10**: 245-251.
- Whitehouse, D.B., Putt, W., Lovegrove, J.U., Morrison, K., Hollyoake, M., Fox, M.F., Hopkinson, D.A. y Edwards, Y.H. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 411-415.
- Wilson, D.B. y Hogness, D.S. 1964. *J.Biol. Chem.* **239**: 2469-2481.
- Williams, M.N.V., Hollingsworth, R.I., Klein, S. y Signer, E.R. 1990. *J.Bacteriol.* **172**: 2622-2632.
- Winans, S.C. 1992. *Microbiol. Rev.* **56**: 12-31.
- York, W.S., McNeil, M., Darvill, A.G. y Albersheim, P. 1980. *J.Bacteriol.* **142**: 243-248.
- Young, R.A. y Davis, R.W. 1983. *Science* **222**: 778-782.
- Young, J.M., Takikawa, Y., Gardan, L. y Stead, D.E. 1992. *Ann. Rev. Phytopathol.* **30**: 67-105.
- Yu, N., Hisamatsu, M., Amemura, A. y Harada, T. 1983. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 491-498.
- Zambryski, P.C. 1992. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**: 465-490.
- Zevenhuizen, L.P.T.M. 1981. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **47**: 481-497.
- Zevenhuizen, L.P.T.M. y Faleschini, P. 1991. *Carbohydr. Res.* **209**: 203-209.
- Zevenhuizen, L.P.T.M., Scholten-Koerselman, J. y Posthumus, M.A. 1980. *Arch. Microbiol.* **125**: 1-8.
- Zhan, H., Lee, C.C. y Leigh, J.A. 1991. *J.Bacteriol.* **173**: 7391-7394.
- Zhan, H., Levery, S.B., Lee, C.C. y Leigh, J.A. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3055-3059.
- Zorreguieta, A., Cavaignac, S., Geremia, R.A. y Ugalde, R.A. 1990. *J.Bacteriol.* **172**: 4701-4704.
- Zorreguieta, A., Geremia, R.A., Cavaignac, S., Cangelosi, G.A., Nester, E.A. y Ugalde, R.A. 1988. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**: 121-127.
- Zorreguieta, A., Tolmasky, M.E. y Staneloni, R.J. 1985a. *Arch. Biochem. Biophys.* **238**: 368-372.
- Zorreguieta, A. y Ugalde, R.A. 1986. *J.Bacteriol.* **167**: 947-951.
- Zorreguieta, A., Ugalde, R.A. y Leloir, L.F. 1985b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**: 352-357.