

## Tesis Doctoral

# Biosíntesis y estructura de exopolisacáridos complejos de *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti* y *Acetobacter xilinum*

Semino, Carlos Eduardo

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](http://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 Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Semino, Carlos Eduardo. (1994). Biosíntesis y estructura de exopolisacáridos complejos de *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti* y *Acetobacter xilinum*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n2627\\_Semino](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n2627_Semino)

**Cita tipo Chicago:**

Semino, Carlos Eduardo. "Biosíntesis y estructura de exopolisacáridos complejos de *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti* y *Acetobacter xilinum*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n2627\\_Semino](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n2627_Semino)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**BIOSINTESIS Y ESTRUCTURA DE EXOPOLISACARIDOS COMPLEJOS DE**  
*Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti* y  
*Acetobacter xilinum*.

**Autor: Carlos Eduardo Semino**

**Director: Marcelo Alberto Dankert**

**Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundacion Campomar"**  
**Buenos Aires, Argentina.**

**TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR DE LA  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
(Orientación en Ciencias Químicas)**

≈ 1994 ≈

1-2627  
h2

*A Santiago y Alejandra*

## *AGRADECIMIENTOS*

*-A los miembros integrantes de la Comisión Directiva del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", por darme la posibilidad de realizar este trabajo de Tesis.*

*-Al director de esta Tesis, Dr. Marcelo Dankert, por su constante dirección y enseñanzas.*

*-A mi hermosa y amada mujer, Alejandra, y a mi hermoso y amado hijo de casi tres años, Santiaguito, por brindarme su infinito amor.*

*-A mis queridos padres, Omi y Carlos, y a mis dos mejores hermanas de las dos que tengo, Mercedes y Mariana, por estar siempre a mi lado y apoyarme.*

*-A mis compañeros y amigos del I.I.B. por acompañarme en las buenas y en las malas, Verónica Morvillo, Alejandro Petroni, Antonio Uttaro, Silvia Altabe, Cristina Bertinetti, Carmela Sidrauski, Songeli Meneses Freire, Angeles Zorreguieta, Armando Parodi, Olga Castro, Federico Katzen, Verónica Pascuccelli, Fabiana Fernández, Sandra Fernández, Marta Bravo, Patricia Domínguez, Susana Raffo, Amy Curto, Griselda Sourigues, Vanina Luciano, Alejandra Guerchicoff, Guido Pollevick, Oscar Campetella, Silvana Merello, Vivian Alvarez, Karin Hagelin y Roberto Rodríguez Suárez.*

*-A Luis y Marcela Millara por su colaboración en la realización de las fotos y gráficos presentados en esta Tesis.*

*-A Soledad Giménez y a Margarita Mazzardi y a todo el personal de apoyo del Instituto y al personal de Biblioteca, por su constante colaboración.*

*-Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", a la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, al CONICET, a "SHELL CAPSA (Compañía Argentina de Pétroleo S.A.), a la Swedish Agency for Research Cooperation with Developing Countries (SAREC) y al Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación, Secretaría de Salud Pública, por el aporte económico que permitió llevar a cabo este trabajo.*

## INDICE DE TEMAS

	Página
<b>-Resumen</b>	<b>I</b>
<b>I.Introducción</b>	<b>1</b>
-Polisacáridos bacterianos, localización, estructura y función	1
-Generalidades	1
1) Citoplasma	2
-Glucógeno	2
-Biosíntesis del glucógeno bacteriano	3
-Regulación de la síntesis del glucógeno	4
2) Membrana interna y Periplasma	5
-Glucanos y MDO	5
-Glicolípidos de membrana interna	7
3) Cubierta celular	9
<b>3.a) Pared celular, Mureina o peptidoglicano</b>	<b>10</b>
-Biosíntesis del peptidoglicano	12
<b>3.b) Membrana externa</b>	<b>15</b>
-Lipopolisacáridos (LPS)	15
-Heterogeneidad del LPS	17
-Biosíntesis del LPS	18
-Genes involucrados en la síntesis del LPS	19
-Antígenos comunes de enterobacterias (ECA)	20
-Biosíntesis de los ECA	21
-Acidos teicoicos	21
4) Cápsula	23
5) Exterior celular	27
-Exopolisacáridos	27
-Homoexopolisacáridos	27
a) Bacterio-celulosa	27
b) Dextranos y levanos	28
-Heteroexopolisacáridos (EPS)	28
-Biosíntesis de los EPS	31
-Fijación de Nitrógeno	34
-Proceso de infección y establecimiento del nódulo	34
-Estructura de los factores Nod	38

-Genes de nodulación (genes Nod)	38
-Organización y regulación de los genes requeridos para la fijación de nitrógeno atmosférico (N <sub>2</sub> )	41
-Control del Nitrógeno	43
-Control del Oxígeno	43
-Genes involucrados en la síntesis del succinoglicano	44
-Regulación de la síntesis de los EPS	45
<b>II. Antecedentes y Objetivos</b>	<b>48</b>
-Características de las cepas utilizadas en este trabajo	51
<b>III. Materiales y Métodos</b>	<b>54</b>
III.1. Cepas bacterianas empleadas	54
III.2. Mantenimiento de las células	55
III.3. Ensayo de Nodulación	55
III.4. Medios de cultivo y preparación de células	59
III.5. Células ayunadas	60
III.6.a. Preparación de células tratadas con EDTA	60
III.6.b. Incubación estándar con células tratadas con EDTA	60
III.6.c. Electroporación de células y condiciones de incubación	61
III.6.d. Incubación en dos etapas	61
III.7. Fraccionamiento de los productos de incorporación	62
III.8. Obtención de polisacáridos	63
III.8.a. Obtención de polisacáridos solubles, presentes en el medio de cultivo	63
III.8.b. Obtención de glucanos periplásmicos	64
III.8.c. Obtención de celulosa de cultivos de <i>Acetobacter xylinum</i>	64
III.9. Método rápido de detección de presencia de polisacáridos radioactivos en los sobrenadantes de incubación: Precipitación con polisacárido portador no radioactivo	65

<b>III.10. Tratamientos degradativos</b>	<b>65</b>
<b>III.10.a. Hidrólisis ácida suave de lípido-azúcares</b>	<b>65</b>
<b>III.10.b. Hidrólisis ácida parcial o total de oligo o polisacáridos</b>	<b>66</b>
<b>III.10.c. Deacilación de oligosacáridos</b>	<b>66</b>
<b>III.10.d. Depiruvilación de oligo o polisacáridos</b>	<b>66</b>
<b>III.10.e. Reducción con Boohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>)</b>	<b>66</b>
<b>III.10.f. Ensayo de Permetilación</b>	<b>67</b>
-Reactivos	<b>67</b>
<b>III.10.f.1. Permetilación de mono y oligosacáridos</b>	<b>67</b>
-Hidrólisis del material permetilado	<b>68</b>
<b>III.10.f.2. Permetilación de polisacáridos</b>	<b>68</b>
-Hidrólisis del material permetilado	<b>69</b>
<b>III.10.f.3. Permetilación de oligosacáridos conteniendo ácidos glucurónicos radioactivos</b>	<b>69</b>
<b>III.11. Métodos analíticos</b>	<b>69</b>
<b>III.12. Tratamientos enzimáticos</b>	<b>70</b>
<b>III.12.a. Tratamiento con fosfatasa alcalina</b>	<b>70</b>
<b>III.12.b. Tratamiento con <math>\beta</math>-glucuronidasa de intestino de caracol</b>	<b>70</b>
<b>III.12.c. Tratamiento con <math>\alpha</math>-amilasa</b>	<b>70</b>
<b>III.13. Cromatografías</b>	<b>70</b>
<b>III.13.a. Cromatografías en columnas de DEAE-celulosa</b>	<b>70</b>
<b>III.13.b. Cromatografías en Sephadex LH-20</b>	<b>71</b>
<b>III.13.c. Filtración por columnas de geles</b>	<b>71</b>
<b>III.13.d. Cromatografía y electroforesis en papel</b>	<b>71</b>
-Solventes utilizados	<b>71</b>
<b>III.13.e. Cromatografía en placa delgada (TLC)</b>	<b>72</b>
<b>III.14. Compuestos químicos</b>	<b>73</b>
<b>IV. Resultados</b>	<b>74</b>
<b>IV.1. Estudios realizados <i>in vivo</i></b>	<b>74</b>
<b>IV.1.a. Características fenotípicas de las cepas utilizadas a lo largo de este trabajo</b>	<b>76</b>
<b>IV.1.b. Producción de EPS</b>	<b>78</b>
<b>IV.1.c. Composición de los EPS</b>	<b>78</b>

IV.1.d. Presencia de otros polisacáridos	80
IV.1.e. Ensayo de Nodulación	80
IV.2. Estudio de biosíntesis de EPS <i>in vitro</i>	82
IV.2.a. Utilización de cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i>	82
IV.2.a.1. Introducción	82
IV.2.a.2. Utilización de células tratadas con EDTA	82
IV.2.a.2.i. Estudios de incorporación de radioactividad a diferentes fracciones	82
IV.2.a.2.ii. Análisis de los compuestos extraídos en la fracción 2 (Extracto 1203)	85
-Análisis del extracto 1203 por electroforesis en papel	85
-Fraccionamiento de los oligosacáridos por columna de geles	89
-Hidrólisis ácida suave de los octasacáridos piruvilados	94
-Análisis de los compuestos presentes en el extracto 1203 por cromatografía en columna de DEAE-celulosa	94
IV.2.a.2.iii. Obtención de prenil-difosfato-azúcares de tamaños intermedios	99
-Fraccionamiento por electroforesis en papel	99
-Fraccionamiento por columnas de Bio-Gel P2 de los compuestos de las zonas "A", "B" y "C"	101
-Interrelación entre los distintos oligosacáridos obtenidos	103
IV.2.a.2.iv. Estudio estructural de los oligosacáridos intermediarios obtenidos por biosíntesis con las cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> 8401, <i>bv. phaseoli</i> 8002 y <i>bv. viciae</i> 8401 pRL1JI	105
1) Análisis del posible primer residuo glicosídico entrante	105
2) Análisis del disacárido S	105
3) Análisis de los trisacáridos d <sub>1</sub> (8002), D (8401) y D <sub>1</sub> (8401 pRL1JI)	107



4) Análisis de los tetra, penta y heptasacáridos de la cepa 8002	112
5) Análisis del octasacárido a <sub>1</sub> de 8002	113
IV.2.a.2.v. Formación de polímero <i>in vitro</i> .	117
-Estudio de los compuestos presentes en la fracción 1	117
1) Análisis de los sobrenadantes de incubación	117
2) Análisis estructural del polímero sintetizado <i>in vitro</i>	119
IV.2.a.2.vi. Incorporación de [ <sup>14</sup> C]acetilo a Extracto 1203 a partir de [ <sup>14</sup> C]acetil CoA	121
IV.2.a.2.vii. Incorporación de [ <sup>14</sup> C]acetilo a polímero a partir de incubaciones en presencia de [ <sup>14</sup> C]acetil CoA	121
IV.2.a.2.viii. Efecto del Acetil-CoA y el PEP en exceso	122
-Efecto del Acetil CoA	122
-Efecto del PEP en exceso	128
IV.2.a.2.ix. Lípido-octasacárido como intermediario en la síntesis del EPS	129
-Ensayo de incubación en dos etapas	129
IV.2.a.2.x. Variables que afectan el proceso de polimerización	131
-Temperatura de incubación y condiciones de aereación durante el cultivo de las células	131
-Efecto de la edad de los preparados enzimáticos	135
IV.2.a.3. Utilización de células electroporadas	137
IV.2.a.3.i. Caracterización bioquímica de la mutante RW4 (EPS-) de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	137
-Análisis de los productos incorporados	138
IV.2.b. Síntesis de succinoglucano <i>in vitro</i> utilizando el sistema de <i>Rhizobium meliloti</i>	142
IV.2.b.1. Utilización de la cepa silvestre Rm 1021	142
IV.2.b.2. Síntesis <i>in vitro</i> del succinoglicano	148
-Complementación <i>in vitro</i> de la cepa Rm 7094 (exo B <sup>+</sup> )	148
IV.2.b.3. Poliprenol-difosfato-octasacárido como intermediario en la síntesis del succinoglucano	153

IV.2.c. Síntesis <i>in vitro</i> de acetano con el sistema de <i>Acetobacter xylinum</i>	157
IV.2.c.1. Análisis de los productos incorporados	157
IV.2.c.2. Puesta a punto de la técnica de electroporación	162
- Presencia o no de nucleótido-azúcares durante el tratamiento de electroporación	162
- Efecto del ayuno de las células	165
- Efecto de la agitación aeróbica y anaeróbica durante la incubación	166
- Verificación de que las incorporaciones observadas no se deben a degradación de los nucleótido-azúcares utilizados como dadores y posterior metabolización de los respectivos [ <sup>14</sup> C]-azúcares	167
- Condiciones de electroporación	169
- Variables físicas que afectan la incorporación de radioactividad a acetano y a extracto 1203	169
IV.2.c.3. Incorporación de otros componentes del acetano	171
IV.2.c.4. Análisis por metilación	174
IV.2.c.5. Poliprenol-difosfato heptasacárido como intermediario en la biosíntesis del acetano	175
IV.2.c.6. Incorporación de azúcares a otros compuestos no relacionados con el acetano	177
IV.2.c.7. Esquema general	180
V. Discusión	182
-Resultados publicados	201
VI. Referencias bibliográficas	202

## INDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla I:</b> Lista de cepas usadas a lo largo de este trabajo	75
<b>Tabla II:</b> Características generales de los EPS producidos por las diferentes cepas utilizadas	79
<b>Tabla III:</b> Ensayo de nodulación	81
<b>Tabla IV:</b> Incorporación de radioactividad a diferentes fracciones a partir de UDP[ <sup>14</sup> C]GlcA y de UDP[ <sup>14</sup> C]Glc	83
<b>Tabla V:</b> Efecto de la temperatura de incubación	100
<b>Tabla VI:</b> Efecto de los dadores no glicosídicos sobre el proceso de polimerización	123
<b>Tabla VII:</b> Incubación en dos etapas utilizando preparados enzimáticos de las cepas 8002, 8401 y 8401 pRL1JI	130
<b>Tabla VIII:</b> Incorporación de radióactividad a diferentes fracciones a partir de UDP[ <sup>14</sup> C]GlcA y de UDP[ <sup>14</sup> C]Glc	139
<b>Tabla IX:</b> Síntesis <i>in vitro</i> de succinoglucano. Complementación <i>in vitro</i> de la cepa RM 7094 (exo B-)	143
<b>Tabla X:</b> Lípido-octasacárido como intermediario en la biosíntesis del succinoglucano	154

<b>Tabla XI:</b>	Efecto de la presencia de nucleótido-azúcares antes o después del tratamiento de electroporación utilizando células de <i>Acetobacter xylinum</i>	<b>163</b>
<b>Tabla XII:</b>	Efecto del ayuno de las células de <i>Acetobacter xylinum</i>	<b>165</b>
<b>Tabla XIII:</b>	Incubaciones realizadas en presencia de [ <sup>14</sup> C]-glucosa y [ <sup>14</sup> C]-glucosa 1P con células electroporadas de <i>Acetobacter xylinum</i>	<b>168</b>
<b>Tabla XIV:</b>	Análisis de incorporación de componentes del acetano a diferentes fracciones	<b>173</b>
<b>Tabla XV:</b>	Lípido-difosfato-heptasacárido como intermediario en la biosíntesis del acetano	<b>176</b>

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>I.Introducción</b>	
Fig. I	2
Fig. II.	4
Fig. III.	8
Fig. IV.	11
Fig. V.	13
Fig. VI.	16
Fig. VII.	21
Fig. VIII.	22
Fig. IX.	25
Fig. X.	30
Fig. XI.	32
Fig. XII.	36
Fig. XIII.	37
Fig. XIV.	39
Fig. XV.	40
Fig. XVI.	42
<b>II.Materiales y Métodos</b>	
Fig.a.	57
Fig.b.	58
<b>IV.Resultados</b>	
Fig. 1	74
Fig. 2	77
Fig. 3	86
Fig. 4	88
Fig. 5	90
Fig. 6	91
Fig. 7	92
Fig. 8	93
Fig. 9	95
Fig. 10	96
Fig. 11	97
Fig. 12	101
Fig. 13	102
Fig. 14	104
Fig. 15	106
Fig. 16	108
Fig. 17	109
Fig. 18	110
Fig. 19	111
Fig. 20	114
Fig. 21	115
Fig. 22	116
Fig. 23	118

<b>Fig. 24</b>	<b>120</b>
<b>Fig. 25</b>	<b>124</b>
<b>Fig. 26</b>	<b>125</b>
<b>Fig. 27</b>	<b>126</b>
<b>Fig. 28</b>	<b>127</b>
<b>Fig. 29</b>	<b>128</b>
<b>Fig. 30</b>	<b>132</b>
<b>Fig. 31</b>	<b>134</b>
<b>Fig. 32</b>	<b>135</b>
<b>Fig. 33</b>	<b>141</b>
<b>Fig. 34</b>	<b>144</b>
<b>Fig. 35</b>	<b>145</b>
<b>Fig. 36</b>	<b>146</b>
<b>Fig. 37</b>	<b>147</b>
<b>Fig. 38</b>	<b>149</b>
<b>Fig. 39</b>	<b>150</b>
<b>Fig. 40</b>	<b>152</b>
<b>Fig. 41</b>	<b>156</b>
<b>Fig. 42</b>	<b>158</b>
<b>Fig. 43</b>	<b>159</b>
<b>Fig. 44</b>	<b>160</b>
<b>Fig. 45</b>	<b>161</b>
<b>Fig. 46</b>	<b>164</b>
<b>Fig. 47</b>	<b>166</b>
<b>Fig. 48</b>	<b>170</b>
<b>Fig. 49</b>	<b>174</b>
<b>Fig. 50</b>	<b>179</b>
<b>Fig. 51</b>	<b>181</b>

## **V.Discusión**

<b>Fig. 52</b>	<b>189</b>
<b>Fig. 53</b>	<b>196</b>

## ABREVIATURAS GENERALES

Acetil-CoA	acetil-coenzima A
Ac.	acetato
ADPGlc	5' adenosina-difosfato-glucosa
A2pm	ácido diaminopimélico
AMP	5' adenosina-monofosfato
BD	azul dextrano
CMP	5' citosina-monofosfato
CP	polisacárido capsular
cpm	cuentas por minuto
cm	centímetro
Da	dalton
D.O.	densidad óptica
DEAE-celulosa	dietil-amino-etil-celulosa
EDTA	ácido etilén-diamino-tetraacético
EPS	exopolisacárido
Est.	estaquiosa
F.	frente de solvente
Fuc4NacA	4-acetamido-4,6-dideoxi-D-galactosa
Gal	galactosa
Glc	glucosa
GalA	ácido galacturónico
Glc-ol	sorbitol
GlcA-ol	glucuronitol
Glc-1-P	glucosa 1 fosfato
GlcNac	N-acetil-glucosamina
°C	grados Celsius
<sup>1</sup> H-RMN	resonancia magnética nuclear de protones
Hep.	heptosa (del LPS)
Kd	kilodalton
KDO	2-ceto-3-deoxioctónico
Km	kanamicina
Kv	kilovoltios
LPS	lipopolisacárido
Man	manosa
Md	megadalton
mM	milimolar
M2	maltosa
M3	maltotriosa
M4	maltotetrosa
M5	maltopentosa
M6	maltohexosa
M7	maltoheptosa
M8	maltooctosa
ManA	ácido manurónico
mg	miligramon
ml	mililitros
min.	minuto
nmoles	nanomoles
Or.	origen de siembra
Pi	fósforo inorgánico
Pir	piruvato
PPi	pirofosfato inorgánico

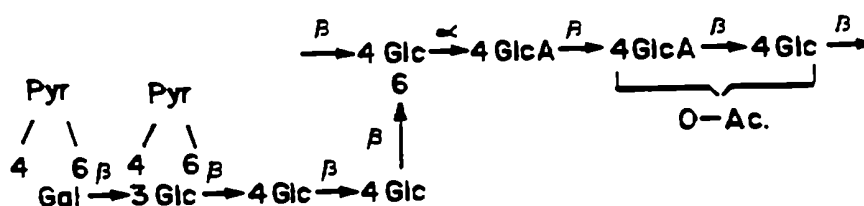
PEP	fosfo-enol-piruvato
Raf	rafinosa
Ram	ramnosa
R <sub>GlcA</sub>	movilidad de un compuesto con relación al GlcA
RUMP	movilidad de un compuesto con relación del UMP
rpm	revoluciones por minuto
Sac.	sacarosa
Succ	succinato
TBq	Tera becquerel ( $10^{12}$ becquerel)
Sm	estreptomocina
TCA	ácido tricloroacético
Tn5	transposón Tn5
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
$\mu\text{Ci}$	micro Curie
$\mu\text{g}$	micro gramo
$\mu\text{l}$	micro litro
$\mu\text{M}$	micro molar
$\mu\text{moles}$	micro moles
$\mu\text{Fd}$ ó $\mu\text{F}$	microfaradios
UDP	5' uridina-difosfato
UMP	5' uridina-monofosfato
volts	voltios



## RESUMEN

En este trabajo se presenta un estudio de la biosíntesis de los exopolisacáridos complejos producidos por tres especies de bacterias Gram negativas. *Rhizobium leguminosarum* (R.L.), *Rhizobium meliloti* (R.m.) y *Acetobacter xylinum* (A.x.).

Con el sistema de R. l. se utilizaron las siguientes cepas: R. l. bv. *phaseoli* 8002 es una cepa silvestre que sintetiza exopolisacárido (EPS<sup>+</sup>) y tiene capacidad para nodular (Nod<sup>+</sup>) y fijar nitrógeno (Fix<sup>+</sup>) en las raíces de su planta hospedadora, poroto (*Phaseolus vulgaris*). Dicha capacidad se encuentra codificada en un plásmido simbionte llamado pRP2JI. A la cepa 8002 curada de su plásmido simbionte se la denomina R.l. 8401, que no puede nodular ni fijar nitrógeno en poroto (Nod<sup>-</sup>, Fix<sup>-</sup>), pero produce exopolisacárido en cantidades equivalentes a la de su contraparte silvestre (EPS<sup>+</sup>). Una cepa derivada de la 8401 es la cepa R. l. bv. *viciae* 8401 pRL1JI, que es la cepa 8401 a la cual se le ha introducido el plásmido simbionte (pRL1JI) de otra cepa silvestre llamada R. l. bv. *viciae* 248 que nodula y fija nitrógeno en arveja (*Vicia hirsuta*) (Nod<sup>+</sup>, Fix<sup>+</sup>) y produce un exopolisacárido de estructura diferente a la cepa 8002 (EPS<sup>+</sup>). La cepa 8401 pRL1JI es Nod<sup>+</sup> y Fix<sup>+</sup> en arvejas y produce un exopolisacárido de estructura idéntica al de la cepa 8002 (EPS<sup>+</sup>). Otra cepa EPS<sup>+</sup> utilizada fue R. l. bv. *trifolii* NA-30, que tiene capacidad para nodular y fijar nitrógeno (Nod<sup>+</sup>, Fix<sup>+</sup>) en trébol (*Trifolium repens*) y también sintetiza un exopolisacárido de estructura idéntica al de la cepa 8002. La estructura propuesta para la unidad repetitiva del exopolisacárido producido por las cepas 8002, 8401, 8401 pRL1JI y NA-30, es la siguiente:



Además se utilizó una mutante defectiva en la síntesis del exopolisacárido (EPS<sup>-</sup>), obtenida por mutagénesis con el transposón Tn5 con la cepa silvestre R. l. bv. *phaseoli* 8002, llamada R. l. bv. *phaseoli* RW4 pero que sin embargo es Nod<sup>+</sup> y Fix<sup>+</sup>, en porotos.

Se realizaron incubaciones *in vitro* con preparados enzimáticos de las distintas cepas (células tratadas con EDTA) en presencia tanto de UDP[<sup>14</sup>C]Glc como UDP[<sup>14</sup>C]GlcA y se estudió la transferencia de radioactividad a diferentes fracciones, principalmente Extracto 1203 (extracción con solvente orgánico) y sobrenadante de incubación. Se utilizaron diferentes técnicas analíticas para el estudio de los compuestos presentes en las diferentes fracciones; electroforesis en papel, cromatografía, filtración por geles, permetilación, etc.

En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio con la cepa R. l. bv. *trifolii* NA-30, se pudo observar al analizar los Extractos 1203 que se formaban diferentes lípido-azúcares con las características de un prenol-PP-trisacárido, con la estructura de los primeros tres restos glicosídicos de la unidad repetitiva, GlcAβ(1-4)GlcAβ(1-4)Glc (comenzando por el extremo reductor) que podía estar O-acetilada o no, y un prenol-PP-octasacárido, con la estructura de la unidad repetitiva (octasacárido dipiruvilado y acetilado) correspondiente al exopolisacárido descrito para esta cepa. En este estudio previo no se logró polimerización de la unidad repetitiva *in vitro* que diera como producto final el exopolisacárido (EPS) (J.C. Bossio, 1989. Tesis Doctoral).

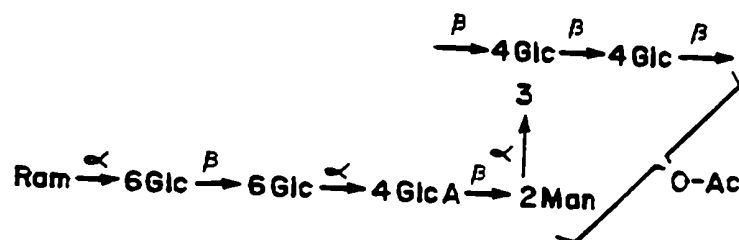
En el presente trabajo, al analizar el Extracto 1203 se pudieron aislar, por diferentes técnicas de incubación, todos los intermediarios de biosíntesis a nivel de lípido-azúcares, en las fracciones de extracción orgánica (tanto con marca en [<sup>14</sup>C]Glc como en [<sup>14</sup>C]GlcA), desde el prenol-PP-glucosa hasta el prenol-PP-octasacárido



Se estudió la estructura del Octa y del polímero (succinoglucano) obtenidos *in vitro* y se demostró que ambos tenían la estructura esperada, siendo la primera vez que se describe formación de succinoglucano *in vitro* en *Rhizobium meliloti*. La confirmación de estos estudios se obtuvieron al utilizar la cepa Rm 7094 (exo B-) en ensayos de complementación *in vitro*, en donde al agregar UDP[<sup>14</sup>C]Glc en presencia de UDP-Gal, no sólo se obtuvieron lípido-azúcares, sino que se logró obtener polimerización *in vitro*. También se pudieron sintetizar *in vitro* otros polisacáridos de bajo peso molecular compuestos por 1, 3 y 4 unidades repetitivas (Octa, Octa3 y Octa4, respectivamente), previamente descriptos *in vivo* por otros investigadores.

Ensayos de incubación en dos etapas con la cepa Rm 7094, demostraron claramente que el prenil-difosfato-Octa.A. intervendría como intermediario en la síntesis del succinoglucano final y además del Octa.A., Octa 3 y Octa 4 libres.

Por último, se utilizó la cepa silvestre de *Acetobacter xylinum* RC Grl, que sintetiza un exopolisacárido llamado acetano cuya unidad repetitiva es un heptasacárido con la siguiente estructura:



Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, con células tratadas con EDTA de *Acetobacter xylinum* como preparado enzimático, han demostrado la síntesis secuencial *in vitro* de la unidad repetitiva a nivel de compuestos lípido-azúcares (prenol-PP-heptasacárido), pero no se pudo obtener tampoco en este caso polimerización *in vitro* de la unidad repetitiva, para dar acetano.

Se hizo un estudio detallado de la puesta a punto de la técnica de electroporación de células en el sistema de *Acetobacter xylinum*; se estudiaron diferentes variables como el efecto del voltaje (Voltios), capacitancia (Faradios), resistencia (Ohms), tiempo de permeabilidad, ayuno de las células, temperatura de incubación, etc.

En este estudio, al analizar los resultados, se observó que al usar células electroporadas se obtuvo síntesis *in vitro* tanto de polímero (acetano) como de intermediarios de biosíntesis (prenol-difosfato-heptasacárido) a partir de todos los dadores de restos glicosídicos radioactivos (UDPGlc, UDPGlcA, GDPMan y TDPRam) y no glicosídicos, como acétil-CoA, demostrando que los compuestos radioactivos obtenidos pertenecen tanto a intermediarios en la síntesis del acetano como al producto final (acetano) y que el grupo O-acetilo es transferido a nivel de lípido-azúcares. Con este sistema fue posible observar además otros compuestos no relacionados a la síntesis del acetano (glucanos  $\beta(1-2)$ ; prenil-monofosfato- $\beta$ -galactosa; prenil-monofosfato- $\beta$ -manosa y lípido-GlcA) ya descriptos en estudios anteriores.

En incubaciones en dos etapas, en donde parte de los prenil-PP-heptasacáridos, se transforman en polímero, se demostró en forma clara el papel de intermediarios originalmente asignada a estos compuestos.

Al analizar la estructura del heptasacárido y del acetano obtenidos *in vitro* con marca en [<sup>14</sup>C]Glc por ensayos de permetilación, éstos presentaron la estructura esperable con lo que se obtuvieron evidencias concretas de que el acetano se formó por la polimerización de la unidad repetitiva.

## I. INTRODUCCION

### POLISACARIDOS BACTERIANOS, LOCALIZACION, ESTRUCTURA Y FUNCION.

#### GENERALIDADES:

Los microorganismos procariontes, es decir las bacterias, producen un gran número de diversos tipos de polisacáridos con diferentes localizaciones celulares (Fig.I).

Con respecto a sus posibles funciones, abarcan un gran espectro: polisacáridos intracelulares de reserva (como el glucógeno), polisacáridos de mantenimiento de la estructura celular (como la mureína o péptidoglicano), polisacáridos íntimamente relacionados con los procesos de reconocimiento, adhesión y desarrollo de infecciones en plantas, animales y humanos como son los polisacáridos capsulares (CP), los lipopolisacáridos (LPS) y los que se liberan al exterior celular, como los exopolisacáridos, (EPS).

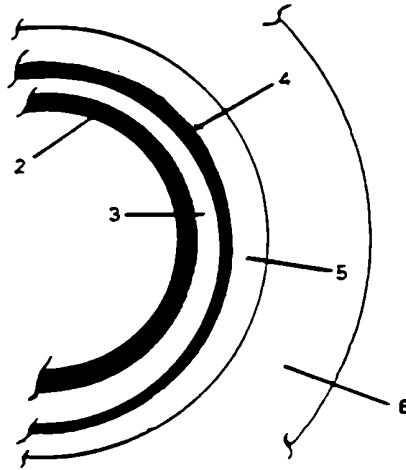
Hoy en día existe un cierto conocimiento de sus estructuras y parte de sus vías biosintéticas. En los últimos años, en algunos casos, se ha avanzado también en el estudio de su genética y del control de la regulación de su síntesis.

En esta introducción nos dedicaremos especialmente a aquellos polisacáridos producidos por bacterias Gram negativas.

Un procedimiento didáctico para su descripción será tal vez ir recorriendo desde el interior al exterior celular y de esa manera analizando (cuando se conozca) su estructura, biosíntesis y función (Fig.I), con la posibilidad de encontrarnos con situaciones difusas al utilizar este método tan sistemático ya que la naturaleza en realidad es la que procede de manera menos sistemática.

De manera más o menos discreta los lugares que describiremos donde se encuentran y/o sintetizan los diferentes polisacáridos serán:

- 1) Citoplasma
- 2) Membrana interna (citoplasmática) y periplasma
- 3) Cubierta celular
  - 3.a) Pared celular (mureína o péptidoglicano)
  - 3.b) Membrana externa
- 4) Cápsula
- 5) Exterior celular (exopolisacáridos)



**Fig.I:** Esquema de un corte de una típica bacteria Gram negativa indicando los diferentes componentes. 1, citoplasma; 2, membrana plasmática o interna; 3, espacio periplásmico; 4, pared celular, mureína o péptidoglicano; 5, membrana externa; 6, cápsula y 7, exterior celular (exopolisacáridos).

### 1) CITOPLASMA:

#### -GLUCOGENO:

El Glucógeno es el mayor polímero de reserva intracelular presente en el citoplasma de las bacterias. Fue descrito en más de 40 especies, incluyendo Gram negativas, Gram positivas, arqueobacterias y bacterias fotosintéticas (Preiss, 1984; Preiss y Romero, 1989). El glucógeno es un polímero conformado por glucosa con un 90 % de sus residuos en unión glicosídica  $\alpha(1-4)$  y el resto en unión  $\alpha(1-6)$ , variando este porcentaje según la especie y el estadio de su biosíntesis (Preiss, 1989). Muchas especies de bacterias como en el caso de *Rhodopseudomonas capsulata*, *Streptococcus mitis* y cepas de arqueobacterias como *Sulfolobus solfataricus*, sintetizan glucógeno durante su crecimiento en fase exponencial (Preiss, 1984). No obstante, para la mayoría de las especies de bacterias, el incremento en la síntesis se realiza durante el estado estacionario. Generalmente los niveles de glucógeno son altos

cuando hay un gran exceso de las fuentes de carbono en el medio y/o cuando hay un crecimiento limitado por falta de algún nutriente (amonio, azufre o fósforo).

Mutantes de bacterias, que poseen genes defectivos vinculados a la síntesis de glucógeno, crecen tan bien como su contraparte silvestre (Preiss y Romero, 1989), lo que significa que el glucógeno no es indispensable para el crecimiento bacteriano. No obstante, estas cepas mutantes presentan un tiempo de supervivencia en condiciones de ayuno mucho menor con respecto a las silvestres, pues el glucógeno es utilizado por las bacterias cuando hay falta de fuentes de carbono. También se ha observado que ayuda a la supervivencia de las bacterias productoras cuando éstas se encuentran en condiciones de estrés (Preiss y Romero, 1989).

Por otro lado en bacterias esporoformadoras, se acumula glucógeno antes de la iniciación de la esporulación y se degrada concomitantemente con la formación de la spora (Iglesias y Preiss, 1992).

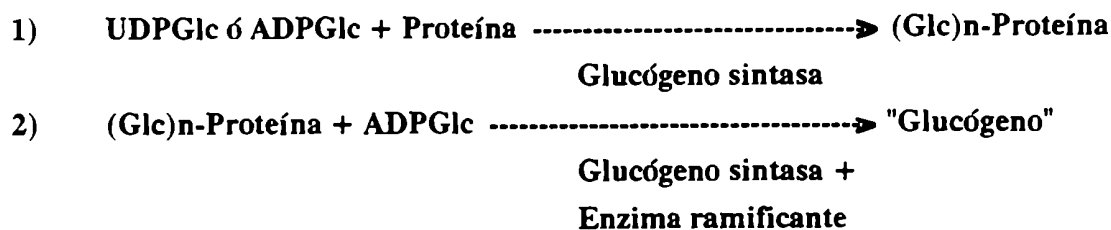
#### **-BIOSÍNTESIS DEL GLUCÓGENO BACTERIANO:**

La síntesis de las uniones glicosídicas ocurre por transferencia de una glucosa activada como nucleótido-PP-glucosa a un aceptor apropiado en el citoplasma de las células. Este paso fue descrito hace ya más de 20 años (Leloir, 1970).

En células de mamíferos y en microorganismos eucariontes, la síntesis del glucógeno está mediada por la transferencia de un residuo de glucosa a partir de UDP-Glc a un extremo no reductor en posición 4 de un polímero de glucosa  $\alpha(1-4)$  preexistente (glucógeno aceptor) (Leloir, 1970; Preiss y Walsh, 1981). Sin embargo un aspecto muy importante es el estudio de la iniciación de su síntesis en donde aún queda mucho por aclarar. Los primeros estudios realizados en este aspecto demostraron que en tejido de hígado la síntesis se lleva a cabo sobre una proteína que actúa como aceptor en la transferencia de las unidades de glucosa, desde el inicio de la síntesis (Krisman, 1972).

Más tarde este tipo de estudios se extendió a otros tejidos animales y se observó lo mismo en cerebro y músculo (Blumenfeld y Krisman, 1986).

Otro aspecto importante es que en *E. coli*, el dador de azúcar en la síntesis del glucógeno es el ADP-Glc. Sin embargo el UDP-Glc también intervendría como azúcar dador en el inicio de la síntesis (Barengo y Krisman, 1978). Por lo tanto el esquema de biosíntesis de glucógeno propuesto en este caso también estaría dado en dos etapas: primero, una iniciación y luego una elongación y/o ramificación (Barengo *et al.*, 1975; Barengo y Krisman, 1978) como se observa en la Fig.II.



**Fig.II: Esquema de biosíntesis del glucógeno en *E. coli* propuesto por Krisman *et al.* (Barengo y Krisman, 1978).**

Sin embargo algunos autores sugieren que en realidad no habría intervención del nucleótido dador UDPGlc en la síntesis del glucógeno, a raíz de observar que en *Escherichia coli*, mutantes en la producción de UDPGlc (deficientes en la enzima UDP-Glc pirofosforilasa, UTP: $\alpha$ -D-glucosa-1-P uridililtransferasa ) son capaces de acumular cantidades normales de glucógeno (Preiss y Romero, 1989), produciendo un interesante debate académico.

#### **-REGULACION DE LA SINTESIS DEL GLUCOGENO:**

La enzima ADP-Glc pirofosforilasa o ADP-Glc sintetasa, ATP: $\alpha$ -D-glucosa-1-P adenililtransferasa; EC 2.7.7.27, es la enzima regulatoria en la vía de biosíntesis del glucógeno bacteriano y del almidón en plantas (Preiss, 1989; Stitt, 1990). Muchos estudios lograron confirmar que la enzima ADP-Glc pirofosforilasa es una enzima alostérica regulada por varios metabolitos y que la especificidad del regulador depende del tipo de organismo. En bacterias heterotróficas, que obtienen energía de la degradación de la glucosa, tanto por la vía de Embden-Meyerof como Entner-Doudoroff, la ADP-Glc pirofosforilasa es activada y/o inhibida por metabolitos intermediarios de esta vía. En *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, que utilizan la vía de Embden-Meyerof, la enzima que está caracterizada como un homotetrámero, es alostéricamente activada por fructosa 1-6 diP e inhibida por AMP (Preiss, 1989). Por otra parte los microorganismos que utilizan la vía de Entner-Doudoroff, como *Agrobacterium tumefaciens*, la ADP-Glc pirofosforilasa es activable por fructosa 6-P y piruvato. Estos microorganismos no contienen la enzima fosfofructoquinasa (Iglesias y Preiss, 1992).

Algunas bacterias fotosintéticas anoxigénicas como *Chromatium vinosum*, *Rhodobacter capsulata* y *Rhodospirillum rubrum*, pueden metabolizar hexosas vía

Entner-Doudoroff y su ADP-Glc pirofosforilasa es activable por fructosa 6-P y piruvato (Iglesias y Preiss, 1992).

Un segundo grupo de bacterias fotosintéticas anoxigénicas son las que no metabolizan la glucosa, como *Rhodospirillum rubrum*, pero pueden crecer tanto heterotróficamente en la luz como en la oscuridad, a partir de varios ácidos tricarboxílicos ó autotróficamente en presencia de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y luz, en ausencia de oxígeno. En este caso la enzima ADP-Glc pirofosforilasa es activada por piruvato e inhibida por AMP, en ambas condiciones (Iglesias y Preiss, 1992).

Un último grupo de bacterias es el de las que realizan una fotosíntesis oxigénica, como el caso de las cianobacterias. El origen del CO<sub>2</sub> para la síntesis del glucógeno aquí es atmosférico. En este caso el 3-P-glicerato y el Pi (fosforo inorgánico) son los activadores e inhibidores más importantes, respectivamente, de la ADP-Glc pirofosforilasa.

## 2) MEMBRANA INTERNA Y PERIPLASMA:

### -GLUCANOS Y MDO:

Los glucanos cíclicos  $\beta(1-2)$  o ciclosoforanos presentan localización periplasmática y su biosíntesis está relacionada a la membrana citoplasmática ó interna. Fueron descritos hace un tiempo en una amplia gama de microorganismos Gram negativos como *Agrobacterium* (Putman *et al.*, 1950; Gorin *et al.*, 1961; York *et al.*, 1980; Hisamatsu *et al.*, 1982) y *Rhizobium* (Dedonder y Hassid, 1964; Zevenhuizen y Scholten-Koerselman, 1979; Abe *et al.*, 1982; Amemura *et al.*, 1983). Más tarde fue descubierto que en siete especies del género *Acetobacter* había posiblemente en el espacio periplásmico polisacáridos lineales compuestos por glucosa en unión  $\beta(1-2)$  (Amemura *et al.*, 1985).

En *Escherichia coli* K-12 fueron encontrados compuestos de este tipo pero ramificados con uniones  $\beta(1-2)$  y  $\beta(1-6)$ , también localizados en la membrana interna (Schulman y Kennedy, 1979), denominados MDO (del inglés: Membrane Derived Oligosacharides). Los MDO aislados de *E. coli* K-12 presentan entre 10 y 12 residuos en unión  $\beta(1-2)$  y  $\beta(1-6)$  (Schneider *et al.*, 1979) y además contienen sustituyentes no glicosídicos de Sn-1 glicerolfosfato, fosfoetanolamina y ácido succínico (van Golde *et al.*, 1973).

Analizando otros géneros se ha descrito que las cepas de *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas phaseoli*, *Xanthomonas oryzae* y *Klebsiella pneumoniae* producen una mezcla de oligosacáridos extracelulares y/o polisacáridos, tipo MDO,



que contienen exclusivamente glucosa en uniones  $\beta(1-2)$  (Amemura y Cabrera-Crespo, 1986).

En el caso de las cepas de *Xanthomonas*, su grado de polimerización (GP) puede ser de 8 a 20 unidades, y en general contienen un glucano cíclico  $\beta(1-2)$ , de GP=16, con algunas uniones (1-6). Se vio además que había una unión  $\alpha$  por molécula (Amemura y Cabrera-Crespo, 1986).

Los glucanos cíclicos  $\beta(1-2)$  de *Agrobacterium* y de *Rhizobium* fueron encontrados tanto en el espacio periplásmico como en el medio de cultivo (Zevenhuizen y Scholten-Koerselman, 1979; Abe *et al.*, 1982).

Un dato interesante es que tanto *Rhizobium* como *Agrobacterium* producen un glucano cíclico  $\beta(1-2)$  ácido, ésta propiedad está dada por sustituyentes no glicosídicos en forma de grupos acilos, que son: ésteres de metilmalónico y ácido succínico (Hisamatsu *et al.* 1987). Se han descrito glucanos cíclicos  $\beta(1-2)$  que contenían residuos de fosfoglicerol (Miller *et al.* 1987; Batley *et al.* 1987). Recientemente el Dr. Hisamatsu ha publicado un trabajo donde se describen los ciclosoforanos de *Rhizobium* y *Agrobacterium*, tanto neutros como cargados (Hisamatsu, 1992).

Como los glucanos  $\beta(1-2)$  son producidos tanto por simbioses de leguminosas como *Rhizobium* y por patógenos de plantas como *Agrobacterium* y *Xanthomonas*, su función biológica es interesante dentro del contexto de interacción entre plantas y bacterias.

Uno de los sistemas más estudiados es el de *Rhizobium meliloti*. Se sabe que este compuesto es esencial para la formación de los nódulos normales. El glucano de *Rhizobium meliloti* es cíclico y contiene un grado de polimerización de 16 a 20 (Zorreguieta *et al.*, 1985). Cepas defectivas en la producción y secreción del glucano retienen la habilidad de causar formación del nódulo, pero al igual que otras mutantes exo o Lps, los nódulos se desarrollan defectivos y no se fija nitrógeno (Geremía *et al.*, 1987; Stanfield *et al.*, 1988). Los genes que codifican para la síntesis del glucano  $\beta(1-2)$ , llamados ndvA y ndvB (del inglés: nodule development) están localizados en el cromosoma (Dylan *et al.*, 1986) y presentan una alta homología con los genes cromosomales de virulencia, chvA y chvB (del inglés, chromosomal virulence), respectivamente, de *Agrobacterium* (Dylan, 1986).

Los genes chvA y chvB estarían involucrados en el transporte y la síntesis de los glucanos cíclicos  $\beta(1-2)$ , respectivamente (Zorreguieta y Ugalde, 1986; Cangelosi *et al.*, 1989; Iñon de Iannino y Ugalde, 1989). Lo mismo sería extrapolable al caso del sistema de *Rhizobium meliloti*.

Por otro lado, los MDO de *E. coli* son regulados por la osmolaridad del medio (Kennedy, 1982). Luego de cultivar las células en un medio con baja osmolaridad, estos compuestos pueden llegar a ser el 7% del peso seco de las células, mientras que las altas molaridades suprimen su síntesis.

En el caso de los glucanos cíclicos  $\beta(1-2)$  de *Rhizobium meliloti* y *Agrobacterium* se vio que estaban también osmoregulados (Zorreguieta *et al.*, 1990; Breedveld *et al.*, 1991).

La biosíntesis de estos compuestos ha sido muy estudiada en el género *Rhizobium* y *Agrobacterium* (Zorreguieta *et al.*, 1990), en donde se ha encontrado que se realiza a partir de un dador activado de glucosa (UDP-Glc) que transfiere un resto glicosídico a una "proteína intermediaria" que se encuentra en la membrana interna, codificada por el gen *ndvB* y *chvB*, respectivamente. Se ha estudiado su masa molecular aparente y es de aproximadamente 235 KDa (Zorreguieta y Ugalde, 1985; Zorreguieta *et al.*, 1985; Zorreguieta y Ugalde, 1986).

La participación de esta proteína ha sido aclarada con detalle y se sabe además que este proceso se realiza también en la membrana interna de la bacteria (Zorreguieta *et al.*, 1990). No está claro aún como es el proceso de finalización y ciclación, tal vez esta proteína intermediaria presentaría las restantes funciones (Ielpi *et al.*, 1990).

El gen *ndvA* de *Rhizobium meliloti* está secuenciado y codificaría para una proteína de 67 KDa (Stanfield *et al.*, 1988; Ielpi *et al.*, 1990) que podría estar involucrada en la liberación del glucano al espacio periplásmico (Dylan, 1986). Mutantes de *Agrobacterium tumefaciens* en los *locus chvA* y *chvB* son defectivos en la síntesis y transporte de glucanos cíclicos  $\beta(1-2)$  causando que la cepa sea además avirulenta (Puvanesarajah *et al.*, 1985; Dylan *et al.*, 1986).

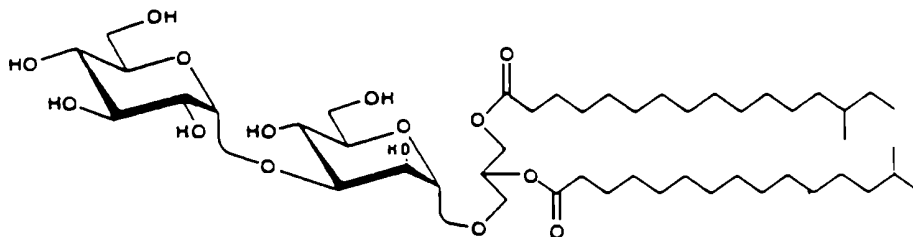
Por último, *R. l. bv. trifolii* TA-1 produce un glucano cíclico  $\beta(1-2)$  y parte de su biosíntesis ha sido estudiada (Breedveld *et al.*, 1992). *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 también produce un glucano cíclico pero a diferencia de otros sistemas con uniones  $\beta(1-3)$ ,  $\beta(1-6)$ . Estudios de su biosíntesis *in vitro* indicarían que se realizaría a partir de UDP-Glc como dador de azúcar pero en este caso en particular la proteína intermediaria de la síntesis tendría una masa molecular de 90 KDa (Iñon de Iannino y Ugalde, 1993).

#### **-GLICOLIPIDOS DE MEMBRANA INTERNA:**

Los glicosilglicéridos, constituyentes de las membranas, se encuentran distribuidos en plantas (Kates, 1990; Sastry, 1974), animales (Slomiany, 1987; Murray

y Narasimhan, 1990), bacterias Gram positivas y arqueobacterias (Ishizuta y Yamakawa, 1985; Sastry, 1974; Kates, 1990), pero su existencia en microorganismos Gram negativos es menos frecuente. Fueron encontrados en cepas de *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Spirochaetes*, *Mycoplasma*, bacterias fotosintéticas y *Rhizobium* (Ishizuka y Yamakawa, 1985; Kates, 1990; Orgambide *et al.*, 1992). En este último género, en especial en la cepa de *Rhizobium leguminosarum* *bv.* *trifolii* ANU843, se ha descrito la estructura de un diglicosildiacylglicérido llamado BF-7, luego del análisis de composición de azúcares, metilación,  $^1\text{H}$  NMR y espectroscopía de masa, se sabe que tiene una estructura como la que se observa en la Figura III: 1,2-di-O-acyl-3-O- $\{\alpha\text{-D-glucopiranosil-(1-3)-O-}\alpha\text{-D-mano piranosil}\}$ -glicerol.

Los ácidos iso-hexadecanoico y anteiso-heptadecanoicos fueron los ácidos grasos predominantemente encontrados esterificando la molécula de glicerol. Sin embargo, existe una microheterogeneidad en la composición de estos ácidos grasos resultando dar una variabilidad a la molécula de glicolípidos (Orgambide *et al.*, 1992).



**Fig. III.:** Estructura del compuesto BF-7, diglicosil diacylglicérido de *Rhizobium leguminosarum* *bv.* *trifolii* ANU843, con los dos ácidos grasos más probables encontrados (i-16:0, a-17:0) (Orgambide *et al.*, 1992).

Por último, muy interesante es que estudios preliminares realizados con el compuesto BF-7 indicarían que este compuesto estaría involucrado en el proceso de infección de *Rhizobium leguminosarum* *bv.* *trifolii* a su planta hospedadora (trébol); específicamente se ha encontrado que estos glicolípidos alterarían el desarrollo de los pelos absorbentes y células corticales en plantas de trébol, en una forma que se denomina engrosamiento y acortamiento de la raíz (Efecto Tsr. del inglés:

"thickening and shortening of roots") observado en los estadios tempranos de interacción entre la bacteria y la planta simbiote (Orgambide *et al.*, 1992).

### 3) CUBIERTA CELULAR:

La cubierta celular en las bacterias Gram negativas es una estructura formada por varios componentes, que se encuentran por fuera de la membrana interna o membrana citoplasmática. Básicamente está formada por la pared o mureína, que mira al espacio periplásmico, y por la membrana externa (Ver Fig.I).

La cubierta celular es responsable además de brindar antigenicidad a diferentes bacterias y esto se debe a que algunos componentes presentes en la membrana externa como los lipopolisacáridos (LPS) (o ácidos teicoicos en Gram positivas) y lipoproteínas desencadenan respuestas antigénicas y son la base de la fabricación de vacunas contra muchas bacterias patógenas. La utilización de estos antígenos específicos es muy útil para el diagnóstico de una gran cantidad de enfermedades infecciosas.

Por otra parte, estos componentes funcionan también como receptores de bacteriófagos como es el caso del antígeno-O del LPS (que veremos mas adelante) (Nnalue *et al.* 1990).

En realidad la cubierta celular se puede encontrar formando dos tipos fundamentales de macroestructuras a lo largo de los diferentes grupos de bacterias, diferenciables por tinción con el colorante violeta de genciana (Tinción de Gram). Esta tinción, creada en el siglo pasado por el microbiólogo Cristian Gram, fue tan específica que hasta hoy en día tiene importancia taxonómica, dividiendo a la mayoría de las bacterias en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas, las que continúan teñidas luego de decolorar con alcohol o acetona y las que se destiñen, respectivamente. Esto se debe a que si bien hay un componente más o menos común que es la pared o mureína, la estructura de la cubierta no es la misma en estos dos grupos. En los Gram positivos, la cubierta celular es gruesa (100 nm) está formada además por mucopéptidos, ácidos teicoicos (antígenos) y polisacáridos, el colorante de Gram (violeta de genciana) queda retenido dentro de la célula dándole el color violeta oscuro característico de los Gram positivos. La mureína es compleja, de estructura tridimensional y se encuentra inmersa en los otros componentes de la cubierta, utilizándose en muchos casos como criterio taxonómico entre diferentes microorganismos de este tipo (Schleifer y Kandel, 1972; Shoekman y Barrett, 1983).

En el caso de las bacterias Gram negativas, la cubierta es pequeña (10-15 nm) comparada con la de las Gram positivas, el colorante de Gram no se retiene y

quedan coloreadas por el posterior colorante de contraste, safranina o fucsina (rosado).

La cubierta en este caso está separada de la membrana plasmática por un espacio estrecho llamado "espacio periplásmico", característico de Gram negativas (Ver Fig.I).

En Gram negativos la membrana externa está constituida por fosfolípidos, lipoproteínas y lipopolisacáridos (antigénicos) que se encuentran mirando hacia el exterior celular (Freer y Salton, 1971; Meadow, 1971), pegada a esta del lado interno se encuentra la pared celular o mureína que en este caso, a diferencia de los Gram positivos, es una malla bidimensional (Ver Fig.I).

### **3.a) PARED CELULAR, MUREINA O PEPTIDOGLICANO:**

La pared celular, mureína o péptidoglicano es la responsable de dar rigidez y forma a las células bacterianas y como consecuencia también le brinda resistencia osmótica. Puesto que las bacterias presentan una elevada presión osmótica interna, y dado que frecuentemente se encuentran en condiciones ambientales externas completamente variables, como por ejemplo, un entorno hipotónico, han desarrollado una estructura, que es la pared celular, extremadamente resistente al hinchamiento y posible ruptura de la membrana celular.

Estas propiedades en conjunto se deben a la presencia de un polímero muy complejo (constituído por azúcares y aminoácidos) llamado péptidoglicano o mureína (del latín *murus*, pared) que sólo es sintetizado por bacterias, y comprende entre el 10% y 25% del total de la cubierta celular.

Por el tipo de estructura del péptidoglicano, que forma una red o malla continua alrededor de la célula, se lo puede considerar como una especie de macromolécula en forma de saco con poros especiales que permiten el paso de una gran cantidad de compuestos.

Las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y Gram negativas poseen una característica molecular común: en ambas hay un rígido entramado estructural constituído por cadenas polisacáridas paralelas unidas covalentemente por medio de cadenas peptídicas transversales (Ver Fig.IV).

La mureína es un compuesto formado por una unidad repetitiva, el muropéptido, un disacárido formado por los azúcares N-acetil-D-glucosamina y N-acetilmurámico, en unión  $\beta(1-4)$ , al cual se une un péptido corto (a partir del carboxilo del éter láctico de los N-acetil murámicos) compuesto en las bacterias Gram negativas por L-alanil-D-glutamil-meso-2,6-diaminopimélico y D-alanina (Ver

Fig.IV, para el caso del péptidoglicano de *E.coli*). Como vemos, al carboxilo del resto de D-alanina terminal de la cadena lateral de una cadena polisacáridica se une covalentemente con el resto amino del ácido diaminopimérico (A2pm) de la cadena peptídica lateral de otra cadena polisacárida adyacente.

Muchas cadenas de mureína con un tamaño promedio de 30 a 40 muropéptidos se alinean perpendicularmente al sentido axial de la célula (Schindler *et al.* 1976; de Pedro y Schwarz, 1981; Gmeiner *et al.*, 1982). Al estar entrecruzadas forman una estructura muy rígida que actúa como exoesqueleto celular (Fig.IV).

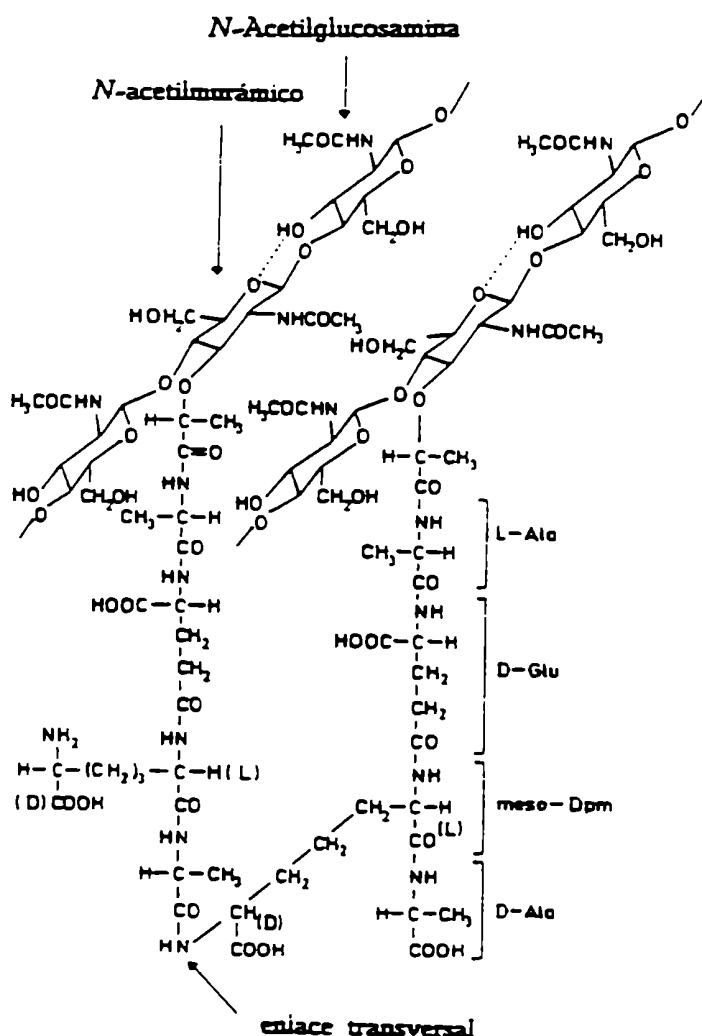


Fig.IV: Estructura propuesta para la mureína de *E.coli* (Formanek *et al.*, 1976).

### -BIOSÍNTESIS DEL PEPTIDOGLICANO:

La biosíntesis de la mureína o pared ha sido descripta hace algún tiempo y muchos componentes enzimáticos involucrados han sido estudiados *in vitro* con mucho detalle (Matsushashi *et al.*, 1981; Blumberg y Strominger, 1974; Ishino *et al.*, 1982; Tomiska *et al.*, 1982; Tipper y Wright, 1979; Wasserman y Strominger, 1983; Burman y Park, 1984). La biosíntesis del péptidoglicano fue en gran parte aclarada por los grupos de J. Strominger y J.T. Park durante investigaciones sobre el mecanismo de acción del antibiótico penicilina.

El péptidoglicano es sintetizado en tres etapas principales que se muestran en la Fig.V.

- 1) Los estadios tempranos de biosíntesis del peptidoglicano ocurrirían del lado citoplasmático de la célula, en donde se hace uso de los precursores solubles. En esta parte el N-acetil-muramil-pentapéptido es sintetizado en su forma de derivado UDP (Fig.IV, Etapa I), a partir de sus precursores UDP-N-acetil-glucosamina, fosfoenolpiruvato y aminoácidos.
- 2) En la segunda etapa (Fig.IV, Etapa II), que tiene lugar en la membrana citoplasmática, el N-acetil-muramil-pentapéptido es transferido desde el UDP derivado a un lípido aceptor de membrana, el undecaprenol-fosfato. El extremo no polar quedaría sumergido en la membrana mientras que el resto de N-acetil-muramil-pentapéptido quedaría del lado citoplasmático al cual se le adiciona la N-acetil-glucosamina donada por la UDP-N-acetil-glucosamina, quedando entonces el compuesto siguiente: undecaprenil-difosfato-{N-acetil-glucosaminil- $\beta$ -(1-4)}-N-acetil-muramil-pentapéptido.

Hay que aclarar aquí que en el caso de bacterias Gram positivas el sistema es más complejo, por ejemplo: en este momento se pueden introducir cadenas peptídicas cortas al resto de L-lisina (amino ácido que reemplaza al ácido aminopimélico en muchas bacterias Gram positivas) que se utilizarán en la última etapa para formar enlaces cruzados entre las cadenas adyacentes de muropéptidos: Estas cadenas pueden variar con las especies, en *Staphylococcus aureus* la cadena es una pentaglicina y es la que dona su extremo amino.

En *E.coli*, que usaremos de modelo, recordemos que la transpeptidación se daba directamente entre los aminoácidos del muramil-pentapéptido (a nivel del D-aminopimélico).

- 3) Los estadios tardíos, en cambio, se producirían del lado periplasmático de la célula (Mirelman, 1979) (Fig.V, Etapa III). Se establecen los enlaces transversales entre las cadenas paralelas del péptidoglicano gracias a una reacción de

traspeptidación en donde la penúltima D-alanina del muropéptido dador (en donde el extremo carboxilo es D-alanil-alanina) se une a un grupo amino libre de ácido diaminopimérico (A2pm) de un muropéptido receptor de otra cadena, liberando D-alanina (Ver Fig.IV). Esta es la reacción que inhibe la penicilina bloqueando por lo tanto la síntesis de la mureína (Fig.V, Etapa III).

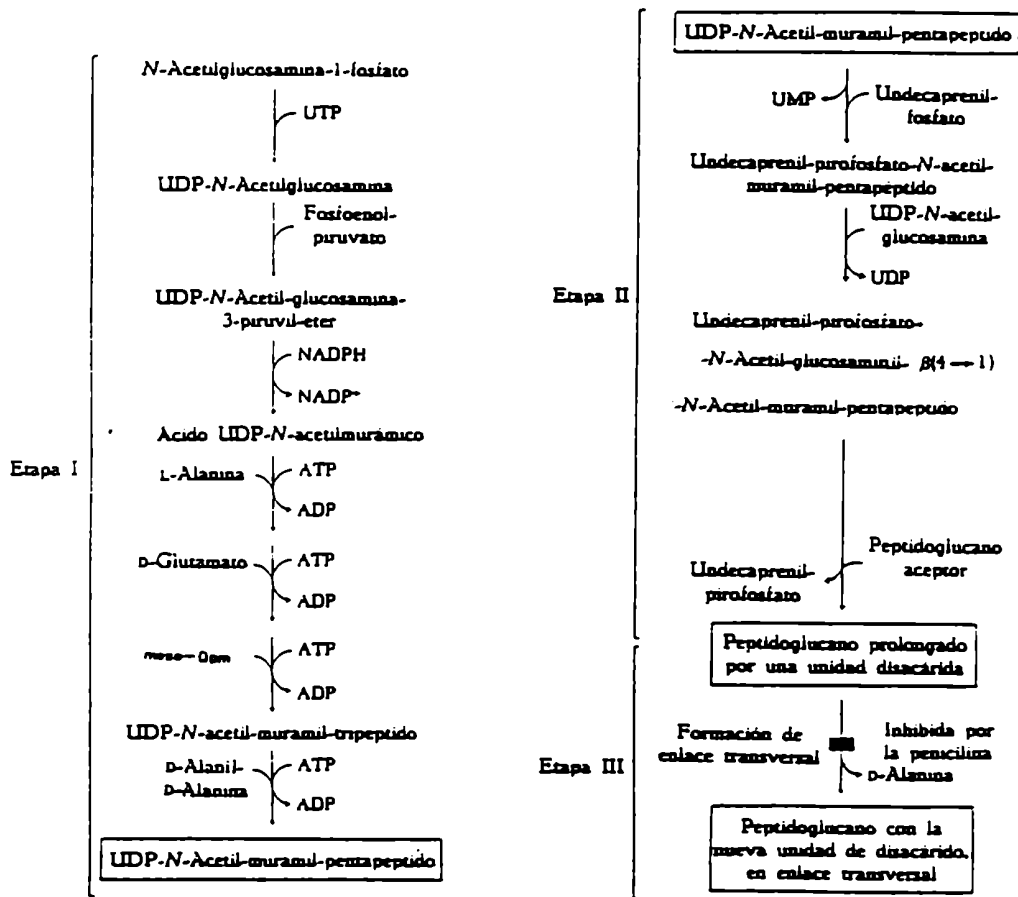


Fig.V: Etapas de biosíntesis del peptidoglicano en una bacteria Gram negativa como *E. coli*.



Un interesante interrogante que surgió hace algunos años era saber de que manera crecía la mureína durante el ciclo de vida de la célula ya que cada célula hija al dividirse deberá aumentar de tamaño a expensas del aumento concomitante de la cubierta rígida de peptidoglicano que rodea la célula en todo su perímetro.

Las autorradiografías han sido un método muy especial para estudiar el crecimiento *in vivo* de la pared celular y en particular de la mureína, por técnicas de microscopía. Los resultados indicaron que la incorporación de nuevas cadenas de mureína tienen lugar en varios sitios a lo largo del crecimiento del sáculo (Schwarz *et al.*, 1975; Burman *et al.*, 1983a). Esto fue apoyado por estudios tanto morfológicos como bioquímicos (Burman *et al.*, 1983b).

Otro tipo de estudios consistieron en realizar una distinción química de las cadenas crecientes de mureína con respecto a las preexistentes en el sáculo. Estos estudios realizados con la cepa de *E. coli* W 7, mutante defectiva en la síntesis del ácido D-aminopimélico (dap, lysA), que tiene un tiempo de generación de 48 minutos, se basaron en asumir que las nuevas cadenas de mureína que contienen el pentapéptido terminando en D-alanil-D-alanina sirven de dadores para la reacción de transpeptidación. Por medio de ensayos de marcación con pulsos de D-aminopimélico radioactivo ( $[^{14}\text{C}]\text{-A2pm}$ ) se observó que las nuevas cadenas de mureína entrantes eran inicialmente insertadas en las cadenas viejas.

Esto era razonable pues las nuevas cadenas sintetizadas contenían la cadena de pentapéptido terminada en D-alanil-D-alanina la cual es requerida para la reacción de transpeptidación (Wise y Park, 1965; Tipper y Strominger, 1965; Araki *et al.*, 1966; Hizaki *et al.*, 1966) y más del 97 % de los muropéptidos insertados en el sáculo durante los 3 min. del pulso con  $[^{14}\text{C}]\text{-A2pm}$  perdieron su D-alanina terminal comprobando que podían actuar como dadores. Midiendo la cantidad de radioactividad que se incorpora como A2pm, se pudo calcular la cantidad de mureína que se incorpora al sáculo (Burman y Park, 1984).

Recién después de 8 minutos que una cadena ha entrado se inserta una nueva cadena al lado de ésta (luego de un sexto de tiempo de generación) indicando que durante los 48 minutos totales ese sitio de síntesis deberá dar seis vueltas alrededor de la célula. El análisis de estos datos y otros en su conjunto permitieron crear un modelo en donde la síntesis de mureína se lleva a cabo con un sistema de 90 complejos enzimáticos asociados a la membrana (cada uno sería un sitio de síntesis), que viajan en forma unidireccional y en paralelo, alrededor de la circunferencia de la célula, como cierres relámpagos, abriendo, sintetizando, insertando y uniendo dos nuevas cadenas de muramil-pentapéptido a la vez entre dos cadenas de mureína

preexistentes, formando las uniones glicosídicas y entrecruzando las cadenas por enlaces peptídicos, duplicando así el largo del sáculo por generación, en una apasionante y compleja combinación de mecanismos moleculares (Burman y Park, 1984).

Una interesante revisión ha aparecido recientemente acerca de una descripción unificada de la síntesis del peptidoglicano durante el ciclo de división celular en bacterias Gram negativas (Cooper, 1991).

### 3.b) MEMBRANA EXTERNA:

Como se comentara anteriormente la membrana externa está ubicada por fuera de la pared celular en organismos Gram negativos (Ver Fig.I) y está formada por lipoproteínas, lipopolisacáridos, ácidos teicoicos (Gram positivos) y otros componentes lipídicos como fosfolípidos.

#### -LIPOPOLISACARIDOS (LPS):

Este tipo de compuestos se encuentra exclusivamente distribuido en bacterias Gram negativas. Forman parte de la membrana externa conjuntamente con otros componentes como proteínas, lipoproteínas y fosfolípidos. Los LPS se encuentran de tal manera que exponen su fracción sacarídica hacia el medio extracelular, actuando como receptores de bacteriófagos (Cadieux *et al.*, 1983). Como los oligosacáridos expuestos además son antigénicos, son una de las causas de respuestas inmunes o serológicas. Además, los LPS de enterobacterias son responsables de la actividad endotóxica de este grupo de bacterias (Nowotny, 1984).

*Neisseria meningitidis* es una bacteria Gram negativa causante de la enfermedad meningitis bacteriana y de bacteremias. Hoy en día se sabe que en los países del tercer mundo, como la Argentina, más de 310.000 personas al año sufren infecciones causadas por *N. meningitidis*, resultando en 35.000 muertes (Robbins y Freeman, 1988). Muchos más casos y muertes por año están estimados para el caso de los patógenos encapsulados: *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* (800.000 y 100.000.000 casos con 145.000 y 10.000.000 muertes, respectivamente) (Robbins y Freeman, 1988).

A raíz de esto, en los comienzos de los años ochenta "La Organización Mundial de la Salud" inició un programa de desarrollo de vacunas para la prevención de las infecciones epidémicas y endémicas de enfermedades meningococales. Recientemente se ha introducido el estudio de vacunas realizadas a base de polisacáridos y/o oligosacáridos del LPS conjugados con proteínas. Por otra parte,

anticuerpos específicos anti-LPS de *N. meningitidis* tienen un gran poder de protección contra infecciones de este patógeno, aumentando la bacteriolisis, el poder fagocítico y la neutralización del efecto mediado por endotoxinas (Verheul *et al.*, 1993).

Los LPS presentan una gran variedad estructural, formando una familia de polisacáridos muy complejos y bastante estudiada (Luderitz, 1971; Rietschel, 1984; Jacobs, 1986). Los más estudiados son los de *Salmonella* y *Escherichia*.

Hoy en día se conoce bastante bien la estructura de algunos LPS. Están constituidos por tres regiones: el Lípido A, el Núcleo y el antígeno-O (Fig. VI).

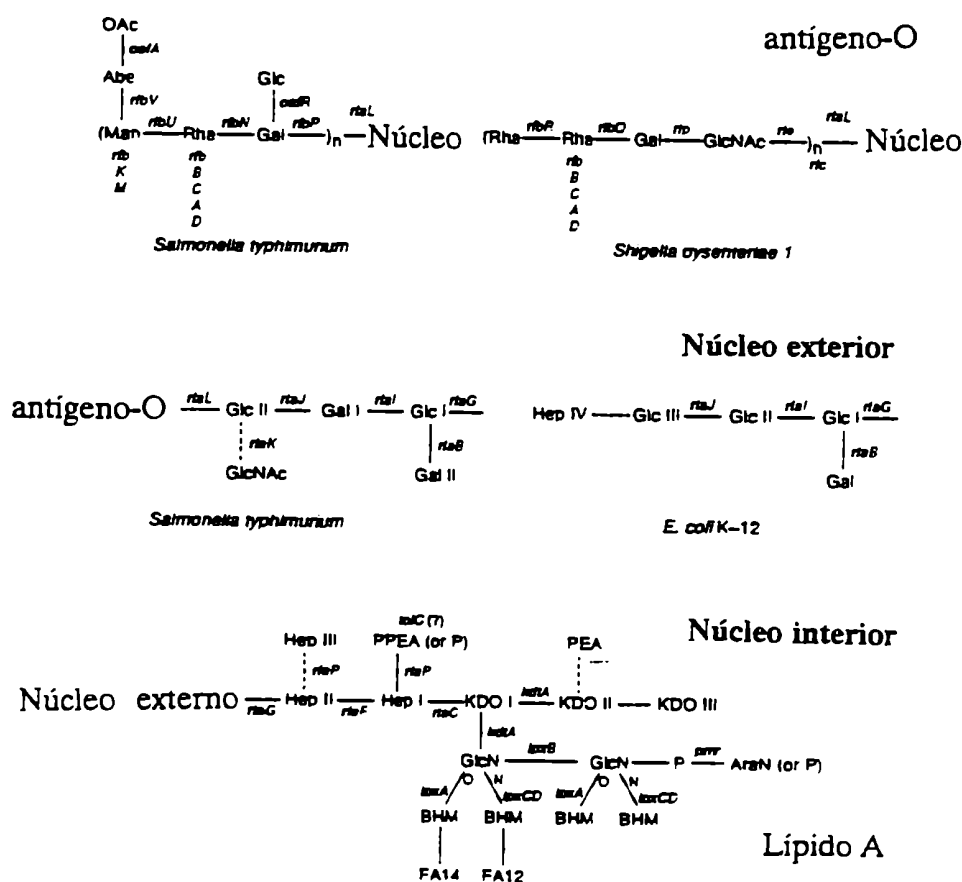


Fig.VI: Estructura del Lípido A, el Núcleo interior, el Núcleo exterior y el antígeno-O, de bacterias entéricas. Además se indican la mayoría de los genes involucrados en su síntesis, (tomado de Schnaitman y Klena, 1993).

### **-HETEROGENEIDAD DEL LPS:**

El antígeno-O es la porción más externa del LPS, pudiendo variar de cepa a cepa, y consiste en una unidad repetitiva (en el caso de *Salmonella typhimurium*, D-manosa-L-ramnosa-D-galactosa) repetida un número n de veces. La unidad repetitiva puede estar formada por otros azúcares según la especie (Fig.VI).

En *Salmonella* sp, se ha encontrado que en diferentes preparaciones los LPS pueden diferir en el largo de las cadenas laterales y además algunos Lípidos A presentaban Núcleo pero no antígeno-O.

La estructura del LPS de *Salmonella newington* fue muy estudiada y se encontró que el antígeno-O presenta una heterogeneidad de tamaños (Ryan y Conrad, 1974). Lo mismo se vió en una serie de enterobacterias estudiadas (Jann *et al.*, 1979).

Un aspecto interesante es que las condiciones de cultivo pueden afectar la composición del LPS. En ensayos utilizando *Salmonella anatum*, se encontró que el LPS de bacterias cultivadas a 20°C presentaba un Núcleo menos sustituido por restos acetatos que el obtenido normalmente a 30-35°C (Mc Connell y Wright, 1974).

El LPS de *Pseudomonas aeruginosa* de células cultivadas a 19°C resultó insensible a fagos, que normalmente lo reconocen, por falta del resto de fucosamina en la cadena del antígeno-O (Cadieux *et al.*, 1983).

Por otra parte, cultivos en estado estacionario de *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* presentan cambios en la inmunogenicidad de sus LPS a causa de que estos presentan cadenas más cortas de antígeno-O (Hrabak *et al.*, 1981).

En las bacterias silvestres, el antígeno-O es el responsable del aspecto mucoide de la colonia ó S (del inglés: Smooth) y en mutantes en donde está ausente, las colonias son rugosas ó R (del inglés: Rough).

Un gran número de bacterias Gram negativas presentan dimorfismo en su ciclo de vida, pudiendo existir tanto como células vegetativas como en una típica morfología de formas latentes, microcistos o myxosporas. Las Myxobacterias, por ejemplo, presentan un LPS compuesto por ribosa y 3-O-metil-D-xilosa (Sutherland y Smith, 1973). El LPS de *Azotobacter* sp es menos complejo, pues contiene sólo L-ramnosa y el de *Methylomonas albus* está compuesto principalmente por D-glucosa (Sutherland, 1988). En todas estas cepas al pasar al estado de microcisto, el LPS desaparece y es reemplazado por otros polisacáridos. En el caso de *Myxobacteriaciae*, *Azotobacter vinelandii*, y *Methylomonas albus*, es reemplazado por un glucano  $\alpha(1-3)$  (Sutherland y Mackenzie, 1977).

## **-BIOSINTESIS DEL LPS**

La síntesis del LPS se realiza por partes separadas y los componentes se ensamblan al final para formar la molécula terminada.

En *Salmonella newington* el antígeno-O se sintetiza de la siguiente manera. En una primer etapa, la unidad repetitiva se sintetiza a partir de los dadores de azúcares respectivos (GDP-Man, TDP-Ram, UDP-Gal, etc.) que transfieren su resto glicosídico por acción de glicosiltransferasas a un aceptor lipídico en la membrana interna (Undecaprenol-mono-fosfato). El azúcar inicial se transfiere como éster-1-fosfato, para mantener el puente difosfato. Estos resultados fueron muy importantes por que se trataba de la primera vez que se describía la intervención de los prenil-fosfo-azúcares como intermediarios de biosíntesis de un polisacárido (Wright *et al.*, 1967).

Una vez que la unidad repetitiva está formada, ésta se polimeriza n veces creciendo a partir de su extremo reductor para brindar el antígeno-O final. Es el primer ejemplo de este tipo de biosíntesis descrito (Robbins *et al.*, 1967).

Luego este polisacárido es transferido a otro polisacárido denominado Núcleo externo o polisacárido R previamente sintetizado (Ver Fig.VI).

Por otra parte, utilizando otras enterobacterias como modelo se ha visto que el Lípido A se sintetiza en el lado interno de la membrana citoplasmática partir de UDP-GlcNAc y  $\beta$ -OH-miristil-ACP, en una cadena de reacciones ATP dependientes (Jacobs, 1986). El KDO, 2-ceto-3-deoxioctónico, es provisto por CMP-KDO y la heptosa proviene del ADP-heptasacárido (Koeris y Kontrohr, 1984), también con requerimiento de ATP. El ADP-heptasacárido y el ADP-Glc (dador de glucosa en la síntesis de almidón en plantas y glucógeno en bacterias) corresponden a los dos únicos derivados de ADP dadores de azúcares conocidos hasta el momento.

Por último, la síntesis del Núcleo externo es producto de una adición secuencial de los diferentes azúcares sobre el Núcleo interno ya formado a partir de los respectivos dadores activados, UDP-Gal, UDP-Glc, UDP-GlcNAc, y el Lípido A preformado (Jacobs, 1986).

Una vez que el polisacárido del Núcleo externo o polisacárido R está finalizado, recibe el antígeno-O que como se comentó más arriba se sintetiza independientemente y el LPS final es secretado a la membrana externa para establecerse en la parte exterior de la célula.

El cambio en la estructura de las cadenas del antígeno-O del LPS producido por "conversión lisogénica" fue estudiado en elegantes trabajos descriptos por el

grupo de Robbins (Robbins *et al.*, 1965), citados en otros trabajos de revisión (Lindberg, 1977).

Un ejemplo de variación artificial de la molécula de LPS está dada por el efecto de elementos extracromosomales (Hoffman, 1980). Se preparó un plásmido que lleva información para sintetizar una cadena de antígeno-O formada por una unidad repetitiva diferente a la natural, como el tetrasacárido (Gal-Ram-Glc-GlcNAc), pCoII drd2. Si se lo introduce en células silvestres de *Salmonella typhimurium*, este elemento extracromosomal cambia la estructura del LPS, desplazando la entrada del antígeno-O natural e introduciendo una fuente de variación en el antígeno-O (Hoffman, 1980).

#### **-GENES INVOLUCRADOS EN LA SINTESIS DEL LPS:**

La genética de la biosíntesis del LPS de bacterias entéricas ha sido estudiada en los últimos años (Mäkelä y Stocker, 1984; Schnaitman y Klena, 1993).

Se ha realizado una minuciosa descripción de los genes involucrados en la síntesis del Núcleo y del antígeno-O y se sabe que en *E.coli* K-12 y *Salmonella typhimurium* estos grupos de genes se encuentran en dos regiones en el cromosoma y cercanos a estos existe además otro grupo de genes involucrados en la síntesis del polisacárido capsular (que veremos mas adelante). El grupo de genes llamado rfa, codifica las enzimas involucradas en la síntesis del Núcleo (Bachmann, 1990). En *E.coli* K-12 el grupo rfa está formado por 17 genes (Klena *et al.*, 1992). Por otro lado, los genes rfb codifican las enzimas involucradas en la síntesis del antígeno-O. El gen rfc, no ligado genéticamente a los grupos anteriores, codifica la enzima que polimeriza la unidad repetitiva del antígeno-O (Klena *et al.*, 1992). Finalmente una enzima constituida por dos proteínas, codificadas por los genes rfb T y rfa L y localizadas en la posición 42 y 79 del mapa del cromosoma de *Salmonella typhimurium*, respectivamente, es la responsable de la unión del antígeno-O finalizado al Núcleo externo (Sanderson y Roth, 1988).

La polimerasa (gen rfc) uniría a las unidades repetitivas del antígeno-O produciendo la cadena, y la ligasa (genes rfb T y rfa L) uniría el antígeno-O completo al oligosacárido del Núcleo externo (Jann y Jann, 1984).

Recientemente en *E. coli* se ha descrito una nueva enzima que estaría incluida dentro del grupo de las enzimas de biosíntesis del antígeno-O y su función sería la de regular la distribución de tamaños en la población de moléculas de antígeno-O (Batchelor *et al.* 1991). El gen que codifica dicha función se lo ha denominado rol por algunos autores (del inglés: regulator of O length), ha sido

secuenciado y presenta alta homología con el gen de una proteína Rol descrita en *S. typhimurium* (Batchelor *et al.* 1992). Otros autores han descrito el mismo gen en *E. coli* y *S. enterica* en trabajos realizados en forma relativamente simultánea, llamándolo en este caso a éste gen cld (del inglés: chain length determinant) (Bastin *et al.*, 1993), que sería homólogo al gen rol anteriormente nombrado.

En *Salmonella typhimurium*, la región rfb comprende 16 genes (Jiang *et al.*, 1991), pero su número puede variar de cepa a cepa en función del número y composición de azúcares del antígeno-O.

La mayoría de los genes involucrados en la síntesis del Lípido A, está ubicada en un operón muy grande y heterogéneo, y los restantes genes, que codifican para funciones comunes con otras vías metabólicas, se encuentran distribuidos de manera aleatoria dentro del cromosoma (Tomasiewicz y Mc Henry, 1987).

En la Fig.VI además podemos observar la mayoría de los genes involucrados en la síntesis del LPS: Lípido A, Núcleo y antígeno-O para el caso de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella dysenteriae* 1 (Schnaiman y Klena, 1993).

#### **-ANTIGENOS COMUNES DE ENTEROBACTERIAS:**

En microorganismos Gram negativos, la familia Enterobacteriaceae se caracteriza por tener un antígeno en la superficie celular llamado ECA (del inglés: Enterobacterial Common Antigen) que comparte sus características inmunogénicas con los LPS (Mäkelä y Mayer, 1976; Mayer y Schmidt, 1979; Ramia *et al.*, 1982).

Los ECA están formados por una fracción sacarídica (polisacárido) unida a un ácido fosfatídico inmerso en la membrana externa (Kuhn *et al.*, 1983).

La porción sacarídica de la molécula está formada por un heteropolisacárido compuesto por: N-acetil-D-glucosamina, (GlcNAc); N-acetil-D-manosaminurónico, (ManNAcA) y 4-acetamido-4,6-dideoxi-D-galactosa, (Fuc4NAc).

El polisacárido tiene estructura lineal y formada por el trisacárido 4- $\beta$ -D-ManNAc-(1-4)- $\alpha$ -D-GlcNAc-(1-3)-D-Fuc4NAc-(1-4). Este trisacárido es producto de una degradación química de la molécula total, ya que como veremos más adelante la unidad repetitiva real que se sintetiza biológicamente es un trisacárido con el resto GlcNAc en el extremo reductor.

Esta molécula de heteropolisacárido se encuentra en general covalentemente anclada a través del residuo GlcNAc por medio de una unión O-glicosídica a un fosfato del ácido fosfatídico (Kuhn *et al.*, 1983). La porción polisacarídica es inmunodominante, es decir, genera respuesta serológica.



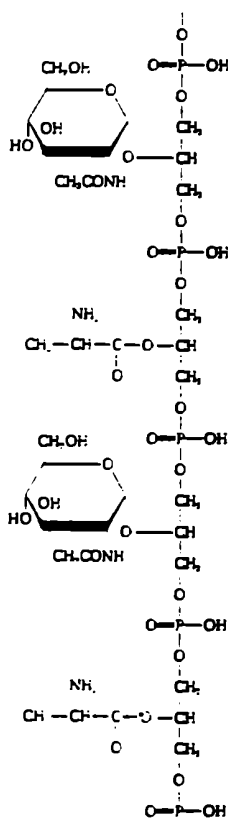


Su estructura está formada por cadenas poliméricas de moléculas de glicerol o ribitol, unidas entre sí por puentes fosfodiéster (Ward, 1981).

Existen dos grupos importantes:

- a) Poliglicerol fosfatos
- b) Poliribitol fosfatos

Según las especies pueden ser mucilaginosos o bien formar cápsulas resistentes o duras. Los ácidos teicoicos son antigénicos, y esta propiedad es utilizada para la clasificación taxonómica de diferentes bacterias. En diferentes cepas los grupos hidroxilos libres pueden estar substituidos parcialmente por glucosa, galactosa, N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina o D-alanina. En la Fig.VIII se da un ejemplo de una porción de un ácido teicoico.



**Fig.VIII: Representación de un segmento de un ácido teicoico que contiene cadenas laterales de D-alanina y de N-acetil-glucosamina.**

Otras estructuras más complejas han sido descritas en donde la unidad repetitiva de la cadena principal contiene hexosas, como: (GlcNAc-P-glicerol-P)<sub>n</sub>; (Glc-glicerol-P)<sub>n</sub>; (Gal-glicerol-P)<sub>n</sub>; (Glc-GalNAc-P)<sub>n</sub> y (GlcNAc-P)<sub>n</sub>.

La biosíntesis de estos compuestos presenta el siguiente esquema:

CDP-glicerol y CDP-ribitol actúan como dadores de poli-ol-P y los azúcares son transferidos por los correspondientes nucleótido azúcares. La incorporación de D-alanina requiere  $Mg^{2+}$  y ATP.

En la biosíntesis de algunos de estos ácidos teicoicos se ha descrito la participación de prenil derivados y de ácidos lipoteicoicos, en reacciones no bien aclaradas (Ward, 1981; Fisher, 1988).

El producto final se encuentra covalentemente unido al péptidoglicano.

Finalmente, en condiciones de fosfato limitantes, las bacterias responden sintetizando una familia relacionada de polisacáridos, los "ácidos teicurónicos". Aquí el fosfato está ausente y sus cargas negativas están reemplazadas por un ácido urónico. Un compuesto de este tipo también fue descrito en bacterias Gram negativas como en *Rhizobium meliloti* (Coira *et al.*, 1987).

#### 4) CAPSULA:

La cápsula está formada por polisacáridos que se encuentran alrededor de la célula por fuera de la membrana externa, íntimamente unida a ésta formando una capa externa o cápsula, CP (del inglés: Capsular Polysaccharides) (Ver Fig.I). No todos los microorganismos forman cápsula, algunos tienen como límite celular entonces, los componentes de la membrana externa.

Pueden estar anclados en la membrana como es el caso del ácido polisiálico (Sutherland, 1988) ó estar estabilizados sobre la membrana por ser insolubles en agua o extremadamente viscosos, como es el caso del "curdlano" sintetizado por *Agrobacterium tumefaciens* (Sutherland, 1988).

Los ácidos polisiálicos son en general homopolisacáridos compuestos por N-acetil-neuroamínico, variando según la especie el tipo de unión glicosídica.

El ácido polisiálico producido por *E. coli* K 235 es un homopolímero del N-acetil-neuramínico (Poli- $\alpha$ -2-8-N-acetil-neuramínico) y fue llamado ácido colomínico (Barry y Goebel, 1957). Se ha descrito que otras cepas de *E. coli* producen también el mismo polisiálico (Egan *et al.*, 1977, Rohr y Troy, 1980) y en algunos serotipos de *Salmonella* (Kedzierska, 1978).

*N. meningitidis* grupo B produce un ácido polisiálico de idéntica estructura al ácido colomínico de *E. coli* K 235 (Bhattachargee *et al.*, 1975, 1976; Glode *et al.*,

1977; Liu *et al.*, 1971). Este polisialico al tener unión  $\alpha(2-8)$  se caracteriza por ser clivado por la neuraminidasa de *Vibrio cholerae*. El grupo C de *N. meningitidis* produce un polímero diferente que es resistente al clivaje enzimático de la neuraminidasa de *Vibrio cholerae* por que su estructura es de un polisialico en unión  $\alpha(2-9)$  (Battachargee *et al.*, 1975, 1976).

La biosíntesis de estos compuestos ha sido estudiada en parte en el caso de *E. coli* (Troy, 1979) y en *N. meningitidis* (Masson y Holheim, 1985). De estos estudios se sabe que existe un dador de azúcar, CMP-NeuNAc, que transferiría su resto glicosídico a un prenil-fosfato que intervendría en el ensamblado de las cadenas de polisialico (Whitfield *et al.*, 1984; Whitfield y Troy, 1984).

El grupo de Troy demostró que el polisacárido capsular, polisialico, que es sintetizado a través de intermediarios lipídicos, crece por su extremo no reductor (Rohr y Troy, 1980), contrariamente a lo observado para el caso de del antígeno-O de *Salmonella* (Robbins *et al.*, 1967). Pero para complicar la situación, un trabajo reciente demostró que en *E. coli* K-5, el polisacárido capsular ( $-\alpha 4\text{GlcA}-\beta\text{GlcNAc}-$ ) es sintetizado sin la participación de intermediarios lípido-azúcares y además crece por su extremo no reductor, mientras que en la síntesis del polisacárido capsular de *E. coli* K-1, intervienen los intermediarios lípido-azúcares (Finke *et al.*, 1991).

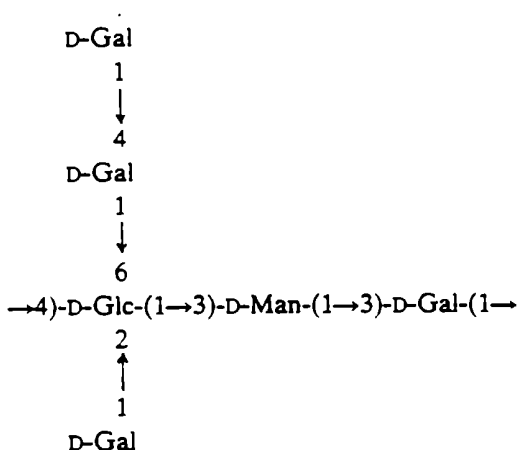
Por último, la participación de los intermediarios lípido-azúcares no ha sido aún demostrada para la síntesis del polisacárido de la cepa C-11 de meningococos (Vann *et al.*, 1978).

En el caso de los polisialicos de meningococos y de *E. coli* K-92, se ha detectado la presencia de un grupo hidrofóbico de 1,2 diacilglicerol unido por el extremo reductor. Este grupo ayudaría al anclado del polisacárido en la membrana externa de la célula (Sutherland, 1988). Otro estudio indicaría que el polisacárido, podría en algunos casos, estar unido a una proteína de la membrana externa (Troy, 1979).

Un heteropolisacárido capsular que ha sido muy estudiado es el producido por *Aerobacter aerogenes* (Troy *et al.*, 1971). Su unidad repetitiva está formada por un tetrasacárido compuesto por los azúcares galactosa, manosa y ácido glucurónico. La cadena principal es  $-3\text{Gal}\alpha(1-3)\text{Man}\alpha(1-3)\text{Gal}\alpha-$  con el resto de ácido glucurónico formando una ramificación en unión  $\beta(1-2)$  al oxhidrilo en posición 2 de la manosa. El polisacárido es el producto de la polimerización cabeza-cola de esta cadena principal. Utilizando cepas mutantes en la síntesis de UDP-Gal o de GDP-Man (mutantes de UDP Gal-4-epimerasa o GDP-Man pirofosforilasa, respectivamente) se obtuvieron preparados enzimáticos útiles para el estudio de la

biosíntesis de este polisacárido, siendo el primer CP en donde se demostró la participación de nucleótido azúcares como dadores y la formación de intermediarios lípido-fosfo-azúcares precursores, conteniendo la unidad repetitiva, capaces de polimerizarse para dar el polisacárido capsular final (Troy *et al.*, 1971)

Otro polisacárido capsular del cual se conoce muy bien su estructura pero nada de su biosíntesis es el producido por ciertas cepas de *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* y *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* (Zevenhuizen y Neerven, 1983; Zevenhuizen, 1984). Su estructura consta de una unidad repetitiva, un heptasacárido, compuesto por D-glucosa, D-manosa y D-galactosa, con la estructura que se muestra en la Fig.IX. Como vemos la cadena principal está compuesta por uniones (1-3) y (1-4). No se encontró este tipo de compuesto en cepas de *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* y *Rhizobium meliloti*.



**Fig.IX: Polisacárido capsular neutro producido por varias cepas de *Rhizobium* (Zevenhuizen y Neerven, 1983)**

Paralelamente, *Agrobacterium*, también sintetiza un polisacárido capsular insoluble llamado "curdlano", formador de geles. Presenta estructura de glucano  $\beta(1-3)$  y puede ser extraído de las células con NaOH 0.5 M frío y precipitado por neutralización de la solución con ácido (Harada *et al.*, 1968). *Alcaligenes faecalis* *var. myxogenes* (Harada *et al.*, 1968) y *Agrobacterium radiobacter*. *Agrobacterium*

*rhizogenes* y *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*, también sintetizan curdlano (Ghai *et al.*, 1981).

Por otro lado, los alginatos son heteropolisacáridos capsulares que no contienen una estructura de unidad repetitiva regular. Están compuestos por D-manurónico y L-gulurónico y son los polisacáridos más cargados que se conocen en bacterias. Este compuesto en bacterias difiere de los alginatos producidos por las algas marinas eucariontes en que posee restos O-acetilos asociados a los residuos D-manurónicos (Davidson *et al.*, 1977; Sgaek-Braek *et al.*, 1986). En alginatos producidos por algunas bacterias el contenido de O-acetilos puede representar el 14% del peso seco.

*Azotobacter vinelandii* produce un alginato capsular que está presente además en las células que forman el "microcisto". El polisacárido está asociado tanto a las láminas de "intina" como de "exina" y es un componente fundamental para la formación del encisto (Eklund *et al.*, 1966).

También dentro del grupo de las *Pseudomonas* hay cepas que sintetizan alginatos y están muy bien caracterizados, presentando altos contenidos de residuos D-manurónicos (Sutherland, 1985).

Curiosamente, los alginatos producidos por las especies de *Pseudomonas* patógenas de plantas, presentan una masa molecular aparente mucho menor (Fett *et al.*, 1986; Sutherland, 1985).

La biosíntesis del alginato de *Pseudomonas aeruginosa* se ha estudiado en parte y se sabe que es sintetizado inicialmente como un homopolímero de D-manurónico y luego es epimerizado y acetilado en forma aleatoria (Deretic *et al.*, 1991). Poco se sabe de como es polimerizado, acetilado, epimerizado y exportado al exterior.

Por otro lado, la excreción de los CP no es necesariamente uniforme, ya que en especies que forman una cápsula que rodea a la bacteria como en *E. coli* se ha podido observar que los sitios por donde el polisacárido sintetizado emerge están distribuidos al azar en la superficie bacteriana (Bayer y Thurow, 1977).

Por otro lado, en especies de bacterias dimórficas capaces de formar prostecas, con un estadio sésil pedunculado y otro flagelado y de vida libre, como por ejemplo *Asticacaulis biprosthecum*, sintetiza un polisacárido capsular ácido que se encuentra sólo en la base de la prosteca. Esta asimetría o polaridad origina que se formen las típicas rosetas de bacterias pegadas por las bases del pedúnculo (Umbreit y Pate, 1978) teniendo una importancia crucial para este grupo de bacterias acuáticas oligoheterotróficas y aerobias estrictas porque al tener un estadio sésil deben

pegarse a plantas o diatomeas en donde las concentraciones de oxígeno y fotosintatos son fundamentales para su supervivencia (Sutherland, 1988).

Por último, *Bradyrhizobium japonicum* también sintetiza un polisacárido capsular en forma polar (Tsien y Schmidt, 1977).

## 5) EXTERIOR CELULAR:

Se la define como una zona externa a los límites celulares (Fig.I) donde se secretan compuestos solubles como los exopolisacáridos y otros compuestos que veremos más adelante como lipooligosacáridos que intervienen en procesos de interacción con plantas (Factores Nod).

### -EXOPOLISACARIDOS:

Se los define como polisacáridos que están por fuera de los límites de la cápsula (cuando existe) (Fig.I), pudiendo ser heteroexopolisacáridos (formados por varios azúcares) u homoexopolisacáridos (formados por un sólo tipo de azúcar).

Los más abundantes son los heteropolisacáridos o exopolisacáridos complejos (EPS), que se caracterizan por ser muy solubles en soluciones acuosas y encontrarse en los medios de cultivo.

Los homoexopolisacáridos son menos frecuentes, y excepcionalmente pueden ser insolubles, como es el caso de la celulosa bacteriana, que forma fibras alrededor de la célula productora.

### -HOMOEXOPOLISACARIDOS:

#### a) BACTERIO-CELULOSA:

La celulosa es un homopolímero de la glucosa en unión  $\beta(1-4)$ . Ha sido muy estudiada en el caso de varias cepas de *Acetobacter xylinum* (Delmer, 1983) y fué descripta además en varias especies de bacterias incluyendo *Rhizobium* y *Agrobacterium* (Deinema y Zevenhuizen, 1971). La celulosa se dispone como microfibrillas alrededor de las células y en el caso de *Acetobacter xylinum* la cantidad sintetizada es tanta que la superficie del cultivo toma un aspecto de gel. Cuando esta cepa es cultivada en medio líquido estático (Botellas de Roux), la síntesis de celulosa es mayor que con respecto a los cultivos agitados (Schramm y Hestring, 1954).

La biosíntesis es a partir de UDP-Glc (Glaser *et al.*, 1958) y está controlada por un mecanismo regulatorio muy complejo en donde la celulosa-sintasa está afectada por un nucleótido activador no usual, el bis(3'-5') ácido diguanílico cíclico

(Ross *et al.*, 1987). Una interesante revisión acerca de la biosíntesis y su regulación se ha publicado recientemente (Ross *et al.*, 1991).

#### **b) DEXTRANOS Y LEVANOS:**

Ambos son homopolisacáridos liberados al medio pero con la particularidad de que su biosíntesis es extracelular.

Los Dextranos son polímeros de glucosa generalmente en unión  $\beta(1-6)$  con ramificaciones  $\beta(1-3)$ . Han sido descritos en una serie de microorganismos como *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Sutherland, 1982). Su biosíntesis es llevada a cabo a partir de la sacarosa, que actúa como dador de D-glucosa, que es polimerizada extracelularmente por una enzima llamada dextran-sucrasa (Huang *et al.*, 1979).

Los levanos en cambio son polímeros de la D-fructosa en unión  $\beta(2-6)$  y fueron descritos en especies de *Erwinia* (Bennett y Billing, 1980) y en *Pseudomonas* (Fett *et al.*, 1989). En cambio en *Bacillus subtilis* el levano presenta una estructura de polifruktosa pero en unión  $\alpha(2-6)$ . Al igual que en el caso de los dextranos el resto glicosídico (aquí la fructosa) es obtenido a partir de la sacarosa y polimerizada extracelularmente por la enzima levan-sucrasa (Dedonder, 1972).

#### **-HETEROEXOPOLISACARIDOS:**

Se los clasifica como polisacáridos complejos solubles, llamados generalmente exopolisacáridos (EPS), que luego de ser sintetizados son liberados al medio. Como se encuentran en el exterior celular (Fig.I) son responsables de una serie de funciones como protección mecánica y a la desecación (al ser muy higroscópicos retienen grandes cantidades de agua, creando un "microhabitat" a la bacteria productora). Intervienen en procesos de adhesión, reconocimiento y competitividad aumentando la capacidad infectiva tanto de cepas patógenas u oportunistas de animales y humanos (*Pseudomonas*) y plantas (*Xanthomonas*) como aquellas especies simbiotes de plantas (*Rhizobium*) (Costerton *et al.*, 1987).

Su estructura es compleja, en general están formados por una unidad repetitiva constituida por varios azúcares como: D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, L-rafinosa, D-ácido glucurónico, etc. Además pueden presentar substituyentes no glicosídicos en forma de O-acilos, como acetilos y succinilos, y cetal-piruvatos.

Los restos urónicos y los substituyentes como succinilos y piruvilos le confieren carga negativa por lo que frecuentemente se los denomina "exopolisacáridos ácidos" (Sandford, 1979; Sutherland, 1982; 1985).

Un gran número de EPS ha sido descrito y estudiado, tanto en su estructura como en su genética. Los mejor caracterizados han sido el ácido colánico producido por *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Acetobacter cloacae* (Grant *et al.*, 1969); el succinoglicano, producido por *Rhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* (Hisamatsu *et al.*, 1980); el acetano, producido por *Acetobacter xylinum* (Couso *et al.*, 1987; Jansson *et al.*, 1993); el xantano, producido por *Xanthomonas campestris* (Jansson *et al.*, 1975); los exopolisacáridos producidos por *Rhizobium leguminosarum* (Albersheim *et al.*, 1975; Mc Neil *et al.*, 1986) y muchos otros. En la Fig.X, se muestran las estructuras de sus correspondientes unidades repetitivas.

Todos estos polisacáridos presentan grandes masas moleculares aparentes, entre 2-4  $10^6$  Da.

Por otra parte otros exopolisacáridos producidos por patógenos de plantas como *Erwinia stewartii* y *Erwinia amylovora* han sido bien caracterizados. Por ejemplo, *E. amylovora* produce un polisacárido compuesto por D-galactosa, D-glucurónico y cetal-piruvato (Fig.X, 8), recientemente denominado "amylovorano" (Smith *et al.*, 1990). El amylovorano tiene un tamaño aproximado de 50-150 MDa (Leigh y Coplin, 1992).

El EPS producido por *E. stewartii* se encuentra en los sobrenadantes de cultivo y es también muy grande, aprox. 45 MDa, es muy viscoso y además cargado (Gorin y Spencer, 1961). Su estructura es una unidad repetitiva formada por un heptasacárido compuesto por D-glucosa, D-galactosa, D-glucurónico en relación 4:2:1 (Costa, 1991).

Por último describiremos al ácido colánico sintetizado por *E. coli* K-12, también llamado antígeno M. La estructura ha sido descrita anteriormente (Fig.X, 7) (Grant *et al.*, 1969) y como vemos corresponde a un polímero formado por una unidad repetitiva compuesta por glucosa, galactosa, fucosa y ácido glucurónico y sustituyentes no glicosídicos como O-acetilos y cetal-piruvatos. Los primeros estudios de su genética fueron realizados por el grupo de Markovitz (Markovitz, 1977). Este polisacárido es sintetizado en cantidades relativamente pequeñas en las cepas silvestres pero puede incrementar su producción en algunas mutantes espontáneas.

Una observación muy interesante es que bajo condiciones de estrés, cuando la gran mayoría de las bacterias mueren, muchas de las colonias sobrevivientes son extremadamente mucoides. La regulación de la síntesis desde un punto de vista genético se ha estudiado en detalle y parecería estar formada por un sistema de dos componentes (Gottesman y Stout, 1991).





Las mutaciones más comunes que producen la activación de la síntesis estarían ubicadas en el gen Lon, que codifica para una proteasa ATP dependiente (Bukhari y Zipser, 1973). En condiciones en las que el gen Lon no es funcional no sintetiza la proteasa y su sustrato, la proteína RcsA, que es el regulador positivo de la síntesis del colánico, queda estabilizada y la célula produce cantidades muy grandes de ácido colánico (Gottesman, 1989). Una revisión de la regulación de la síntesis de este polisacárido ha sido publicado recientemente (Gottesman y Stout, 1991).

Los genes estructurales que codifican las enzimas involucradas en la síntesis del ácido colánico, genes cps, comprenden seis grupos de complementación localizados en dos regiones dentro del cromosoma (Trisler y Gottesman, 1984). Los 5 grupos de complementación del cpsA al cpsE se encuentran en el minuto 44 y el sexto, cps F, en el minuto 90 del cromosoma de *E. coli*. El gen cps B codifica para una manosa-1-P-guanililtransferasa, que interviene en la síntesis del GDP-fucosa, un intermediario del ácido colánico (Stevenson, 1991).

#### **-BIOSÍNTESIS DE LOS EPS:**

Aunque la biosíntesis de los EPS ha sido estudiada en algunos sistemas, el caso del xantano, producido por *Xanthomonas campestris*, es el único ejemplo en donde se conoce la secuencia completa de reacciones que conduce al polímero final (Ielpi *et al.*, 1981a; Ielpi *et al.*, 1983; Ielpi *et al.*, 1993). En otros casos como el succinoglicano producido por *Rhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* (Tolmasky *et al.*, 1980, 1982; Reuber y Walker, 1993; Staneloni *et al.*, 1984) y el acetano producido por *Acetobacter xylinum* (Couso *et al.*, 1987), se ha logrado la síntesis *in vitro* de la unidad repetitiva, pero no su polimerización *in vitro* para dar el EPS final.

La biosíntesis de los EPS ha sido revisada últimamente en trabajos muy detallados (Boulnois y Jann, 1989; Sutherland, 1988; Leigh y Copling, 1991).

En la secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de los EPS está inspirado en el modelo propuesto para la síntesis del antígeno-O de *Salmonella* (Robbins *et al.*, 1967).

La biosíntesis de los EPS comprende al menos cuatro estadios según un sistema muy estudiado que es el del xantano, tomado como modelo:

a) Síntesis de los respectivos nucleótido azúcares dadores, UDP-glucosa, UDP-galactosa, GDP-manosa, TDP-ramnosa, UDP-glucurónico, etc.

b) Transferencia de los restos glicosídicos a partir de los dadores mencionados en a) en forma secuencial, por medio de glicosiltransferasas

específicas, a un receptor lipídico de membrana interna (Undecaprenol-monofosfato) con la consiguiente formación de la unidad repetitiva unida al lípido por un puente difosfoester (oligosacárido-PP-lípido).

c) Transferencia de los restos no glicosídicos que "adornan" a la unidad repetitiva, como O-acetilos y cetal-piruvatos, a partir de los dadores acetil-CoA y fosfoenolpiruvato (PEP), respectivamente. El posible dador de restos O-succinilos sería el succinil-CoA. No siempre la adición de este tipo de compuesto se lleva a cabo una vez terminada la unidad repetitiva; para el caso de los O-acetilos y O-succinilos ocurre durante estadíos intermedios durante la incorporación de los restantes restos glicosídicos (Ielpi *et al.*, 1981b, 1983).

d) Una vez que la unidad repetitiva está formada y "adornada", el último proceso es el de polimerización, que une a las unidades repetitivas, brindando el polisacárido final que se libera al medio externo (exopolisacárido).

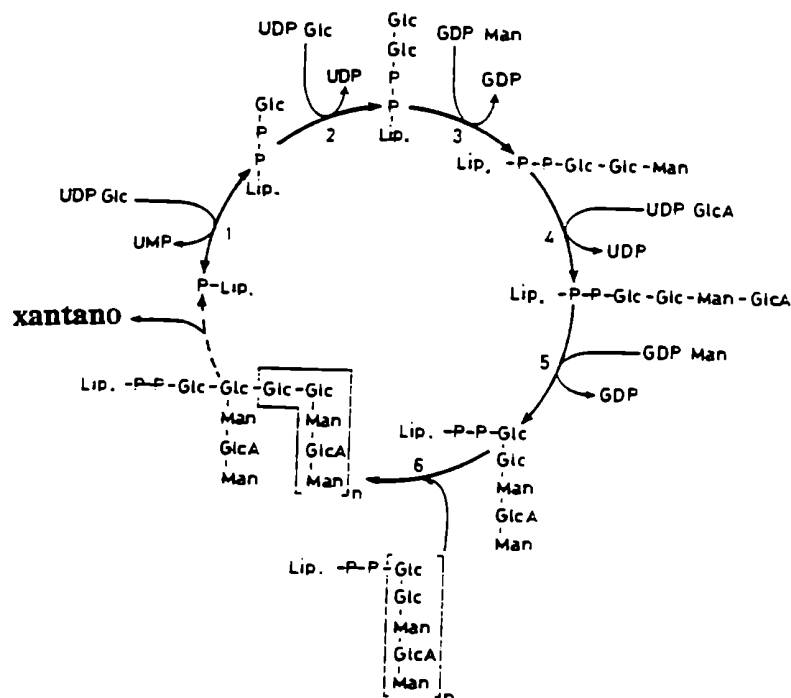


Fig.XI: Modelo de biosíntesis del xantano (tomado de Ielpi *et al.*, 1993).

Como se comentó anteriormente, el sistema de biosíntesis del xantano ha sido muy caracterizado, la unidad repetitiva es ensamblada sobre el lípido en el orden que se muestra en la Fig.XI. El primer resto glicosídico glucosa entra a partir de UDP-Glc como glucosa-1-P, con liberación de UMP, sobre un poliprenol monofosfato para dar el primer intermediario, poliprenol-PP-Glc (Fig.XI). Luego los restantes restos son transferidos a partir de los correspondientes dadores (UDP-Glc, GDP-Man y UDP-GlcA) en forma secuencial en el siguiente orden: Glc, Man, GlcA y Man (Fig.XI), liberando UDP o GDP, según el caso. El resto cetal-piruvato se transfiere a partir de PEP, a nivel del poliprenol-PP-pentasacárido sobre el resto de manosa externo. El grupo O-acetilo se introduce, a partir de acetil-CoA, sobre la manosa interna a nivel del poliprenol-PP-tetrasacárido (Ielpi *et al.*, 1983). Luego las cadenas de pentasacárido sustituido son polimerizadas creciendo por su extremo reductor para dar el polisacárido final, xantano (Ielpi *et al.*, 1993). Es importante destacar que este es el segundo caso descrito en donde la cadena crece por su extremo reductor, siendo el primero el antígeno-O de *Salmonella* (Robbins *et al.*, 1967).

En el caso del EPS acetano producido por *Acetobacter xylinum* y cuya estructura es muy parecida a la del xantano (Fig.X, 4), la adición secuencial de restos glicosídicos ha sido muy estudiada y sería la siguiente: Glc, Glc, Man, GlcA, Glc, Glc y Ram. Un detallado estudio de la biosíntesis de la unidad repetitiva se ha desarrollado en los últimos años aunque no se logró síntesis de polímero (García *et al.*, 1974; Couso *et al.*, 1980; Couso *et al.*, 1982). Evidencias indirectas sugieren que la unidad repetitiva es precursora del polímero (Iñon de Iannino *et al.*, 1988).

En el caso del succinoglicano o EPS I, producido por *Rhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* (Tolmasky *et al.*, 1980; Tolmasky *et al.*, 1982; Staneloni *et al.*, 1984) se obtuvo la síntesis *in vitro* de la unidad repetitiva (octasacárido, Fig.X, 5) a nivel de intermediario lipídico como también sus derivados acetilados y piruvilados pero no la polimerización.

Muchos intentos se han realizado para lograr obtener síntesis *in vitro* del succinoglicano, al igual que con el acetano, utilizando células tratadas con EDTA como preparados enzimáticos, pero hasta el momento de iniciar este trabajo no había sido posible.

En el caso de la cepa *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* NA-30, parte de la biosíntesis del EPS ha sido descrita, obteniéndose la unidad repetitiva pero no se ha logrado obtener polimerización *in vitro* (Bossio *et al.*, 1986).

### **-FIJACION DE NITROGENO:**

Un grupo importante de bacterias Gram negativas del suelo son las del género *Rhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium*. Se las puede encontrar tanto en vida libre, en donde sintetizan exopolisacáridos que liberan al medio, como asociadas a las raíces de las leguminosas (poroto, alfalfa, trébol, arveja, soja, etc.). A este tipo de asociación se la llama simbiosis. Las bacterias viven dentro de pequeños nódulos benignos donde el nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) es reducido a amoníaco y luego transformado en aminoácidos que serán utilizados tanto por la planta como por la bacteria. Como este fenómeno requiere de la presencia exclusiva de ambos organismos, bacteria y planta, se lo denomina "Fijación simbiótica de nitrógeno" (Meijer y Broughton, 1982; Rolfe y Gresshoff, 1988; Halverson y Stacey, 1986).

Este proceso tiene una importancia crucial tanto desde el punto de vista agrícola como económico, ya que interviene en el aporte biológico de nitrógeno a los suelos y por lo tanto no sólo fomenta el crecimiento de las plantas que han sido noduladas sino que éstas al morir brindan nitrógeno a los futuros cultivos.

### **-PROCESO DE INFECCION Y ESTABLECIMIENTO DEL NODULO:**

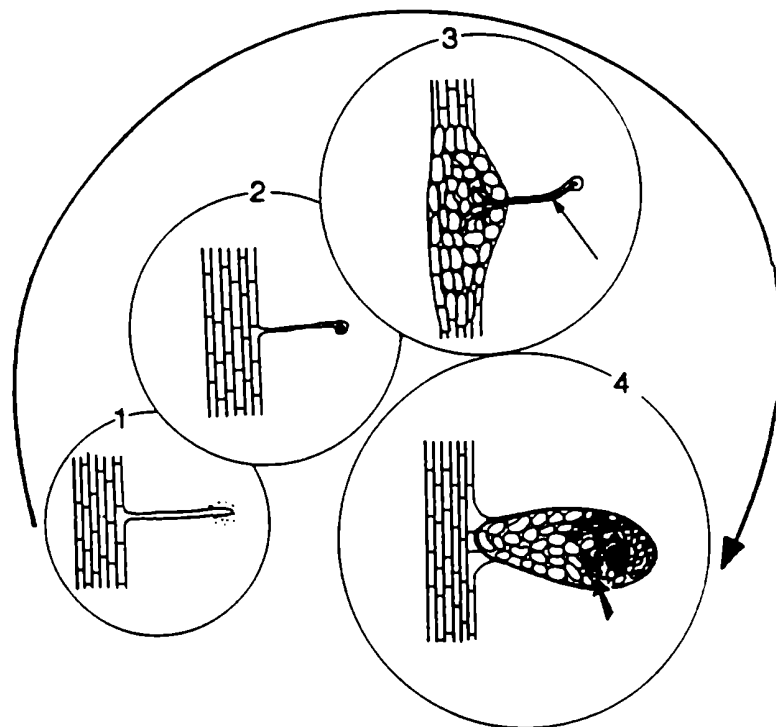
Un esquema simplificado de la interacción entre *Rhizobium* y su planta hospedadora, leguminosa, sería el siguiente: los primeros eventos en la interacción estarían representados por una gran cantidad de fenómenos mas o menos simultáneos. Inicialmente las raíces de las leguminosas liberan un exudado compuesto por una serie de sustancias como amino ácidos, azúcares, ácidos orgánicos, péptidos, proteínas (como las lectinas) y polisacáridos, que producirían un gradiente de atracción para una gran cantidad de microorganismos (Rovira, 1969). Esta zona alrededor de las raíces se llama rhizosfera. Además de estos compuestos anteriormente nombrados, las raíces liberan otros compuestos orgánicos llamados flavonas que actúan de forma altamente específica como quimioattractantes de los rhizobios (Caetano-Anollés *et al.*, 1988). Como veremos en detalle mas adelante, cada leguminosa libera una determinada flavona que es reconocido sólo por la especie de *Rhizobium* que tiene capacidad de nodularla. Estas flavonas en realidad, al ser absorbidas por las bacterias, activarían la expresión de los genes nod (Maxwell, 1989; Peter y Long, 1988). Por otra parte, muchos componentes de la superficie de la bacteria jugarían un papel muy importante durante la interacción temprana entre la bacteria y la planta, como los glucanos (Geremia *et al.*, 1987), los exopolisacáridos (EPS) (Leigh *et al.*, 1985; Chen *et al.*, 1985; Chacravarty *et al.*, 1982; Borthakur *et al.*, 1986) y los lipopolisacáridos (LPS) (Carlson *et al.*, 1987; Priefer, 1989; Lagares *et al.*,

1992). La adhesión temprana estaría dada en parte por la presencia de un tipo de proteína unidora de  $\text{Ca}^{2+}$ , liberada por *Rhizobium*, llamada "rhicadhesina". Este tipo de proteína estaría involucrada en una interacción directa entre la superficie de la bacteria y la superficie de la raíz, mediante un puente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Smit *et al.*, 1992). Por otra parte, en *R. l. bv. viciae*, uno de los genes pertenecientes al grupo de los genes nod, el gen nod O, codifica una proteína llamada Nod O que se expresa en presencia del flavonoide específico (naringenina), la cual también intervendría en la interacción con la superficie de la raíz en un mecanismo dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  al igual que en el caso de la rhicadhesina (Economou *et al.*, 1990). La secreción de esta proteína Nod O sería mediante un mecanismo semejante al de la Hemolisina de *E. coli* (Scheu *et al.*, 1992).

El primer paso visible en la interacción es la adhesión de la bacteria a la raíz. Un componente producido por las plantas que fue muy estudiado y que intervendría en esta etapa son las lectinas. Muchas evidencias demuestran que estas proteínas son secretadas por los pelos radiculares de la planta en la zona donde la bacteria toma contacto (Fig.XII,1). En algunos casos se demostró que intervienen en la interacción temprana con algunos polisacáridos de la superficie de la bacteria. Por ejemplo, la lectina producida por trébol, la trifolina A, se une específicamente a lipopolisacáridos (LPS) y a polisacáridos capsulares (CPS) producidos por *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii* (Dazzo *et al.*, 1976; Dazzo *et al.*, 1984). Lo mismo se observó entre la soja y *Bradyrhizobium japonicum* (Stacey *et al.*, 1980). En el caso de la alfalfa, se encontró una aglutinina que se unía específicamente a *Rhizobium meliloti*, pero no se la denominó lectina por que no se encontró el compuesto polisacárido en la bacteria capaz de unirse específicamente (Paau *et al.*, 1981). Este primer reconocimiento temprano podría estar seguido por otro proceso de adhesión a la raíz, mas estable, por medio de microfibrillas extracelulares producidas por la bacteria que se podría tratar de celulosa (Dazzo y Truchet. 1983; Dazzo *et al.*, 1984). Otro evento que se produce en esta primer etapa es la deformación y encurvamiento del pelo absorbente de la raíz (Fig.XII, 2). Dentro de este encurvamiento o rulo, los rhizobios promueven la formación en la planta de estructuras tubulares. Las estructuras tubulares originan en primer lugar la formación del "hilo de infección", realizado por la planta, que es una invaginación de la pared celular del pelo (Fig. XII, 3). Por este hilo o tubo de infección la bacteria puede entrar a la planta y una vez que el hilo llega al tejido meristemático de la raíz, las células corticales son inducidas a dividirse y luego son invadidas por bacterias que se desplazan por las ramificaciones del hilo (Fig. XII. 3). En este momento las

bacterias, son invaginadas dentro del citoplasma de las células de la planta y se diferencian morfológica y fisiológicamente a un estado llamado "bacteroide". Esta estructura en su conjunto se desarrolla formando el nódulo maduro (Fig. XII, 4) que brinda el ambiente necesario para que la enzima nitrogenasa del bacteroide pueda reducir en condiciones de poco contenido de oxígeno el nitrógeno atmosférico.

Cada uno de estos pasos (la formación y establecimiento del nódulo maduro) están dirigidos además por una serie de genes de la planta que codifican para una serie de proteínas llamadas "nodulinas" (Nap y Bisseling, 1990).



**Fig.XII: Desarrollo de un nódulo simbiótico en una leguminosa. 1, acercamiento de las bacterias al pelo absorbente de la raíz; 2, encurvamiento del pelo absorbente e introducción de las bacterias dentro del rulo; 3, crecimiento del hilo de infección; 4, nódulo maduro, la flecha indica las células de la planta empaquetando bacteroides fijadores de nitrógeno. Tomado de Kondorosi y Kondorosi, 1986.**

Un aspecto interesante es que el proceso de simbiosis, desde el inicio de la infección, es específico; cada cepa de bacteria tiene un rango de hospedador (Young y Johnson, 1989). En este reconocimiento interviene un apasionante diálogo constituido por un lenguaje entendido sólo por el par bacteria-planta específico.

Este diálogo comprende el intercambio y reconocimiento de señales moleculares que producen cambios en el "comportamiento" de ambos organismos.

La planta controla la expresión de genes de nodulación bacterianos (genes nod) vía la secreción de compuestos fenólicos específicos (como flavonas, flavanonas, isoflavonas, etc.) (Kondorosi, 1991; Long, 1989) en la rizósfera, que son reconocidos también específicamente por la contraparte bacteriana, mientras que los rizobios responden secretando un lipooligosacárido específico que es reconocido sólo por su planta hospedadora (Dénarié y Roche, 1992; Nap y Bisseling, 1990).

Estos lipooligosacáridos son los denominados factores Nod (Fig.XIII) y son los responsables de promover los primeros pasos de la infección a la planta.

Además de los inductores, hay ciertos compuestos fenólicos liberados por las plantas que actúan como inhibidores de la nodulación, reprimiendo la transcripción de ciertos genes nod (Djorjevic *et al.*, 1987; Firmin *et al.*, 1986).

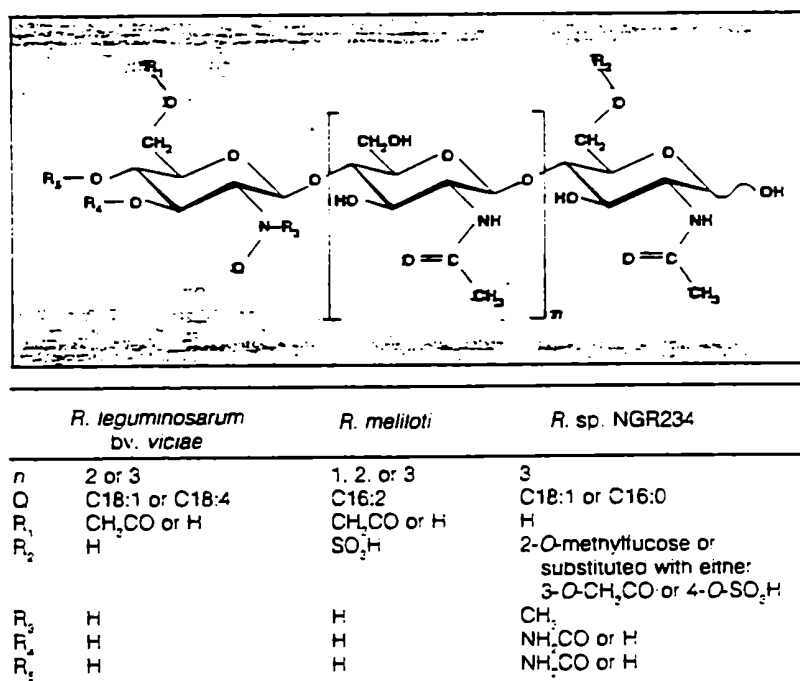


Fig.XIII: Estructura de los factores Nod mas estudiados. El oligosacárido de quitina y el resto acilo (Q), está presente en todos los factores Nod. En este caso se ejemplifican los factores Nod de 3 especies de *Rhizobium*. El número (*n*) de residuos de N-acetil-glucosamina puede variar. Q puede variar en largo y en el número de insaturaciones. Pueden ocurrir muchas sustituciones en el esqueleto del oligosacárido (*R*<sub>1</sub> a *R*<sub>5</sub>) (Spaink, 1992; Dénarié *et al.*, 1992), tomado de Vijn *et al.*, 1993.



### **-ESTRUCTURA DE LOS FACTORES Nod:**

Como podemos observar, cada especie de *Rhizobium* secreta un factor Nod con una estructura diferente en función de los substituyentes que presente (Fig XIII). Es interesante que las distintas especies han tomado una estructura de esqueleto común y con cambios sutiles, con pocos "adornos" o modificaciones, sean capaces de tener su lenguaje propio y específico.

Esto hace además que este lenguaje sea doblemente específico ya que las leguminosas a su vez también secretan compuestos fenólicos diferentes de especie a especie que son específicamente reconocidos por las bacterias e inducen la síntesis de éstos factores al activar los genes Nod. Por ejemplo, la alfalfa libera la flavona Luteolina que induce en *Rhizobium meliloti* la síntesis del factor Nod específico que se muestra en la Fig.XIII. La arveja libera la flavanona naringenina que induce en *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* la síntesis de otro factor Nod mostrado en la Fig.XIII.

Por último la cepa de *Rhizobium* sp.NGR 234, presenta un gran rango de hospedador ya que puede interactuar con mas de 70 géneros de leguminosas tropicales e incluso muy bien con *Parasponia andersonii*, que es la única no-leguminosa que puede formar nódulos y fijar nitrógeno con *Rhizobium* (Vijn *et al.*, 1993). *Rhizobium* sp.NGR 234 produce mas de 18 factores Nod diferentes, todos de estructura similar pero con diferentes substituyentes (Price *et al.*, 1992).

### **-GENES DE NODULACION (genes nod):**

Los genes nod para el caso de *Rhizobium meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* tienen localización en un megaplásmido denominado simbionte (pSym) (Fig. XIV). En *Rhizobium meliloti* SU47 se denomina pRmeSU47b (Finan, 1986), en *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* 8002 se denomina pRP2JI y tiene unos 190 Md (Lamb *et al.*, 1982) y en *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* 248 se denomina pRL1JI (Downie *et al.*, 1983).

Pero por otra parte en el caso de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 la localización de los genes nod es cromosomal (Fig.XIV).

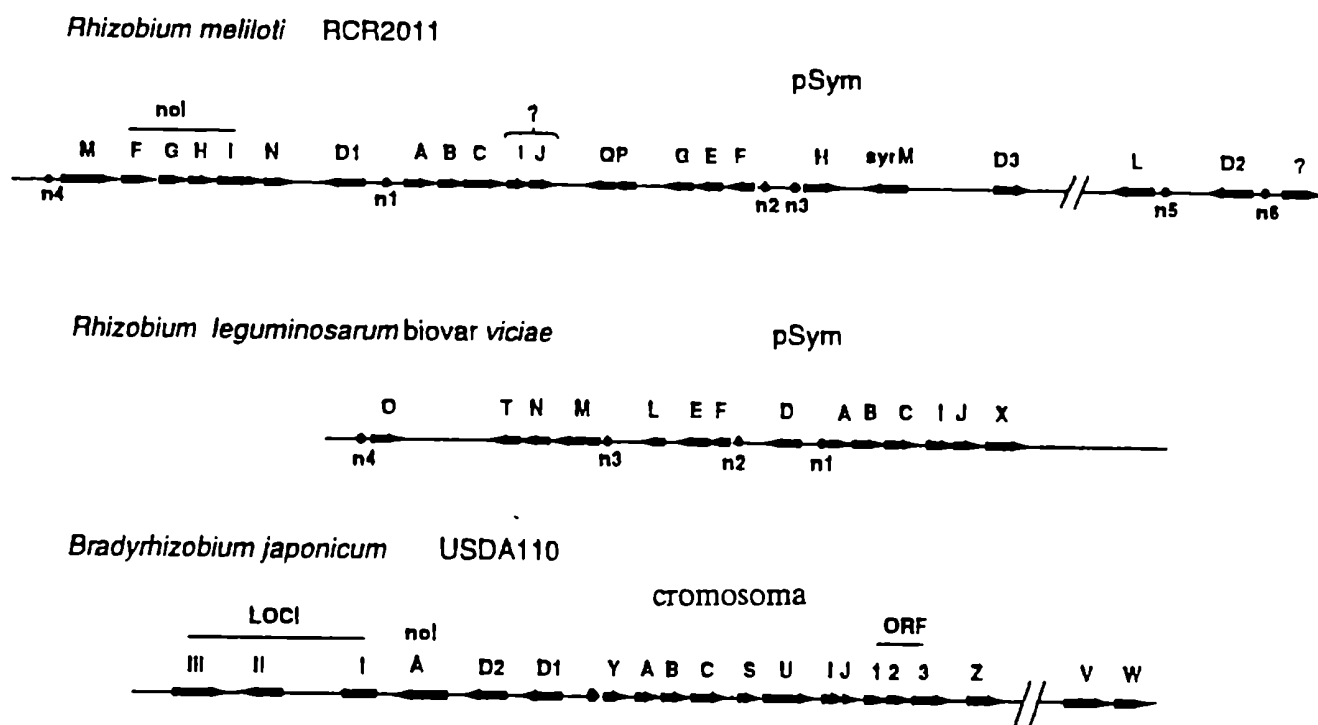
Algunos genes nod son comunes entre todos los *Rhizobium* mientras que otros son específicos. Su regulación es similar entre todos los géneros y especies (Dénarié y Roche, 1992; Fisher y Long, 1989; Kondorosi, 1991; Long, 1989).

La regulación en general presenta tres elementos fundamentales:

a) Una proteína codificada por el gen nod D, NodD, que es un regulador positivo activable.

b) La proteína Nod D activa se une a una región altamente conservada del promotor nod.

c) La activación de la transcripción de los genes nod requerirían la unión de la señal de la planta (compuestos flavonoides) a la proteína Nod D, ésta ahora estaría activada y se uniría al promotor o los promotores nod (Ver Fig. XIV) activando la transcripción.



**Fig.XIV: Organización de los genes nod en *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* y *Bradyrhizobium japonicum*. Las letras representan cada gen nod, las flechas la dirección de la transcripción y los círculos negros los sitios de unión de las proteínas Nod D al promotor (nod box).**

El gen regulador nod D se encuentra en todas las especies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* y es requerido para la nodulación (Long, 1989). Cada proteína Nod D reconoce específicamente a su activador, sin embargo, la unión del flavonoide a Nod D no ha sido aún bioquímicamente demostrada, los datos genéticos sugieren una interacción directa entre los dos elementos (Dénarié *et al.*, 1992).

Las proteínas Nod D son miembros de la familia de los activadores transcripcionales Lys R. La región amino terminal es la más homóloga a la proteína Lys R y contiene un zona de unión al DNA tipo "hélice-vuelta-hélice" (Henikoff *et al.*, 1988). En la mayoría de los rhizobios hay más de un gen nod D. Por ejemplo, en *Rhizobium meliloti* hay tres genes nod D y un gen syr M, que también pertenece a la familia de los activadores transcripcionales Lys R. La proteína Nod D1 es activada por compuestos flavonoides como luteolina y metoxi-chalcona (Peters *et al.*, 1986; Maxwell *et al.*, 1989) (Fig. XV). Por otra parte, Nod D2 es activada por metoxi-chalcona y por otros compuestos tipo betaínas como trigonelina y estaquidrina, que son muy abundantes en los exudados de algunas leguminosas (Phillips *et al.*, 1992) y Nod D3 está involucrado en la represión del regulón nod en presencia de un exceso de nitrógeno combinado (Dusha *et al.*, 1989) (Fig. XV).

Es interesante el hecho de que Syr M controla positivamente la expresión tanto de los genes *exo* (que codifican las enzimas necesarias para la síntesis del EPS succinoglicano, y que veremos más adelante) como de los genes *nod*, que codifican la síntesis de los factores Nod (Fig. XIV y XV).

Por último, Nod R actuaría regulando negativamente la expresión de los genes *nod*, como parte de una regulación fina de estos genes (Fig. XV).

Recientemente se ha demostrado que proteínas homólogas a las chaperonas moleculares, codificadas por el gen *gro EL* en *E. coli*, serían requeridas para la actividad normal de Nod D3 (Fisher y Long, 1992) (Fig. XV).

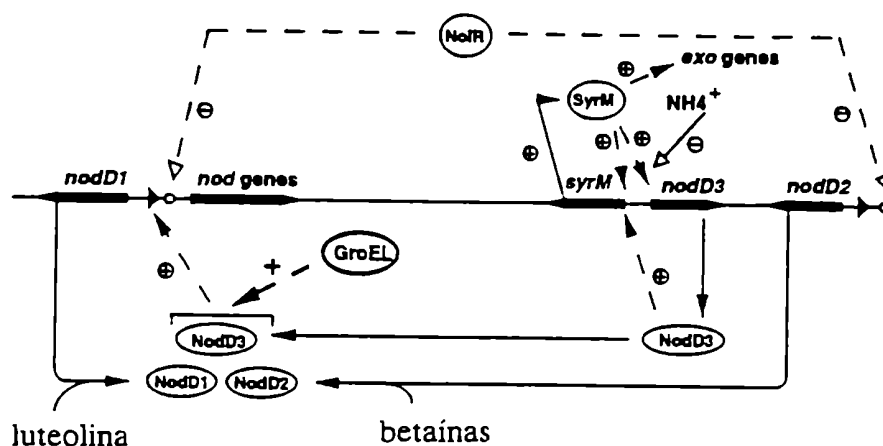


Fig. XV: Modelo de regulación de los genes *nod* en *Rhizobium meliloti* (Fisher y Long, 1992; Kondorosi *et al.*, 1991; Phillips *et al.*, 1992; Dénarié *et al.*, 1992).

El resto de los genes nod (genes estructurales) están involucrados en la síntesis del factor Nod. Estos genes estructurales se dividen en comunes y específicos.

Los comunes son los nod A, B y C que se encuentran en todos los géneros y son intercambiables (Goethals *et al.*, 1989; Martínez *et al.*, 1990).

Otros genes comunes son los nod J e I, presentes en *Rhizobium leguminosarum* y *Bradyrhizobium japonicum* (Evans y Downie, 1986; Göttfert *et al.*, 1990a) y posiblemente en *Rhizobium meliloti* y *Azorhizobium caulinodans* (Goethals *et al.*, 1989; Jacobs *et al.*, 1985). El gen nod C tiene homología con una quitina sintasa mientras que el gen nod I con una proteína que une ATP (Fig.XIV).

Otro grupo de genes nod es denominado "genes específicos de nodulación" y no son intercambiables. Estos genes codifican a las enzimas necesarias para la síntesis e introducción de los componentes específicos de los factores Nod. En *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* y *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae*, Nod E presenta homología con una  $\beta$ -cetoacil sintasa (Spaink *et al.*, 1989), nod F con una proteína transportadora de restos acilos (Shearman *et al.*, 1986), los genes nod L y nod M codificarían para una acetil transferasa y una D-glucosamina sintasa, respectivamente (Surin y Downie, 1988).

En *Rhizobium meliloti* Nod G tiene homología con una enzima alcohol dehidrogenasa (Debellé y Sharma, 1986; Horvath *et al.*, 1986), Nod P con una ATP-sulfurilas y Nod Q con una APS-quinasa (Cevantes *et al.*, 1989; Roche *et al.*, 1991; Schwedock y Long, 1989).

Los genes nod V y nod W codificarían a un regulador perteneciente a la familia de reguladores de dos componentes (Göttfert *et al.*, 1990b).

Todos estos resultados se obtuvieron por comparación de secuencias de DNA y se encontraron homologías muy significativas entre la mayoría de los productos de los genes nod y proteínas conocidas con funciones determinadas, sugiriendo funciones enzimáticas de síntesis y modificación específica de los diferentes factores Nod liberados por cada especie de bacteria.

## **-ORGANIZACION Y REGULACION DE LOS GENES REQUERIDOS PARA LA FIJACION DEL NITROGENO ATMOSFERICO (N<sub>2</sub>)**

Las nitrogenasas, los catalizadores biológicos que reducen el nitrógeno atmosférico a amoníaco, se encuentran distribuidas en una gran cantidad de eubacterias y arqueobacterias, pero no en eucariontes. Los microorganismos con capacidad de fijar nitrógeno se han distribuido en dos grupos, los que lo realizan en

forma de vida libre y los que lo realizan en forma simbiote con plantas (rhizobios y leguminosas). Las primeras investigaciones genéticas se dirigieron principalmente a la organización de los genes específicos de fijación de nitrógeno (genes *nif*) en *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, *Rhodobacter capsulatus* y *Enterobacter agglomerans*.

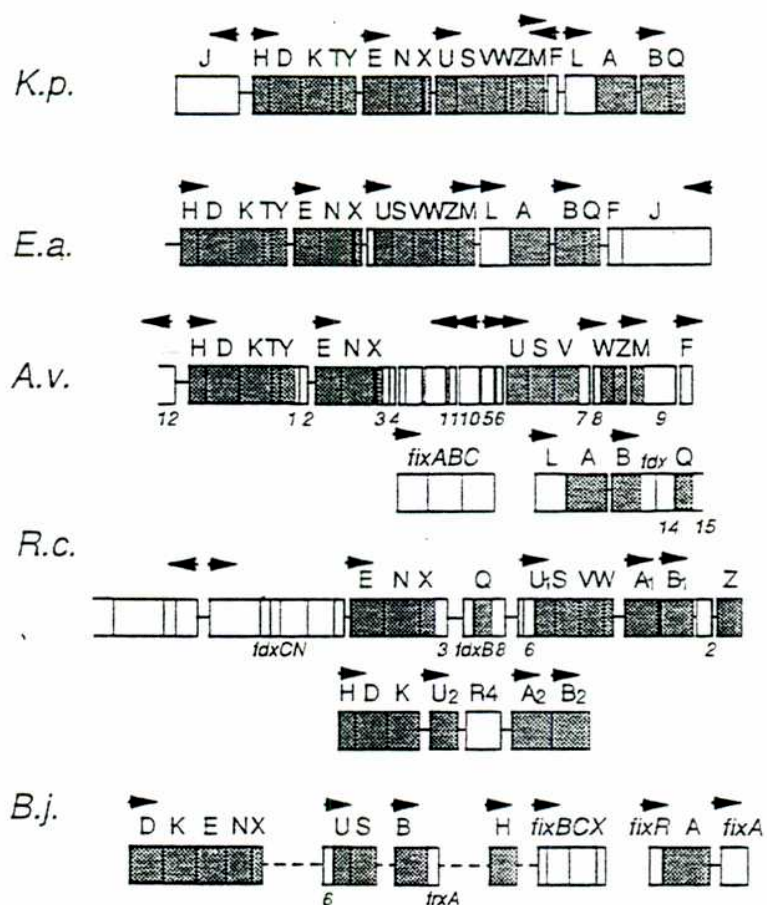


Fig.XVI: Organización de los genes *nif* y otros genes relacionados en *K. pneumoniae* (K.p.), *Enterobacter agglomerans* (E.a.), *Azotobacter vinelandii* (A.v.), *Rhodobacter capsulatus* (R.c.) y *Bradyrhizobium japonicum* (B.j.). Los cuadrados rellenos con letras arriba representan los distintos genes *nif* comunes entre las diferentes especies. Las flechas negras representan las secuencias consenso -24,-12 del origen de transcripción de cada uno de los genes *nif*, también representan el sentido de la transcripción. En el caso de R.j. también se representan los genes *fix* en cuadrados vacíos.

Estos estudios revelaron que existen más de 20 genes *nif* en una zona del cromosoma de *K. pneumoniae* de 25 Kb y que esta situación sería semejante en las restantes bacterias nombradas, que pertenecen al grupo de las fijadoras de vida libre (Dean y Jacobson, 1992; Kreutzer *et al.*, 1991). Sin embargo ha sido menos estudiado en el caso de los organismos simbiotes, como los rizobios, siendo el más estudiado *Bradyrhizobium japonicum* (Hennecke *et al.*, 1988). Un estudio comparativo de los organismos descritos más arriba sugiere que hay un grupo de 14 genes *nif* comunes, llamados *nif* H, D, K, E, N, X, V, S, Z, W, M, B, Q, que serían necesarios para la biosíntesis de la nitrogenasa (Fig. XVI).

En todos estos microorganismos, el control transcripcional de la expresión de los genes *nif* procede por un mecanismo común (Merrick, 1992). La secuencia consenso de los promotores de los genes *nif* se encuentra entre -24 y -12 del punto de iniciación de la transcripción y es CTGG-N8-TTGCA y es característica de los promotores que utilizan la forma menor de la RNA-polimerasa en donde el factor sigma utilizado es  $\sigma^{54}$  y no  $\sigma^{70}$ . Este factor sigma  $\sigma^{54}$  está codificado por el gen *rpo* N. La expresión de los genes dependientes de  $\sigma^{54}$  requiere la presencia de una proteína activadora de la transcripción codificada por el gen *nif* A, llamada Nif A, que se une a una región llamada UAS (del inglés: upstream activator sequence) localizada a 100 pb río arriba de la secuencia consenso de -24,-12 (Cannon *et al.*, 1990; 1991).

#### **-CONTROL DEL NITROGENO:**

En *K. pneumoniae*, el control del nitrógeno sobre la transcripción de los genes *nif*, está mediado por un sistema llamado "control general del nitrógeno" (*ntr*) en donde la cantidad de nitrógeno es detectada por una uridililtransferasa (codificada por el gen *gln* A) y transmitida vía una fosforilación (vía una proteína codificada por el gen *gln* B) a un sistema de dos componentes, Ntr BC.

Por ejemplo, en condiciones limitadas de nitrógeno, la proteína Ntr C fosforilada, activa el promotor del gen *nif* L dependiente de  $\sigma^{54}$  (Merrick, 1992). En los rizobios existe un sistema de dos componentes llamado Ntr XY con cierta homología a los Ntr BC (Pawlowski *et al.*, 1991).

#### **-CONTROL DEL OXIGENO:**

En los rizobios el nivel de oxígeno intracelular es el factor de modulación más importante del gen *nif* A. En *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Azorhizobium* el sistema de control del oxígeno es común y está formado por dos componentes, Fix L

y Fix J. Fix L es una proteína asociada a la membrana interna y unida al grupo Hemo que activa a Fix J por fosforilación en presencia limitada de oxígeno (estado simbiote) (Gilles-Gonzalez *et al.*, 1991) y también fosforila a una segunda proteína llamada Fix K, que se une al DNA. Sin embargo, las funciones de Fix J y Fix K no son las mismas en los diferentes rhizobios.

En *R. meliloti*, Fix J fosforilada activa al gen *nif A*, otros genes *nif*; a Fix K y otros genes *fix*, como *fix N*, *O*, *Q*, *P* y *fix G*, *H*, *I*, *S* (Merrick, 1993). Si embargo, en *B. japonicum*, la activación de los genes *nif* es independiente de Fix J y están regulados por la sensibilidad al oxígeno de la proteína Nif A que regula positivamente la expresión de los genes *fix R* y *nif A* (Merrick, 1993).

#### **-GENES INVOLUCRADOS EN LA SINTESIS DEL SUCCINOGLICANO:**

En *Rhizobium meliloti* SU47 (cepa silvestre) encontramos dos grupos de genes involucrados en la síntesis de exopolisacáridos (EPS), los que codifican para la síntesis de succinoglicano o EPS I (Long *et al.*, 1988; Reuber *et al.*, 1991) y los que codifican para la síntesis de otro exopolisacárido, el EPSb o EPS II (Glazebrook y Walker, 1989; Zhan *et al.*, 1989).

Los genes que codifican para la síntesis del succinoglicano se llaman *exo* y los del EPS II, *exp* ó *muc*. La gran mayoría se encuentran ubicados en un megaplásmido simbiote llamado pRmeSU47b (pSymb) (Finam, 1986).

Recientemente y cuando este trabajo ya estaba desarrollado, el grupo de Walker describió en forma muy detallada, combinando estudios genéticos y bioquímicos, la mayoría de los genes que codifican las enzimas requeridas para la síntesis de la unidad repetitiva. Los genes *exo Y* y *exo F* intervendrían en la adición del primer azúcar, galactosa. Los productos de los genes *exo A*, *exo L*, *exo M*, *exo U* y *exo W*, en la formación de la restante unidad repetitiva en forma secuencial (Fig.X) (Reuber y Walker, 1993; Glucksmann *et al.*, 1993a). El producto del gen *exo V* intervendría en la adición del resto cetal-piruvato. Pero el grupo de Walker no logró obtener polimerización *in vitro* y por lo tanto tuvo que referirse indirectamente por resultados *in vivo* a la función de los genes *exo P*, *exo Q* y *exo T*, como responsables del proceso de polimerización y/o transporte del polímero. Recientemente se ha sugerido que otros genes también estarían involucrados en la modificación, polimerización y transporte del succinoglicano, *exo N* y *exo K* (Glucksmann *et al.*, 1993b).

### **-REGULACION DE LA SINTESIS DE LOS EPS:**

El primer modelo descrito de regulación de la síntesis del EPS se realizó con la cepa *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli*. Este sistema está compuesto por tres genes que en su conjunto regulan la síntesis del EPS. Dos de estos genes, llamados psi y psr, se encuentran ubicados en el megaplásmido simbiote pRP2JI de 190 Md (Borthakur y Johnston, 1987), mientras que el tercero, el gen pss, está ubicado cromosómicamente (Borthakur *et al.*, 1986).

El gen psi (del inglés: polysaccharide inhibition) es un gen regulador negativo en la síntesis del EPS. En cepas que tienen clonado este gen en un plásmido multicopia, constitutivamente expresado, la síntesis de EPS es inhibida. Mutantes psi por el contrario son superproductoras del EPS (Borthakur y Johnston, 1987). El gen ha sido secuenciado y se observó que existen dos genes, psiA y psiB. El gen psiA, codificaría una proteína de membrana con masa molecular de 10.000 Da. Este gen está activo cuando la bacteria se encuentra en estado simbiote en el nódulo, inhibiendo la síntesis del EPS (EPS<sup>-</sup>), la función del gen psiB aún no se conoce (Borthakur y Johnston, 1987).

Por otro lado el gen psr (del inglés: polysaccharide restoration) se encuentra ubicado a 13 Kb del gen psi y su producto actuaría reprimiendo la transcripción del gen psi en trans (Borthakur y Johnston, 1987). Cuando la bacteria se encuentra en vida libre este gen está activado y promueve la síntesis del EPS (EPS<sup>+</sup>) (Borthakur y Johnston, 1987).

El tercer componente, el gen pss (del inglés: polisaccharide synthesis) es un gen regulatorio positivo en la síntesis del EPS y también se encuentra activo en condiciones de vida libre (Borthakur *et al.*, 1988). Este gen ha sido secuenciado y se observó que presenta en realidad dos genes pssA y pssB. El gen llamado pssA codificaría una proteína de 200 aminoácidos con una zona amino-terminal altamente hidrofóbica, sugiriendo una interacción con la membrana plasmática (Borthakur *et al.*, 1988).

Como el efecto inhibitorio del gen psi multicopia es reprimido por el gen pss también multicopia, se piensa que estas dos proteínas interactúan entre sí en la membrana y de esa manera se regularía el efecto inhibitorio del producto del gen psi (Borthakur *et al.*, 1988). Otro tipo de estudios, trabajando con fusiones de proteínas con el transposón TnPhoA, han reforzado el modelo propuesto (Latchford *et al.*, 1991)

En el caso de *Rhizobium meliloti* el producto del gen exo R es un regulador negativo en la síntesis del succinoglicano. Está ubicado cromosómicamente por lo



que no se encuentra ligado genéticamente con el plásmido pSymb (Doherty *et al.*, 1988).

Las mutantes exo R son insensibles a la inhibición de la síntesis del succinoglicano por  $\text{NH}_4^+$ , lo que indicaría que de alguna manera estaría involucrado en la respuesta al nitrógeno. Otro gen regulador es exo S, que regula positivamente la síntesis del succinoglicano (Doherty *et al.*, 1988).

Un sistema regulatorio (ya comentado) que se encuentra conservado en muchas especies de *Rhizobium* está mediado por los productos de los genes exo X (psi) y exo Y (pssA). Es un sistema de regulación postraducciona (Leigh y Coplin, 1992).

El gen exo X, codifica una proteína pequeña con un dominio hidrofóbico y otro hidrofílico, y el aumento de su producción (por multicopia constitutiva del gen exo X) inhibe la síntesis del succinoglicano. Los mutantes exo X, por consiguiente, son superproductores de succinoglicano (Reed *et al.*, 1991).

El efecto inhibitorio del gen exo X es contrarrestado por el producto del gen Y, el cual estimula la síntesis del EPS. Genes homólogos de exo Y han sido descritos en *Rhizobium* NGR 234 (Gray *et al.*, 1990), *Rhizobium meliloti* (Reed *et al.*, 1991), *Rhizobium leguminosarum* (Borthakur *et al.*, 1986; Borthakur *et al.*, 1988; Latchford *et al.*, 1991) y *Xanthomonas campestris* (Borthakur *et al.*, 1986; Reed *et al.*, 1991).

Se han propuesto dos modelos de regulación en el cual las proteínas Exo Y y Exo X interactúan.

En el primero, las dos proteínas interaccionan entre sí y cuando suficiente Exo X se pega a Exo Y, la actividad biosintética de la última se inhibe (Gray *et al.*, 1990).

En el segundo modelo, las dos proteínas interactúan biosintéticamente sin necesidad de que ocurra un complejo entre ellas. Exo Y podría funcionar en la iniciación de la síntesis del EPS facilitando la entrada de los primeros residuos de azúcar al lípido aceptor y Exo X podría competir con esta al facilitar la carga de azúcares a otro tipo de polisacárido (Reed *et al.*, 1991). No obstante este último modelo no es tan claro en el sentido de que Exo X no es requerido para la síntesis normal del LPS, EPSb o el glucano  $\beta(1-2)$  periplásmico (Gray *et al.*, 1991).

Como vimos anteriormente el mismo modelo de regulación se encuentra en *Rhizobium leguminosarum*, en donde el sistema pss-psi sería análogo al de exo Y y exo X. El gen psi está localizado en el plásmido simbionte pRP2JI de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* es semejante al gen exo X en tamaño, patrón de

hidrofobicidad, en secuencia central de DNA y en tener un sistema de control idéntico sobre la inhibición del EPS (Latchford *et al.*, 1991).

Paralelamente pssA es homólogo al gen *exo Y* y también contrabalancea el efecto del gen *psi* de manera postraduccional. Tanto *psiA* como *pssA* son proteínas asociadas a la membrana citoplasmática (Latchford *et al.*, 1991).

≈ O ≈

## II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Uno de los exopolisacáridos complejos mejor conocido desde el punto de vista de su estructura, biosíntesis y genética, es el xantano, producido por *Xanthomonas campestris*.

En nuestro laboratorio se ha realizado la mayor parte del estudio bioquímico de su biosíntesis mientras que la estructura ha sido estudiada por otros grupos de trabajo (Jansson *et al.*, 1975; Melton *et al.*, 1976). La estructura propuesta indica que puede considerarse como una celulosa sustituida, la cadena principal es la de un glucano  $\beta(1-4)$  con un trisacárido como cadena lateral, compuesto por manosa- $\beta(1-4)$ -ácido glucurónico- $\alpha(1-2)$ -manosa, unida ésta última alternadamente a una de las glucosas de la cadena principal en unión  $\alpha(1-3)$ . También presenta un grupo O-acetilo en posición 6 de la manosa interna y cada dos manosas externas se encuentra un grupo cetil-piruvato en posición 4 y 6 (Sandford *et al.*, 1977) (Fig.X, Introducción). Aunque posiblemente exista más de un resto acetilo en cada unidad repetitiva (Ielpi y Dankert, resultados no publicados).

Se han descrito varios genes involucrados en la biosíntesis del xantano; éstos se encuentran agrupados en una región dentro del DNA cromosomal de *Xanthomonas campestris* y gran parte de su estudio genético se ha realizado en otros grupos (Barrere *et al.*, 1986; Harding *et al.*, 1987; Harding *et al.*, 1993; Hötte *et al.*, 1990; Koplin *et al.*, 1992; Thorne *et al.*, 1987).

En nuestro laboratorio se emplearon células de *Xanthomonas campestris* permeabilizadas con EDTA y shock frío como preparado enzimático. Este sistema se incubó en presencia de los respectivos nucleótido-azúcares, UDP-GLC, UDPGlcA y GDP-Man, uno de ellos alternativamente radioactivo.

Se estudió transferencia de radioactividad a diferentes fracciones: lavados acuosos, extractos orgánicos (Solvente 1203), etc.

En esta fracción orgánica (Extracto 1203) los prenil-fosfo-azúcares son muy solubles y de esta manera fue posible estudiar la transferencia de radioactividad desde los correspondientes dadores de azúcar a compuestos intermediarios en la biosíntesis del xantano (prenil-difosfato-azúcares). La caracterización de estos compuestos permitió además el estudio secuencial de la síntesis de la unidad repetitiva sobre el lípido intermediario, por agregado u omisión de alguno de los dadores de azúcares (Ielpi *et al.*, 1981a, 1983, 1993).

Se pudo estudiar también la transferencia de radioactividad al sobrenadante de incubación. Se demostró que en incubaciones realizadas en presencia de los tres

dadores de azúcares (UDP-Glc, UDP-GlcA y GDP-Man) se formaba un compuesto de alto peso molecular marcado que fue caracterizado como xantano, indicando que se estaba sintetizando *in vitro* (Ielpi *et al.*, 1981b). También en este caso se pudo determinar la dirección de crecimiento, indicando que este polisacárido crece por su extremo reductor (Ielpi *et al.*, 1993).

Un esquema completo de la biosíntesis del xantano se muestra en la Fig.XI de la Introducción.

Los dadores fisiológicos de sustituyentes no glicosídicos como cetal-piruvatos y acetilos son PEP y acetyl-CoA, respectivamente. Se demostró en estos trabajos que tanto la entrada del resto cetal-piruvato como del resto acetato ocurre a nivel del estadio de prenil-difosfo-azúcar a partir de los correspondientes dadores (Ielpi *et al.*, 1981b; Ielpi *et al.*, 1983, respectivamente). También se demostró incorporación secuencial de los distintos azúcares a nivel de los lípidos intermediarios, para dar el polisacárido final, xantano (Ielpi *et al.*, 1981b; 1993) (Fig.XI, Introducción).

Hasta el momento de realizar este trabajo constituía el único caso de un EPS con el cual se había podido lograr su síntesis completa *in vitro* (Ielpi *et al.*, 1993).

Estudios *in vitro* sobre la biosíntesis de EPS en *Rhizobium meliloti* desarrollados por el grupo del Dr. Leloir habían logrado demostrar que, asociados a un compuesto lipofílico, se formaba un oligosacárido con la estructura de la unidad repetitiva propuesta para el succinoglicano (Tolmasky *et al.*, 1980, 1982). También demostraron que con preparados de *Agrobacterium tumefaciens*, que produce el mismo EPS, se podía obtener *in vitro* la unidad repetitiva asociada a un lípido, presumiblemente unido por un puente difosfato (Staneloni *et al.*, 1984).

Estudios realizados en nuestro laboratorio sobre biosíntesis *in vitro* de otro EPS, el producido por *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* NA-30 (J.C. Bossio, Tesis Doctoral; Bossio *et al.*, 1986), dieron idénticos resultados: la formación de la unidad repetitiva asociada a un compuesto lipídico.

Sin embargo en ninguno de estos casos se logró obtener síntesis de polímero *in vitro*.

Algo similar ocurrió al estudiar la síntesis del acetano, un EPS producido por *Acetobacter xylinum* hallado en nuestro laboratorio. Se describió detalladamente la síntesis secuencial de la unidad repetitiva (que tiene siete hexosas, ver Fig.X, Introducción) unida a un prenil alílico a través de un puente difosfato, pero no se logró su polimerización, es decir la producción del EPS final, a pesar de que resultados indirectos sugerían su función de intermediario (García *et al.*, 1974; Couso *et al.*, 1980, 1982, 1987).

La experiencia adquirida en estos estudios y especialmente la obtenida al estudiar el sistema de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NA-30 se ha tomado como punto de partida para realizar el estudio de la biosíntesis *in vitro* del EPS de otras tres cepas emparentadas: *Rhizobium leguminosarum* 8401, bv. *phaseoli* 8002 y bv. *viciae* 8401 pRL1JI.

Hasta el momento de iniciado este trabajo lo que se sabía de la biosíntesis de EPS en *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NA-30 era que utilizando UDP-Glc, UDP-GlcA, Acetil-CoA y fosfo-enol-piruvato (PEP) como precursores, tanto glicosídicos como no glicosídicos según el caso, alternativamente marcados en ( $^{14}\text{C}$ ), era posible sintetizar *in vitro* un octasacárido idéntico al de la unidad repetitiva propuesta, ligado a través de un puente difosfato, a un compuesto lipídico con las propiedades esperables de un poliprenol. Además se había podido sintetizar un trisacárido GlcA- $\rightarrow$ 4GlcA- $\rightarrow$ 4Glc unido de igual forma a un compuesto lipídico semejante al anteriormente nombrado; y que representaría los tres primeros azúcares que forman parte de la unidad repetitiva (Fig. X).

Se pusieron a punto también métodos de fraccionamiento (electroforesis, filtración por geles, cromatografías de intercambio iónico, etc.) que resultaron muy útiles en el presente trabajo.

Sin embargo y como ya se dijo no se observó la formación de polímero *in vitro*, es decir del EPS final, lo que no es sorprendente pues esta etapa aún no había sido descrita para ningún *Rhizobium* sp ni para *Agrobacterium* sp, bacteria cercanamente emparentada.

La idea principal de esta parte del trabajo fue entonces extender este estudio a las tres cepas arriba mencionadas relacionadas a la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NA-30, ver si los mecanismos de biosíntesis y sus intermediarios eran análogos a los ya descritos anteriormente (Bossio *et al.*, 1986) y tratar de obtener la síntesis secuencial de la unidad repetitiva.

Además y muy importante, estudiar, si fuera posible, la capacidad de polimerización *in vitro* de la unidad repetitiva previamente formada a partir de precursores radioactivos y de esta manera, demostrar realmente que los derivados lipídicos intervienen en forma directa en la síntesis del EPS en las cepas estudiadas.

Como ya se dijo más arriba *Rhizobium meliloti* sintetiza un exopolisacárido llamado succinoglicano o EPS I. Parte de su biosíntesis ha sido aclarada (Tolmasky *et al.*, 1980; 1982). En estos estudios, utilizando células tratadas con EDTA como preparado enzimático, se pudieron obtener algunos de los intermediarios

involucrados en la síntesis de la unidad repetitiva (octasacárido, Fig.X, 5, Introducción) a nivel de lípido-azúcar.

Hasta el momento de iniciar este trabajo no se había podido obtener síntesis del polímero (succinoglicano) *in vitro*. Esto generó entonces la posibilidad de extender el estudio de la biosíntesis del succinoglicano, utilizando la cepa de *Rhizobium meliloti* (Tabla I) con la cual ya otros investigadores habían trabajado (Tolmasky *et al.*, 1980, 1982). La idea fue entonces tratar de obtener nuevos sistemas enzimáticos capaces de tener actividad polimerizante.

Un problema similar se planteó en el caso del polisacárido acetano producido por *Acetobacter xylinum* (Fig.X, Introducción). En este caso se conoce con mucho detalle la síntesis de su unidad repetitiva (Fig.X, 4, Introducción) a nivel de lípido intermediario (Couso *et al.*, 1987), pero no se pudo tampoco obtener polimerización *in vitro* y formación del acetano. Por lo tanto se consideró interesante investigar en este modelo la posibilidad de obtener nuevos preparados o sistemas enzimáticos con capacidad polimerizante y de este modo, al igual que en las cepas de *Rhizobium leguminosarum*, poder demostrar de manera más directa la participación de los prenil-PP-azúcares en la biosíntesis de los EPS, como fuera anteriormente descrito para el caso del xantano de *Xanthomonas campestris*.

#### **-CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO:**

Además de la cepa NA-30 en este trabajo han sido utilizadas para el estudio de la biosíntesis de sus respectivos EPS *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* 8002, RW4, *Rhizobium leguminosarum* 8401 y *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* 8401 pRL1JI. Todas estas cepas y la cepa NA-30 parecen producir un EPS con la misma estructura (Tabla X) (Robertson *et al.*, 1981; Mc Neil *et al.*, 1986; Morris *et al.*, 1989).

*Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* 8002 es una cepa silvestre gentilmente cedida por el Dr. A.W.B. Johnston, John Innes Institute, Norwich, U.K. Posee el plásmido simbiote pRP2JI (de unos 190 Md) que le da capacidad para nodular (Nod<sup>+</sup>) y fijar nitrógeno (Fix<sup>+</sup>) en porotos (*Phaseolus vulgaris*). Además tiene capacidad para producir EPS (EPS<sup>+</sup>) y regular su síntesis a través de los genes pss y psi que se encuentran en el plásmido pRP2JI (Lamb *et al.*, 1982) (ver Introducción).

Por lo tanto la cepa 8002 es totalmente competente para nodular (Nod<sup>+</sup>), fijar nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) (Nod<sup>+</sup>) y sintetizar EPS (EPS<sup>+</sup>) en vida libre y reprimir la síntesis del mismo en vida simbiote (Borthakur *et al.*, 1985).

La cepa *R. leguminosarum* 8401, también gentilmente cedida por el Dr. A.W.B. Johnston, es en realidad la cepa 8002 curada del plásmido pRP2JI

(Borthakur *et al.*, 1985); por lo tanto, no puede nodular ni fijar nitrógeno en su hospedador específico original *Phaseolus vulgaris* (Nod<sup>-</sup>, Fix<sup>-</sup>), pero produce cantidades de EPS equivalentes a las producidas por la cepa silvestre (EPS<sup>+</sup>), (Fig.2, A y C).

La cepa *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* 248 es una cepa silvestre que sintetiza un exopolisacárido diferente al de la cepa mencionada (Fig.X) (Canter-Cremers *et al.*, 1991a) y tiene capacidad de nodular arvejas (*Vicia hirsuta*) (Nod<sup>+</sup>) y fijar nitrógeno (Fix<sup>+</sup>); esa capacidad se encuentra especificada en el plásmido simbionte pRL1JI (Borthakur *et al.*, 1987).

Este plásmido ha sido transferido por conjugación a la cepa *Rhizobium leguminosarum* 8401 (que como se comentó anteriormente carece de su plásmido simbionte, pRP2JI) por lo tanto ahora la nueva cepa formada se ha nombrado *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* 8401 pRL1JI (que es la que usamos en este trabajo y que también pertenece a la colección de cepas gentilmente cedidas por el Dr. A.W.B. Johnston) ya que posee capacidad de nodular (Nod<sup>+</sup>) y fijar nitrógeno (Fix<sup>+</sup>) en nódulos de su nuevo hospedador, *Vicia hirsuta*. Produce una colonia mucoide fenotípicamente idéntica a la cepa silvestre (EPS<sup>+</sup>) (Fig.2, D).

Además, es importante recalcar que si bien la cepa 8401 pRL1JI presenta un plásmido simbionte de la cepa *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* 248 (cepa silvestre) aún mantiene la capacidad de sintetizar su exopolisacárido original, con idéntica estructura a los de las cepas 8401 y 8002, comprobando que los genes que codifican para las transferasas involucradas en la biosíntesis del EPS están todos localizados cromosómicamente (Downie *et al.*, 1983).

Este no es el caso de *Rhizobium meliloti*, en donde la mayoría de los genes necesarios para la síntesis (genes *exo*) están en un plásmido simbionte, pSymb (Glazebrook *et al.*, 1990).

Con respecto a las dos cepas de *Rhizobium meliloti* utilizadas (Tabla I), sus características son las siguientes: La cepa Rm 1021, que es una cepa silvestre, produce succinoglicano o EPS I (EPS<sup>+</sup>) y en determinadas condiciones EPSb o EPS II (Fig.X, 6), tiene capacidad de nodular alfalfa (Nod<sup>+</sup>) y fijar nitrógeno (Fix<sup>+</sup>). La cepa Rm 7094 es una derivada no mucoide (EPS<sup>-</sup>) de la cepa silvestre Rm 1021, obtenida por mutagénesis con el transposón Tn5 (Leigh *et al.*, 1985). Fue caracterizada genéticamente como mutante *exoB*. Estas mutantes presentan un defecto pleiotrópico ya que producen glucanos  $\beta(1-2)$  normales pero no producen succinoglicano y producen un lipopolisacárido anormal (Glazebrook *et al.*, 1989; Leigh *et al.*, 1988; Zhan *et al.*, 1989). Las mutantes *exoB* no tienen UDP-galactosa 4

epimerasa, que transforma UDP-glucosa en UDP-galactosa, lo que significa que en este caso el primer nucleótido azúcar dador (UDPGal) en la biosíntesis del succinoglicano no está presente, no entra el primer azúcar, y el polisacárido no se sintetiza. El sistema de biosíntesis está detenido en el 1º paso (Ver Fig. 39, resultados).

Por último se utilizó *Acetobacter xylinum* cepa RC Gr1, derivada mucoide de la cepa silvestre NRRI B42 (Iñon de Iannino *et al.*, 1988). Se caracteriza por sintetizar un polisacárido complejo llamado acetano de estructura semejante al xantano (Fig.X, 3 y 4), descrito por primera vez en nuestro laboratorio (Iñon de Iannino *et al.*, 1988). Se caracteriza además por sintetizar grandes cantidades de celulosa que libera al medio (Hestrin y Schramm, 1954).

≈ O ≈



### III. MATERIALES Y METODOS

#### III.1. CEPAS BACTERIANAS EMPLEADAS:

Se encuentran indicadas en la Tabla I. La cepa *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* NA-30 (Robertsen *et al.*, 1981), fue utilizada en este laboratorio para estudiar la biosíntesis de su EPS (Bossio *et al.*, 1986). Es una cepa silvestre que produce grandes cantidades de EPS (Ver Fig.1 A, Resultados) y tiene capacidad de nodular trébol (*Trifolium repens* y *Trifolium pratense*).

La cepa *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* 8002, (Johnston *et al.*, 1982) también es una cepa silvestre que produce un EPS de estructura idéntica al de la cepa anterior (Fig.1 A y 2 A, Resultados), pero a diferencia de ésta, tiene capacidad para nodular poroto (*Phaseolus vulgaris*). Dicha capacidad se encuentra codificada en un megaplásmido (190 Kd), el pRP2JI, denominado plásmido simbiote. Este plásmido además le confiere capacidad para fijar nitrógeno en dichos nódulos. La cepa 8401 (Lamb *et al.*, 1982), es derivada de la cepa 8002 curada de su plásmido simbiote, por lo que no puede nodular, pero retiene la capacidad de producir EPS en cantidades semejantes a la cepa silvestre (EPS<sup>+</sup>). Es, además, resistente a la estreptomocina (Sm<sup>r</sup>).

La cepa *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* RW4 (Borthakur *et al.*, 1986), otra derivada de la cepa 8002, a la cual se la ha mutagenizado con el transposón Tn5, resultando ser EPS<sup>-</sup> y con resistencia a la Kanamicina, otorgada por el transposón. Sin embargo puede nodular porotos en baja frecuencia y fijar nitrógeno en dichos nódulos (Nod<sup>+</sup> y Fix<sup>+</sup>) (Borthakur *et al.*, 1986).

La última cepa de esta serie es *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* 8401 pRL1JI (Downie *et al.*, 1983), que es la cepa 8401 a la cual se le ha introducido el plásmido pRL1JI, plásmido simbiote de la cepa silvestre *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* 248, que nodula arveja (*Vicia hirsuta*) por lo cual ahora tiene capacidad de nodular arveja y fijar nitrógeno (Nod<sup>+</sup> y Fix<sup>+</sup>), y es EPS<sup>+</sup>.

La cepa de *Rhizobium meliloti* Rm 1021 (Leigh *et al.*, 1985), es una cepa silvestre, que produce un exopolisacárido llamado succinoglicano (EPS I) (Fig.1 B) y tiene capacidad para nodular y fijar nitrógeno (Nod<sup>+</sup> y Fix<sup>+</sup>) en alfalfa (*Medicago sativa*). La cepa Rm 7094 (Leigh *et al.*, 1988) es derivada de la anterior y se obtuvo por mutagénesis con Tn5 de la cepa R.m. 1021, lográndose una cepa EPS<sup>-</sup> que es Nod<sup>+</sup> y Fix<sup>-</sup>. Está caracterizada genéticamente como exo B-. El gen exo B codifica para la enzima UDP-Gal-4-epimerasa.

Por último la cepa de *Acetobacter xylinum* RC Gr1 se caracteriza por producir grandes cantidades de acetano que se libera al medio. En nuestro laboratorio se aisló a partir de la cepa original NRRL B42 (Iñon de Iannino *et al.*, 1988) y se caracteriza además por tener la capacidad de sintetizar celulosa y el exopolisacárido complejo denominado acetano (Couso *et al.*, 1980) (Fig.1, Resultados).

### III.2. MANTENIMIENTO DE LAS CELULAS:

Muestras procedentes de cada cepa, en las condiciones indicadas en la sección III.1., se sembraron en cultivos líquidos. Cuando éstos estuvieron en fase exponencial de crecimiento, se tomó en cada caso un volumen de 400  $\mu$ l y se agregaron a un tubo Eppendorf esterilizado que contenía 100  $\mu$ l de glicerol al 50% en agua (10% final). Se mezcló bien y se guardó en la heladera a 4°C durante una hora, luego se pasó a -20°C durante otra hora más y posteriormente se congelaron definitivamente a -70°C.

### III.3. ENSAYO DE NODULACION:

El método que describiremos a continuación nos permitió estudiar la capacidad simbiótica de cada cepa de *Rhizobium*, utilizando un medio de crecimiento de plántulas deficiente en nitrógeno. Además, se basa en un estricto control bacteriológico de las plantas que serán estudiadas ya que el único aporte de microorganismos presentes debe ser cuando se agregue la cepa de *Rhizobium* indicada.

Se utilizó un medio sólido deficiente en nitrógeno y con nutrientes (Jensen, 1942) y con agregado de oligoelementos (Gibson, 1963). En los casos de *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* NA-30 y *Rhizobium meliloti* Rm 1021 que nodulan trébol (*Trifolium repens*) y alfalfa (*Medicago sativa*) respectivamente, se utilizó un sistema de tubo cerrado con agar. Para esto, las semillas fueron esterilizadas como se describiera anteriormente (Handelsman *et al.*, 1984) es decir, fueron sumergidas en ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> cc.) helado en un frasco de Erlenmeyer parcialmente cubierto por hielo granizado. Luego de dos minutos, se separó el ácido y las semillas se lavaron repetidamente con agua bidestilada helada estéril (7 veces). Finalmente se transfirieron las semillas a frascos de Erlenmeyer de 200 ml con 50 ml de agua destilada estéril, se incubaron durante una noche a 200 rpm y 28°C, con dos cambios consecutivos de agua al inicio, cada 2 horas.

Las semillas germinadas (raíz de 0,5 cm) se pusieron en contacto con una suspensión de bacterias cosechadas en fase exponencial (D.O.: 0,6 a 600 nm) y

previamente lavadas con glicerol 5% en agua, por un periodo de 30 minutos. Luego las semillas germinadas se colocaron sobre el medio sólido de crecimiento contenido en tubos de vidrio de 25 x 2 cm (20 ml de medio por tubo). Se iluminó con luz de tubos "Growth-Lux" con ciclos de 14 horas de iluminación y 10 horas de oscuridad a temperatura ambiente (Fitotron). A partir de las dos semanas se observó presencia o no de nódulos en las raíces.

El medio utilizado, tanto sólido como líquido, fué el siguiente:

<u>Jensen (1942)</u>	
Ca H PO <sub>4</sub>	1,0 gr
K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	0,2 gr
Mg SO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,2 gr
Na Cl	0,2 gr
Fe Cl <sub>3</sub> *	0,1 gr
Agua	1,0 litro

\*Como fuente de hierro puede preferirse el citrato férrico.

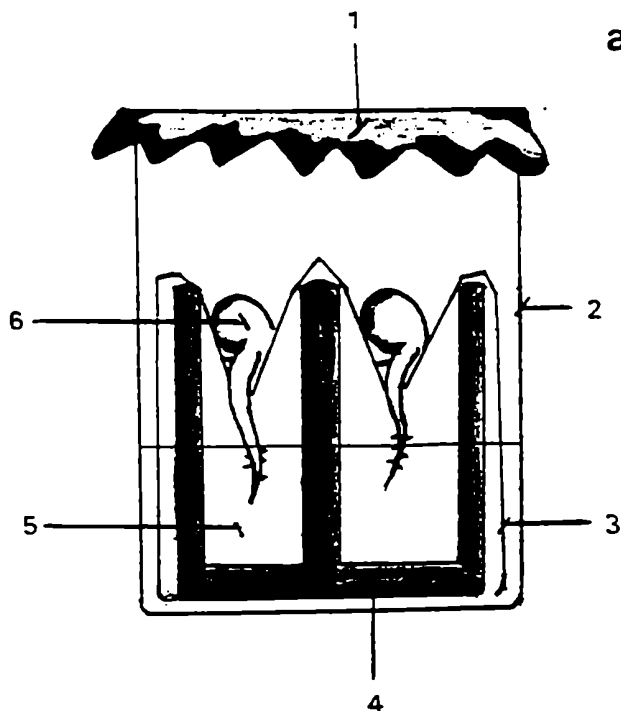
El agregado de oligoelementos (Gibson, 1963) se realiza a razón de 1 ml de una solución madre por litro de medio Jensen. La solución madre contiene las siguientes sales (gramos / 100 ml):

BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	0,05
Cl <sub>2</sub> Mn	0,05
SO <sub>4</sub> Zn	0,05
Cl <sub>2</sub> Co	0,05
SO <sub>4</sub> Cu	0,02

El pH se ajusta entre 6,5-7,0 y para el medio sólido se agrega agar en razón de 8 gr/litro, se esteriliza todo junto en autoclave. Es común la formación de un precipitado.

En el caso de ensayo de nodulación de porotos (*Phaseolus vulgaris*), con las cepas *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* 8002, 8004 y RW4 y de arvejas (*Vicia hirsuta*) con la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 8401 pRL1JI, se utilizó un dispositivo diferente, diseñado para el caso. Las semillas fueron esterilizadas de igual

manera que antes y luego se transfirieron a un vaso de precipitados de 1 litro que contenía un germinador, como se muestra en la Fig. a, previamente esterilizado en autoclave durante 20 minutos.



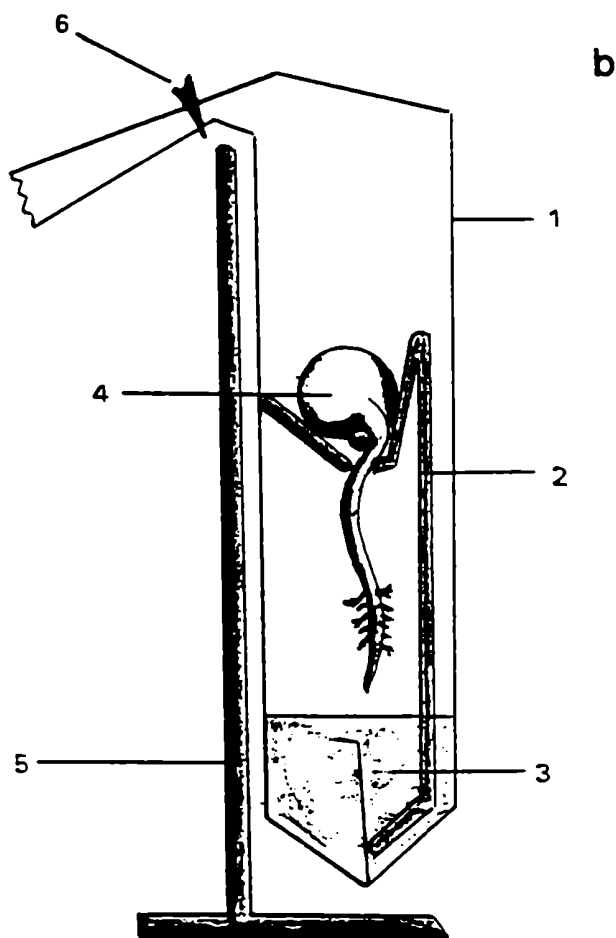
**Fig.a: Germinador: 1, papel de aluminio; 2, vaso de precipitado de 1 litro; 3, papel de filtro Whatman No 1; 4, soporte de vidrio; 5, agua; 6, semilla germinada.**

La razón de crear este procedimiento es que aquí las semillas al germinar no sufren la ruptura mecánica de su raíz primaria que sí se producía en el sistema anterior con agitación mecánica, debido a la gran relación entre la masa de la semilla y la masa de la raíz. Se dejaron en este dispositivo toda una noche en un cuarto a 28°C. Cuando la raíz tuvo un tamaño de aproximadamente 1,0 cm, se procedió a ponerla en contacto durante 30 minutos con una suspensión de bacterias (en el mismo medio de cultivo, resuspendidas en un volumen equivalente a un centésimo del volumen original) cosechadas en fase exponencial al igual que las cepas anteriores.

Por otra parte, un segundo dispositivo que se muestra en la Fig. b, que consta de una bolsa de polietileno de alta densidad y de un papel Whatman N° 3, se esteriliza en estufa a 120°C durante 30 minutos separando cada bolsa con papel de

diario. Luego se le agrega con una pipeta estéril, 40 ml de medio Jensen con oligoelementos (sin agar) dejando el papel Whatman completamente húmedo.

Finalmente se colocan las semillas de porotos o arvejas germinadas, inoculadas o no, en forma estéril y se cierra la bolsa con broches colocándolas colgadas de un soporte en un cuarto a temperatura ambiente iluminado de igual manera a lo descrito para el caso de las semillas de alfalfa (Fitotron). Una vez que el follaje ha crecido, se abre la parte superior de la bolsa y se deja crecer con agregados periódicos de agua estéril. Luego de dos semanas se comienza a examinar la presencia o no de nódulos.



**Fig.b: Nodulador: 1, bolsa de polietileno de alta densidad; 2, papel de filtro Wathman No 3; 3, medio Jensen líquido; 4, semilla germinada (inoculada); 5, pie o soporte; 6, broche.**

### III.4. MEDIOS DE CULTIVOS Y PREPARACION DE CELULAS:

Las condiciones de cultivo y los medios para cultivar las distintas cepas se describen a continuación:

Medio TY (Beringer, 1974), con agregado de 1% de manitol como fuente adicional de carbono (TYM), usado para el caso de todas las cepas de *Rhizobium leguminosarum*.

Medio LB (Luria-Bertani), usado para cultivar las cepas de *Rhizobium meliloti* y medio de Hestrin & Schramm, (1954), usado para *Acetobacter xylinum*. El medio sólido en cada caso se preparó con el agregado de agar (Bacto) en una concentración final de 1.5% (P/V).

Se realizaron controles de cada cepa por siembra en placas de Petri de las mismas con el agregado en cada caso de los respectivos antibióticos como medio selectivo.

La cepa de *Acetobacter xylinum* formadora de acetano, RC Gr1, derivada de la cepa NRRL B42 fue usada en este trabajo y en este caso en particular, se cultivó en forma estática en botellas de Roux (200 ml).

Para separar la celulosa de la zooglea, los cultivos de 48 hs se cosecharon y la celulosa se disgregó con un equipo Omni-mixer (Sorvall). Luego el homogeneizado se filtró a través de una tela para quesos como lo describieran Hestrin & Schramm (1954) para retener la celulosa. La suspensión de células filtrada fue centrifugada y el sobrenadante utilizado para aislar acetano por precipitación con dos volúmenes de etanol y 1 % final de KCl (peso/volumen). Con las restantes cepas las células fueron cultivadas en medio líquido con agitación (200 ml, 28°C, 200 rpm ) y se cosechó cuando el cultivo alcanzó fase exponencial tardía, (0,9 de absorbancia a 600 nm). En todos los casos los cultivos fueron centrifugados a 4°C y los sobrenadantes usados para obtener exopolisacáridos de manera análoga a lo descrito para el acetano. Los pellets celulares se usaron para obtener células tratadas con EDTA como se describiera anteriormente (García *et al.*, 1974) con ligeras modificaciones (Ver III.6.a) o para preparar células para ser electroporadas como se describe a continuación: las células se lavaron dos veces con glicerol 10% a 0°C y se resuspendieron en la misma solución en relación aproximada de 1/300 partes del volumen original de cultivo (ej: 200 ml se llevaron a 0.6 ml). La cantidad de proteína se cuantificó por el método de Lowry con estándar de albúmina de suero bovino.

### III.5. CELULAS AYUNADAS:

Se realizó sólo con células de *Acetobacter xylinum*. Se obtuvieron resuspendiendo el pellet celular con buffer fosfato 20 mM, pH:6,8 (1:1; 40 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; v/v) en un volúmen equivalente a la mitad del cultivo inicial. Luego se incubaron a 28°C con agitación (200 rpm) durante diferentes tiempos, hasta 90 minutos, se centrifugaron, se lavaron con agua deionizada tres veces y se resuspendieron en 1/300 partes del volúmen de cultivo original.

### III.6.a. PREPARACION DE CELULAS TRATADAS CON EDTA:

En el caso de la preparación de células tratadas con EDTA. Se utilizó el método descrito anteriormente (Robbins *et al.*, 1964) con algunas modificaciones que comentaremos. El precipitado de células luego de ser lavado 2 ó 3 veces con medio de cultivo fresco, se resuspendió en buffer 0,01M EDTA-Tris HCl pH 8,2 en una proporción aproximada de 2,5 ml de buffer por cada litro de medio de cultivo. Se homogeneizó con pipeta y se repitió la operación de lavado con este buffer 3 ó 4 veces más a 0°C. A este homogeneizado final se lo denominó "preparado enzimático fresco" y se lo utilizó el mismo día (sin congelar -20°C). Se vió que si a este preparado enzimático se lo congelaba y descongelaba en el día, se perdía actividad polimerisante, con lo cual solo se congeló una vez terminada la jornada de trabajo.

El material sobrante fue congelado a -20°C y se vió que mantenía una actividad de incorporación de radioactividad a extracto 1203 durante varios meses. Más aún, con la consecutivas congeladas y descongeladas y posteriores lavados con el mismo buffer, la actividad enzimática de algunos preparados aumentaba. No obstante, la actividad de polimerización *in vitro* que se observa con los "preparados enzimáticos frescos" de *Rhizobium leguminosarumm*, se pierde completamente luego de ser congelado a -20°C para ser guardados, (preparados enzimáticos viejos). Por otro lado, siempre que se utilizaron "preparados enzimáticos frescos" con las cepas de *Rhizobium meliloti* o *Acetobacter xylinum*, nunca se observó actividad polimerizante.

### III.6.b. INCUBACION ESTANDAR CON CELULAS TRATADAS CON EDTA.

Las incubaciones se realizaron en un medio que contenía 70 mM buffer Tris-HCl, pH 8,2 y 10 mM de MgCl<sub>2</sub> en presencia de diferentes nucleótido-azúcares. Dependiendo del caso se agregaron las siguientes cantidades (en nanomoles): UDP-Glc, 24; UDP-Gal, 24; UDP-GlcA, 24; GDP-Man, 30; TDP-Ram, 9,6. Como se indica en cada caso uno de los precursores fue reemplazado por las siguientes

cantidades (en pmoles) del nucleótido azúcar radioactivo respectivo: UDP[<sup>14</sup>C]Glc, 0,69 (10<sup>6</sup> cpm); UDP[<sup>14</sup>C]Gal, 0,69 (10<sup>6</sup> cpm); UDP[<sup>14</sup>C]GlcA, 0,41 (0,6x10<sup>6</sup> cpm); GDP[<sup>14</sup>C]Man, 0,42 (0,6x10<sup>6</sup> cpm) y TDP[<sup>14</sup>C]Ram, 0,41 (0,6x10<sup>6</sup> cpm). También se agregaron dadores de sustituyentes no glicosídicos como Acetil-CoA y Fosfo-enol-piruvato (PEP) en las concentraciones que se indican en cada caso en particular, como así también [<sup>14</sup>C]Acetil-CoA (2,7 pmol, 0,76x10<sup>6</sup> cpm). En todos los casos, el ensayo de incubación fue iniciado con el agregado de alrededor de 1 mg de proteína de preparado enzimático por tubo de incubación. El volumen final de cada incubación fue de 140  $\mu$ l. La mezcla se incubó en general a 10°C durante 1 hora, salvo que se indique lo contrario. Finalmente la reacción se detuvo con el agregado de un exceso de EDTA (10  $\mu$ l de EDTA 250 mM).

### III.6.c. ELECTROPORACION DE CELULAS Y CONDICIONES DE INCUBACION:

Para este tratamiento se utilizó un equipo de transfección Bio Rad Gene Pulser, provisto de un controlador de pulso de igual marca.

En una celda de electroporación de 0,4 cm de luz, se agregaron células frescas recién cosechadas (alrededor de 1 mg de proteínas), pudiendo ser ayunadas o no según el caso, y las cantidades (nmoles) de los diferentes nucleótido azúcares que se describen a continuación, dependiendo del caso: UDP-Glc, 24; UDP-Gal, 24; UDP-GlcA, 24; GDP-Man, 30 y TDP-Ram, 9,6. Como se indica en cada caso, uno de los precursores fue reemplazado por las siguientes cantidades (en pmoles) del respectivo nucleótido marcado: UDP[<sup>14</sup>C]Glc, 0,69 (10<sup>6</sup> cpm); UDP[<sup>14</sup>C]Gal, 0,69 (10<sup>6</sup> cpm); UDP[<sup>14</sup>C]GlcA, 0,41 (0,6x10<sup>6</sup> cpm); GDP[<sup>14</sup>C]Man, 0,42 (0,6x10<sup>6</sup> cpm) y TDP[<sup>14</sup>C]Ram, 0,41 (0,6x10<sup>6</sup> cpm). En cada caso el volumen final se llevó a 0,150 ml y se colocó a 0°C durante 5 minutos. La electroporación se realizó general a 1,5 kv, 400 ohms y 25  $\mu$ F (salvo que se indique lo contrario). Generalmente la constante de tiempo resultante se encontraba entre 5,0-8,4 milisegundos. La solución fue rápidamente transferida a los tubos de incubación (tubos Eppendorf) los cuales contenían Tris-HCl, pH: 8,2 y MgCl<sub>2</sub> para llegar a una concentración final de 70 y 10 mM respectivamente, en un volumen total de 0,200 ml. Las incubaciones fueron realizadas en los tiempos y temperaturas indicadas en cada caso.

### III.6.d. INCUBACIONES EN DOS ETAPAS:

En todos los casos, tanto al usar células tratadas con EDTA como células electroporadas como preparados enzimáticos, se procedió de la siguiente manera. La



primer incubación se llevó a cabo como se indica en cada caso (Sección III.6 b y III.6 c) pero en general (salvo que se indique) durante tan sólo 30 minutos y a 10°C. La reacción fue detenida por el agregado de EDTA (0,005 ml de EDTA-Tris, pH 8,0, 250 mM) y la suspensión de células se centrifugó dos minutos a 10.000 rpm en una centrífuga de mesada Eppendorf. El precipitado de células se lavó tres veces con buffer Tris-HCl, 70 mM, pH 8,2 y luego se resuspendió en agua (0,1 ml). Los lavados fueron combinados con el sobrenadante de incubación y guardados para posterior análisis (Fracción 1). La mitad de las células resuspendidas (0,05 ml) se guardaron para ser analizadas (primer precipitado celular) y la otra mitad se resuspendió en buffer Tris-HCl 70 mM, pH 8,2 y MgCl<sub>2</sub> en una concentración respectiva de 70 y 10 mM, en un volumen final de 0,100 ml. La segunda etapa de incubación se realizó sin agregado de nucleótido azúcares y durante 2 horas en general, a la temperatura indicada en cada caso. Luego se detuvo y se procedió de igual manera que en la primer etapa.

### **III.7. FRACCIONAMIENTO DE LOS PRODUCTOS DE INCORPORACION:**

Tanto para incubaciones utilizando células tratadas con EDTA como células electroporadas, se procedió de la siguiente manera. Para cada tubo de incubación de se obtuvieron como máximo 5 fracciones, que son 10 fracciones para el caso de las incubaciones en dos etapas. No en todos los casos fue así, en general se obtuvieron las dos o las tres primeras (4 ó 6 en el caso de incubaciones en dos etapas). Luego de detener la incubación con el agregado de EDTA, las células se centrifugaron y se lavaron tres veces con buffer 70 mM Tris-HCl. pH 8,2 (0,200 ml cada vez). Los lavados se combinaron conjuntamente con el sobrenadante de incubación y formaron lo que se llama Fracción 1. Esta fracción no sólo contiene el exceso de nucleótido azúcares que no reaccionaron durante la incubación, sino aquellos productos solubles en agua que se formaron y fueron liberados al medio durante el tiempo de incubación, como exopolisacárido (EPS). Esta fracción fue liberada del exceso de nucleótidos como se describe en la mayoría de los casos: se llevó a pH 2, se calentó a 100°C durante 10 minutos y luego se dializó contra 20 mM Tris-HCl en 4 litros durante 4 horas, a 4°C, con 2 cambios de agua deionizada fresca a lo largo de las 36-48 horas siguientes. El material dializado fue analizado por filtración en columna de geles (Bio-Gel A-5M) (Ver Sección III.13.c). En la segunda etapa, en el caso de incubación en dos etapas, esta fracción contiene productos solubles en agua liberados durante la segunda incubación. Esta fue analizado directamente por

filtrado en el mismo tipo de columna (Fracción 6, en el caso de tener 10 fracciones o Fracción 4, en el caso de 6).

Los precipitados de células lavadas, fueron extraídos tres veces (0,200 ml cada vez) con el solvente 1203 (cloroformo:metanol:agua; 1:2:0,3 v/v) (Behrens *et al.*, 1971) y a los extractos combinados se los llamó "Extracto 1203" (Fracciones 2 y 7, para el caso de 10 fracciones ó 2 y 5 para 6 fracciones). Estas fracciones contienen todos los lípido-azúcares formados durante la incubación (en el caso de 2 etapas, en la 1<sup>ª</sup> incubación) o los que han quedado sin reaccionar, en la segunda etapa. Esta fracción además puede contener parte de los glucanos formados que son también extraídos. Los precipitados de células extraídas con el solvente 1203 para el caso de 10 ó 6 fracciones, fueron lavados nuevamente tres veces con agua (0,2 ml cada vez) y los lavados combinados (lavados acuosos, Fracciones 3 y 8 para el caso de 10 fraccionamientos con 2 etapas y Fracciones 3 y 6 para el caso de tan sólo 6 fracciones). Estas fracciones contienen compuestos solubles en agua que se liberan luego de la disrupción de las membranas celulares producida por la extracción con el solvente 1203, como, por ejemplo glucanos periplásmicos. Los precipitados de células resultantes se resuspendieron en 1% de NaOH (0,1 ml) y se calentaron a 100°C durante 5 minutos, un clásico tratamiento alcalino, utilizado para aislar celulosa, como material insoluble (álcali insoluble), mientras que el resto de los componentes como por ejemplo otros polisacáridos, son solubles (álcali soluble) (Elbein *et al.*, 1966). Luego de centrifugar 5 min. a 10.000 rpm, se obtuvo un sobrenadante (Fracciones 4 y 9) (álcali soluble) y un precipitado celular (Fracciones 5 y 10) (alcali insoluble). Muestras de cada fracción fueron utilizadas para detectar presencia de radioactividad. Esta fue medida en solución de Bray (Bray, 1960), usando un contador  $\beta$  de ceteleo líquido 1214 Rackbeta Wallac.

### **III.8. OBTENCION DE POLISACARIDOS:**

#### **III.8.a. OBTENCION DE POLISACARIDOS SOLUBLES, PRESENTES EN EL MEDIO DE CULTIVO:**

Utilizando la técnica descripta anteriormente (Slonecker y Jeanes, 1962), se estudió la presencia de polisacáridos en los sobrenadantes de cultivo. Se aislaron y purificaron los polisacáridos a partir de sobrenadantes libres de células. Se obtuvo una fracción cruda de polisacáridos luego de una serie de precipitaciones (hasta 5) en metanol 66% en presencia de 1% p/v de KCl. El precipitado se redisolvió en agua bidestilada y se dializó contra agua bidestilada durante 48 horas a razón de un

cambio de agua cada 8 horas. Posteriormente se liofilizó la muestra y se pesó. No se detectaron proteínas presentes al medir por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Los glucanos producidos por las cepas de *Rhizobium* se encuentran en cierta cantidad en el medio de cultivo y son precipitables por esta misma técnica pero utilizando volúmenes de etanol que varían entre 4 y 10 según los autores (Amemura *et al.*, 1985; Zevenhuizen, 1981).

### III.8.b. OBTENCION DE GLUCANOS PERIPLASMICOS:

Las cepas del género *Rhizobium* y *Agrobacterium* sintetizan glucanos que se encuentran en el espacio periplásmico. Se utilizó la técnica anteriormente descrita (Zorreguieta *et al.*, 1985). Las células cultivadas hasta llegar a fase exponencial tardía se cosecharon, se lavaron 3 veces con buffer Tris-HCl 70 mM, pH 8,2 y se resuspendieron en TCA (ácido tricloro acético) al 1 %. Luego de 20 minutos a 0°C, las células resuspendidas se centrifugaron y el sobrenadante se neutralizó con NaOH 1 N.

Es importante que este procedimiento se realice rápido pues el TCA 1% tiene un pH muy bajo pudiéndose producir eventuales rupturas en las moléculas de glucanos, sobre todo en los glucanos grandes (de alta masa molecular) como los de *Acetobacter xylinum* (Masa molecular aproximadamente:  $5 \cdot 10^5$  dalton). Una vez obtenidos los glucanos se analizaron por cromatografía en columnas de geles y por hidrólisis parciales como se indica en Resultados.

### III.8.c. OBTENCION DE CELULOSA DE CULTIVOS DE ACETOBACTER XYLINUM:

Se procedió a utilizar la técnica descrita previamente por Hestrin y Schramm (1954). Las células de *Acetobacter xylinum* se caracterizan por sintetizar grandes cantidades de celulosa (Bacterio-celulosa) confiriéndole a los cultivos un sobrenadante gelatinoso, llamado zooglea. Esta zooglea está formada por las células que se encuentran creciendo entre las fibras de celulosa. Para separar las células de la celulosa hay que disgregar la zooglea. Para esto se utiliza un equipo Omni-mixer (Sorvall). Se sometió a la zooglea a 3 pulsos de ruptura de 1 minuto a máxima velocidad, con intervalos de 30 segundos. Se trabajó a 0°C todo el tiempo. Una vez obtenida la zooglea disgregada, se filtró a través de una tela para quesos. El filtrado fue utilizado para obtener polisacáridos solubles y células. Lo retenido es mayoritariamente celulosa. Para eliminar los posibles restos bacterianos, se repitió este procedimiento una vez más con el material retenido por la tela. Lo retenido,

nuevamente se cosechó, se lavó con agua y se liofilizó. La celulosa así obtenida se pesó y se calcularon las cantidades de celulosa sintetizada por mg de células húmedas.

### **III.9. METODO RAPIDO DE DETECCION DE PRESENCIA DE POLISACARIDOS RADIOACTIVOS EN LOS SOBRENADANTES DE INCUBACION: PRECIPITACION CON POLISACARIDO PORTADOR NO RADIOACTIVO**

Los sobrenadantes de incubación combinados con los lavados acuosos, de ensayos realizados en presencia de nucleótido-azúcares radioactivos, fueron centrifugados a 14.000 rpm en un tubo Eppendorf durante 5 min.

Se tomó con pipeta Pasteur el sobrenadante (600  $\mu$ l) y se agregó una solución concentrada de EPS (específico para cada caso) en un volumen tal (0.025 ml) como para llegar a una concentración final de 1  $\mu$ g/ml. Se agitó con Vortex, se llevó a 1% de CIK y se agregaron 2 volúmenes (1.250  $\mu$ l) de etanol 96%. Se agitó nuevamente con Vortex y posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min. Se obtuvo un precipitado (P1) y un sobrenadante (S1). Se repitió la operación 3 veces más redisolviendo el P1 y reprecipitando cada uno de los sobrenadantes. Se obtuvieron 4 sobrenadantes (conteniendo el total de los nucleótido-azúcares) y un precipitado final(P4). En caso de tener más de 200 cpm en el último sobrenadante, se repitió la operación hasta llegar a un mínimo de 200 cpm en esta fracción. El P4 contiene el EPS radioactivo que coprecipita con el polisacárido portador no radioactivo.

### **III.10. TRATAMIENTOS DEGRADATIVOS**

#### **III.10.a. HIDROLISIS ACIDA SUAVE DE LIPIDO-AZUCARES:**

Los "Extractos 1203" (600  $\mu$ l) se concentraron hasta casi sequedad (100 $\mu$ l) bajo corriente de nitrógeno. Luego se agregaron 400  $\mu$ l de ácido clorhídrico para llegar a una concentración final de 0,01 N (pH 2) ó 0,1 N (pH 1) según fuera el caso. Esta solución se calentó a 100°C durante 10 minutos. Luego de transcurrido este período, se extrajo el exceso de ácido bajo condiciones de presión reducida en un evaporador rotatorio, hasta llevar el material a sequedad total.

### **III.10.b. HIDROLISIS ACIDA PARCIAL O TOTAL DE OLIGO O POLISACARIDOS:**

Las muestras llevadas a seco se disolvieron en HCl 1 N y en HCl 0,5 N para el caso específico de glucanos. Los tubos se cerraron a la llama y se calentaron a 100°C durante el tiempo que se indica en cada caso. Se dejó enfriar y luego de abrir el tubo, el extracto acuoso se llevó a seco bajo presión reducida. Finalmente se redisolvió en agua y se procesó como se indica en cada caso.

### **III.10.c. DEACILACION DE OLIGOSACARIDOS**

Las muestras de oligosacáridos a deacilar se llevaron a 200  $\mu$ l y se les agregó NaOH de una solución concentrada (10 N) para llegar a una concentración final de 60 mM. La solución se dejó 20 minutos a temperatura ambiente, luego se pasó a través de una columnita preparada en una pipeta Pasteur de 0,5 cm de alto de resina Dowex 50x8 (H<sup>+</sup>). La columna se lavó 3 veces con 200  $\mu$ l de agua quedando en un volumen final de 800  $\mu$ l. El material se llevó a seco bajo presión reducida en evaporador rotatorio.

### **III.10.d. DEPIRUVILACION DE OLIGO O POLISACARIDOS:**

Los tubos que contenían las muestras de oligosacáridos o polisacáridos a depiruvilar se llevaron a una concentración de HCl de 0,01 N (pH 2) en un volumen final de 0,5 ml y se cerraron a la llama. Se calentaron a 100°C durante 90 minutos para el caso de oligosacáridos ó 180 minutos para polisacáridos. Se abrieron los tubos y los hidrolizados se llevaron a seco. Se continuó la caracterización luego de resuspenderlos en agua (200  $\mu$ l).

### **III.10.e. REDUCCION CON BOROHI DRURO DE SODIO (NaBH<sub>4</sub>):**

Se utilizó la técnica desarrollada previamente (García *et al.*, 1974). A la muestra disuelta en agua, se agregaron 5 mg de NaBH<sub>4</sub> y se dejó toda una noche a temperatura ambiente, luego se pasó a través de una columna de resina Dowex 50x8 (H<sup>+</sup>), armada en una pipeta Pasteur con una altura de 2 cm. Se repitió la operación última tantas veces como fuera necesario hasta bajar el pH a un valor de 3,5. En esta operación se destruye el exceso de NaBH<sub>4</sub> que no ha reaccionado y se retiene el catión Na<sup>+</sup>. Finalmente la solución se lleva a seco quedando un precipitado blanco que es el ácido bórico. Este es eliminado como borato de metilo con reiteradas resuspendidas y llevadas a seco en metanol.

### III.10.f. ENSAYO DE PERMETILACION:

Se realizó por el método de Hakomori (Hakomori, 1964), según lo describen Sandford y Conrad (Sanford & Conrad, 1972), con algunas modificaciones. "Un consejo pesonal es: antes de cualquier procedimiento fijese a la mañana al despertar que el día sea soleado y seco, de lo contrario programe otro tipo de experimento o vuelva a la cama".

#### REACTIVOS:

##### 1) Dimetil-sulfóxido (DMSO):

El DMSO (Merck) se agitó en presencia de  $H_2Ca$  a  $40^\circ C$  durante 30-36 hs y se destiló a presión de 20 mm de Hg aproximadamente. Se recibió el material destilado en un balón con  $CaH_2$  y trasvasó a un frasco cuya tapa se cubrió con "parafilm".

##### 2) Hidruro de Sodio (NaH):

Se utilizó NaH marca Sigma sin aceite mineral. Se conservó en desecador al vacío.

##### 3) Ioduro de metilo (IMe):

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

##### 4) Dimetil-sulfinilanión (DMSA):

Preparación del DMSA: Se preparó un baño de vaselina líquida entre  $65-68^\circ C$  con agitación magnética. Se sumergió en el baño la mitad inferior de un tubo de 250 ml de capacidad marca Kimax, con un tapón de goma perforado por un tubo de vidrio de 0,4 mm de espesor. Se hizo pasar una corriente de nitrógeno previamente desecado por una columna de vidrio de 1x40 cm que contenía material deshidratante (Molecular Sieve, Packard) y posterior burbujeo en un frasco lavador que contenía ácido sulfúrico cc. El dispositivo se dejó trabajando durante 2 hs. Luego se introdujeron 15 ml de DMSO en el tubo de 250 ml, una barrita magnética pequeña y 750 mg de NaH. Luego de 2 horas de reacción, la suspensión se centrifugó a temperatura ambiente. El sobrenadante se trasvasó a un tubo, se agregó una capa de vaselina líquida, se tapó con tapón de goma y se guardó a  $-20^\circ C$ . Este reactivo fue activo hasta 3 meses después de su preparación.

#### III.10.f.1. PERMETILACION DE MONO Y OLIGOSACARIDOS

La muestra se llevó a seco en un tubo de 13x100 mm y se dejó durante una noche al vacío en pistola secadora. Se colocó una columna secadora con "Molecular

Sieve" en la entrada de aire. Se agregó entonces por cada mg de muestra a permetilar 1 ml de DMSO (nunca menos de 0,2 ml). Se ultrasonicó en un equipo modelo Sonifier W140 con potencia intermedia, en tres períodos de 2 minutos con un minuto de intervalo entre períodos. En otro tubo con salida lateral, previamente conectado durante 15 min bajo corriente de nitrógeno seco, se introdujo el DMSO (1 ml) que contenía la muestra en suspensión y el DMSA (1 ml). Se dejó reaccionar a temperatura ambiente, con agitación magnética.

Luego de 2 horas, si el oligosacárido era neutro, o de 6 horas si era cargado negativamente, se agregó 1 volumen de yoduro de metilo y se continuó agitando durante 2 horas más. Para añadir este reactivo se sumergió una porción del tubo de reacción en baño de hielo-agua y el yoduro de metilo se agregó rápidamente en pequeñas alícuotas tratando de no interrumpir la agitación. La reacción se detuvo agregando 2 ml de agua, se agitó con Vortex y la solución se extrajo 3 veces con 2 ml de cloroformo. Las fases clorofórmicas (inferiores) reunidas se lavaron 3-4 veces con 6 ml de agua cada vez, se transfirieron a un tubo de 13x100 mm y se llevaron al mínimo de volumen bajo corriente de nitrógeno. El aspecto final del material es el de un jarabe de color verdoso (Material permetilado).

#### **-HIDROLISIS DEL MATERIAL PERMETILADO:**

Al tubo que contenía la muestra se le agregaron 0,4 ml de HCl 1 N y se homogeneizó con un pulso de ultrasonido. Luego de esto, la suspensión opaca se hidrolizó a 100°C durante 4 horas una vez cerrado el tubo a la llama. Pasado este período, se centrifugó 1 minuto a 10.000 rpm, se tomó el sobrenadante y se separó el exceso de ácido llevando a seco reiteradas veces bajo presión reducida. Por último, el producto se tomó con agua para un análisis posterior.

#### **III.10.f.2. PERMETILACION DE POLISACARIDOS**

Se realizó por el mismo método empleado anteriormente para oligosacáridos con las modificaciones que se aclaran a continuación:

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

### **-HIDROLISIS DEL MATERIAL PERMETILADO:**

El polisacárido permetilado se disolvió en ácido fórmico 90%. El tubo se cerró a la llama y se calentó a 100°C durante 1 hora. El ácido se eliminó llevando a seco varias veces en evaporador rotatorio. Al residuo final se agregaron 2 ml de ácido sulfúrico 0,25 M y se calentó a 100°C durante 16 hs en un tubo cerrado a la llama. El ácido se eliminó pasando la solución por una columna (7x0,5 cm) de resina Dowex (forma HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) controlándose el pH (5 ó 6). Si el polisacárido es ácido los restos urónicos quedan retenidos en la resina. En el caso de querer estudiar los derivados permetilados de los restos urónicos de la muestra, la misma fue permetilada en dos etapas, previa reducción intermedia, para transformarlos en derivados permetilados de glucosa, con lo cual no quedarían retenidos en la resina y resultando de fácil identificación por disponer de estándares adecuados (Ver III.10.f.3). Por último la muestra se concentró en evaporador rotatorio, el residuo se tomó con agua y se cromatografió en placa delgada.

### **III.10.f.3. PERMETILACION DE OLIGOSACARIDOS CONTENIENDO ACIDOS GLUCURONICOS RADIOACTIVOS:**

En el caso de tener que estudiar los derivados metilados de un oligosacárido con marca en [<sup>14</sup>C]GlcA, se procedió a hacer una permetilación en dos etapas con el objeto de transformar ese resto glucurónico en un derivado metilado de glucosa que es mucho más fácil de caracterizar cromatográficamente que los derivados metilados del ácido glucurónico. En el caso del glucurónico permetilado, en una sola etapa queda el carbonilo metilado en la posición 6, y su separación y análisis posterior es más dificultoso y ambiguo, por lo que luego de la primer etapa de metilación, el compuesto se reduce con NaBH<sub>4</sub>, reduciendo los metil ésteres formados y produciendo un oxhidrilo libre en 6. El glucurónico queda transformado en glucosa con el carbono 6 no permetilado. En la segunda etapa se permetila en la posición 6 y se analiza de igual manera que en los casos anteriores, pues los derivados dimetilados son mas difíciles de separar por TLC.

### **III.11.METODOS ANALITICOS:**

Los azúcares se dosaron por el método del fenol sulfúrico (Smith y Montgomery, 1956), usando glucosa como patrón.

La determinación de piruvatos se realizó por el método de la dinitrofenilhidracina (DNFH), (Sutherland, 1969) y de restos acetatos por el de la hidroxilamina, (Hestrin *et al.*, 1947).



La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), usando albúmina de suero bovino como patrón.

### **III.12. TRATAMIENTOS ENZIMATICOS:**

#### **III.12.a. TRATAMIENTO CON FOSFATASA ALCALINA:**

La muestra llevada a seco se resuspendió en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2. Se agregaron 2  $\mu$ l de una suspensión de enzima de *E. coli* (2,5 M en sulfato de amonio, Sigma) y se llevó a un volumen final de 0,1 ml. Se incubó durante 1 hora a 30°C. La reacción se detuvo con el agregado de 2 volúmenes de etanol y luego de centrifugar durante 5 minutos a 10.000 rpm, se analizó el sobrenadante como se indica en cada caso.

#### **III.12.b. TRATAMIENTO CON $\beta$ -GLUCURONIDASA DE INTESTINO DE CARACOL:**

La glusulasa de intestino de caracol (*Helix pomatia*) fue preparada en el laboratorio (De Stevens, 1955). Se utilizó en todos los casos la cantidad de 10  $\mu$ l de la preparación, con lo que se obtuvo muy buena actividad.

La reacción se realizó en buffer 0,1 M de acetato de sodio pH 4,5 en un volumen total de 0,1 ml. Se incubó durante toda una noche a 37°C en atmósfera de tolueno. La reacción se detuvo con el agregado de 2 volúmenes (0,2 ml) de etanol 96%, se centrifugó y se analizó el sobrenadante como se indica en cada caso.

#### **III.12.c. TRATAMIENTO CON $\alpha$ -AMILASA:**

Las incubaciones se llevaron a cabo en buffer Tris-HCl 100mM, pH 7,4, que contenía 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,22 unidades de enzima (2 mg/ml, 2.124 unidades/ml, gentilmente provista por la Dra. C. Krisman de este Instituto) y el sustrato a ser degradado, en un volumen total de 0,1 ml. La incubación se realizó durante 48 hs a 37°C en atmósfera de tolueno.

### **III.13. CROMATOGRAFIAS:**

#### **III.13.a. CROMATOGRAFIAS EN COLUMNAS DE DEAE-CELULOSA:**

Se utilizaron columnas de 1,5 x 54 cm, desarrolladas según se describiera anteriormente (Dankert *et al.*, 1966). Como solvente de elución se utilizó metanol 99%. Luego de sembrada la muestra se colectaron 100 ml y después se conectó un

gradiente (0 a 2 M) de acetato de amonio en metanol 99%. Se colectaron 500 ml en fracciones de 3 ml c/u, a temperatura ambiente y a un flujo de 20 ml/hora.

### III.13.b. CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX LH-20:

Los lípido-azúcares cromatografiados previamente a través de la columna de DEAE-celulosa, presentan altas concentraciones de sal (Acetato de amonio). Para desalarlos, se utilizó una técnica de filtración por geles en columna de Sephadex LH 20 (1,0 x 146 cm) equilibrada en metanol 99% como fuera descrito anteriormente (García *et al.*, 1974). Los lípido-azúcares se separaron de las sales por tamaño y quedan fraccionados en metanol 99% para un posterior análisis.

### III.13.c. FILTRACION EN COLUMNAS DE GELES:

Se utilizaron las siguientes columnas: Bio-Gel A5m (100-200 mesh de 1,2x35 cm, Bio-GelP2 (200-400 mesh) de 1x90 cm y Bio-Gel P4 (200-400 mesh) de 1,2x90 cm, equilibradas en buffer Acetato de piridina 0,1 M pH 5,0 (solvente C) a un flujo de 0,1 ml/min, colectando fracciones de 0,5 ml. Azul dextrano (Masa molecular  $\approx 2.10^6$  dalton) y  $\text{CoCl}_2$  fueron utilizados como marcadores de exclusión y de inclusión respectivamente.

Se incluyeron estándares no radioactivos de Estaquiosa (2  $\mu$ moles), Rafinosa (5  $\mu$ moles), Sacarosa (10  $\mu$ moles) y Glucosa (20  $\mu$ moles), los cuales fueron detectados en una alícuota de 100  $\mu$ l por el método del fenol-sulfúrico (Smith & Montgomery, 1956).

La medición de radioactividad fue realizada también en una alícuota de cada fracción y calculado el total de cpm por fracción.

### III.13.d. CROMATOGRAFIAS Y ELECTROFORESIS EN PAPEL:

Se utilizó el papel Whatman N<sup>o</sup>1 para este tipo de cromatografías y electroforesis como se describiera anteriormente (García *et al.*, 1974).

### -LOS SOLVENTES UTILIZADOS FUERON LOS SIGUIENTES:

A) Acetato de piridina 1,2 M pH 6,5 (García *et al.*, 1974).

B) Molibdato de sodio 0,1 M, con ácido sulfúrico hasta pH 5, medido en electrodo de vidrio (Bourne *et al.*, 1961).

D) Isopropanol/Acido acético/agua (27:4:9) V/V (Tung y Nordin, 1968).

E) Butanol/piridina/agua (6:4:3) V/V, (Jeanes *et al.*, 1951).

G) Nitrometano/ácido acético/etanol/agua saturada en ácido bórico (8:1:1:1) V/V (Robyt, 1975).

Las electroforesis se realizaron como se indica en García *et al.*, 1974, a voltaje constante (1.000 volts, 20 volts/cm) durante 160 minutos. Se utilizaron como estándares, Glc, AMP, UMP y GlcA no radioactivos.

Para detectar los azúcares reductores se utilizó el método de nitrato de plata alcalina (Trevelyan *et al.*, 1950). La ubicación de los nucleótido monofosfatos AMP y UMP se realizó por absorción de luz ultravioleta. Los compuestos con grupos fosfatos fueron ubicados con el reactivo de molibdato (Borrows *et al.*, 1952). Con los solventes D y E se utilizó una mezcla de maltooligosacáridos que se preparó como se describiera anteriormente (Behrens y Tábora, 1978).

### III.13.e. CROMATOGRAFÍAS EN PLACA DELGADA (TLC):

Se utilizaron placas de silicagel (Merck) "Kieselgel 60" de 5 x 20 cm, desarrolladas con los siguientes solventes:

F) n-Propanol/ Nitrometano/ agua (5:2:2) V/V, (Tolmasky *et al.*, 1982).

H) Benceno/ Acetona/ Amoníaco/ agua (50:200:1,35:1) V/V, (Chapman *et al.*, 1979).

Los estándares tri-O-metil derivados no radioactivos fueron preparados en nuestro laboratorio a partir de los disacáridos: celobiosa, nigerosa, genciobiosa, kojibiosa o soforosa.

Para la detección de los azúcares permetilados se vaporizó la placa de silicagel con una solución de ácido sulfúrico 5% en etanol y se calentó la placa entre 5 y 10 minutos a 140°C (Kornfeld *et al.*, 1979).

La radioactividad en electroforogramas y cromatogramas en papel se detectó con un radiocromatógrafo Packard modelo 7201. La radioactividad en placa de silicagel se detectó por autoradiografía usando películas X-Omat A-R (X-AR-5) Kodak. En algunos casos las autoradiografías fueron densitométricamente medidas con un equipo espectrofotométrico Gilford (Responce), leído a 550 nm.

Otra forma de medir la radioactividad en el papel fue utilizar un solución que contenía 4 gr de omnifluor (New England Nuclear) en un litro de tolueno, en un contador de centelleo 1214 Rackbeta Wallac. Luego de contar cada trozo de papel, éste se lavó tres veces con tolueno para eliminar el exceso de omnifluor y tres veces

con eter etílico para eliminar el exceso de tolueno y poder así eluir con agua las sustancias radioactivas medidas.

### III.14. COMPUESTOS QUIMICOS:

Se utilizaron los siguientes compuestos: UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Gal (200-300 Ci mol $^{-1}$ ; 7,4-11,4 TBq mol $^{-1}$ ), UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc (200-300 Ci mol $^{-1}$ ; 7,4-11,4 TBq mol $^{-1}$ ), UDP[ $^{14}\text{C}$ ]GlcA (200-300 Ci mol $^{-1}$ ; 7,4-11,4 TBq mol $^{-1}$ ), GDP[ $^{14}\text{C}$ ]Man (250-300 Ci mol $^{-1}$ ; 9,25-11,4 TBq mol $^{-1}$ ) y TDP[ $^{14}\text{C}$ ]Ram (200-300 Ci mol $^{-1}$ ; 7,4-11,4 TBq mol $^{-1}$ ), que fueron preparados como se describe previamente (Couso *et al.*,1982), por Susana Raffo y María de los Angeles Curto. La glucosa radioactiva y el [ $^{14}\text{C}$ ]acetil-CoA (55 Ci mol $^{-1}$ , 2,03 TBq mol $^{-1}$ ) fueron obtenidos de American Radiolabel Chemical Inc. (ARC) y la [ $^{14}\text{C}$ ]manosa de New England Nuclear. Todos los otros compuestos utilizados son productos comerciales.

Los oligosacáridos a, b y c usados como estándares, que corresponden a la unidad repetitiva (octasacárido) y sus respectivos derivados mono y dipiruvilado (de la cepa *R. l. bv. trifolii* NA-30) se obtuvieron en incubaciones *in vitro* usando UDP[ $^{14}\text{C}$ ]GlcA y UDPGlc como dadores de azúcares, luego de purificarlos del extracto 1203 por electroforesis en papel y filtraciones por Bio-Gel P2. De igual manera se obtuvieron los estándares X<sub>6</sub> (hexasacárido) y X<sub>7</sub> (heptasacárido) con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA, de la cepa *Acetobacter xylinum* (Couso *et al.*,1982).

≈ O ≈

## IV. RESULTADOS

### IV.1. ESTUDIOS REALIZADOS IN VIVO

Las cepas bacterianas utilizadas a lo largo de este trabajo se presentan en la Tabla I, en donde se encuentran indicadas las propiedades más relevantes y sus referencias. En la Figura 1 se muestran las estructuras propuestas para los EPS producidos por estas cepas.

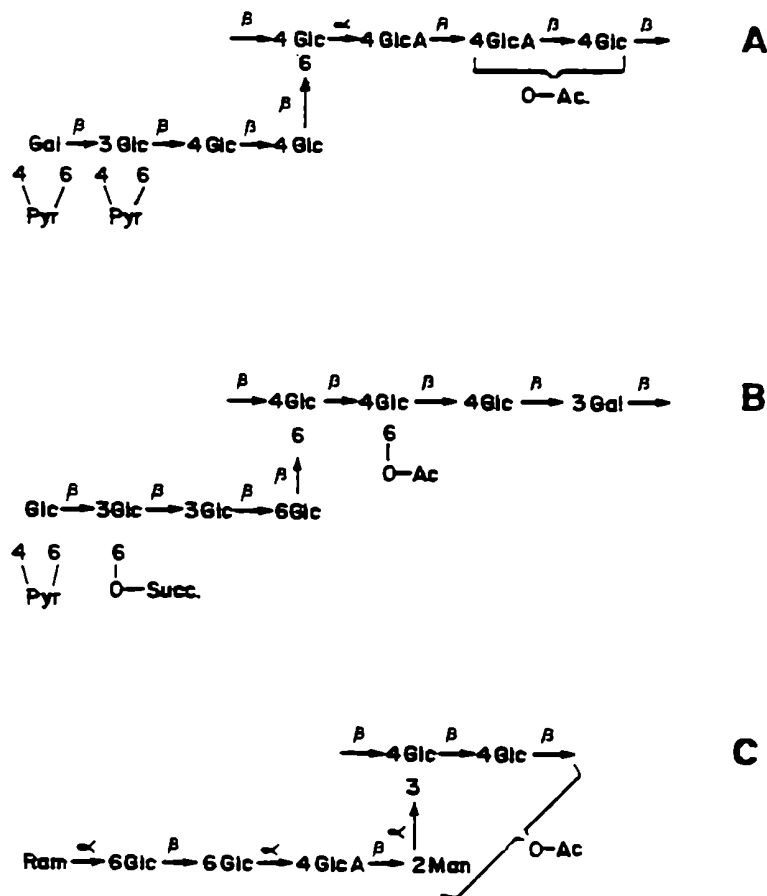


Fig.1: Estructuras descriptas de los diferentes exopolisacáridos producidos por las cepas utilizadas a lo largo de este trabajo.

A) EPS producido por *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NA-30, bv. *phaseoli* 8002, 8401 y bv. *viciae* 8401 pRL1JI, (Mc Neil *et al.*, 1986).

B) EPS I, Succinoglicano, producido por *Rhizobium meliloti* Rm 1021, (Aman *et al.*, 1981).

C) EPS, Acetano, producido por *Acetobacter xylinum* RC Gr1, (Couso *et al.*, 1987, Jansson *et al.*, 1993).

Las posiciones de los grupos O-acetilo de los EPS en A y C aún son indeterminados, salvo en el caso de las posiciones de los grupos O-acetilo y O-succinilo del succinoglicano de *Rhizobium meliloti* (Reinhold *et al.*, resultados no publicados).

Tabla I: Lista de cepas usadas a lo largo de este trabajo

Cepa	Propiedades mas relevantes	Referencias
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv.		
1) <i>phaseoli</i> 8002	Silvestre, EPS <sup>+</sup> .	Johnston <i>et al.</i> , (1982)
2) <i>phaseoli</i> 8401	Cepa 8002 curada de su plásmido simbiótico pRP2JI, además Sm <sup>r</sup> y EPS <sup>+</sup> .	Lamb <i>et al.</i> , (1982)
3) <i>phaseoli</i> RW4	Derivada de la cepa 8002, EPS <sup>-</sup> por mutagénesis con Tn5, Km <sup>r</sup> .	Borthakur <i>et al.</i> , (1986)
4) <i>viciae</i> 8401 pRL1JI	Cepa 8401 conteniendo el plásmido simbiótico de la cepa R. l. bv. <i>viciae</i> 248, EPS <sup>+</sup> , Sm <sup>r</sup>	Downie <i>et al.</i> , (1983)
5) <i>trifolii</i> NA-30	Silvestre, EPS <sup>+</sup> .	Robertsen <i>et al.</i> , (1981)
<i>Rhizobium meliloti</i>		
6) Rm 1021	Derivado Sm <sup>r</sup> de la cepa SU 47, EPS <sup>+</sup> .	Leigh <i>et al.</i> , (1985)
7) Rm 7094	Exo B <sup>-</sup> por mutagénesis con Tn5 de la cepa Rm 1021, Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , EPS <sup>-</sup> .	Leigh <i>et al.</i> , (1988)
<i>Acetobacter xylinum</i>		
8) RC Gr1	Derivado mucóide de la cepa silvestre NRRL B42.	Iñon de Iannino <i>et al.</i> , (1988)

#### IV.1.a. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LAS CEPAS UTILIZADAS A LO LARGO DE ESTE TRABAJO

Los primeros trabajos realizados con estas cepas consistieron en un estudio general de las condiciones y características de cultivo (descriptas en Materiales y Métodos). Los tiempos de duplicación para el caso de las cepas de *Rhizobium* se encuentran en el orden de 2 horas, como se describiera en la literatura para el caso de *Rhizobium* de crecimiento rápido.

No fue posible determinar el tiempo de duplicación de la cepa de *Acetobacter xylinum* silvestre porque al ser cultivada en botellas de Roux, se hace muy difícil medir el crecimiento de la zooglea.

Todos estos datos fueron tomados en función de las condiciones de cultivo presentadas en Materiales y Métodos.

Se analizaron las características fenotípicas presentadas en placas de Petri de algunas cepas como se puede observar en las fotos de la Fig. 2. La producción *in vivo* de polisacáridos es un carácter fenotípico muy visualizable, dándole un aspecto muy mucoide a la colonia como en el caso de la cepa silvestre *R.l.bv. phaseoli* 8002, *R.l.* 8401, *R.l.bv. viciae* 8401 pRL1JI y la cepa silvestre *Rhizobium meliloti* 1021 (Ver Fig.2, A (8002), C (8401), D (8401 pRL1JI) y E (Rm 1021); todas EPS<sup>+</sup>).

En el caso de los ejemplos de cepas mutantes en la producción de EPS, como en los casos de las cepas *R.l.bv. phaseoli* RW4 y *R. meliloti* 7094 (Fig.2, B (Rw4) y F (Rm 7094); ambas EPS<sup>-</sup>), podemos ver que las colonias en estos casos son muy pequeñas y secas a diferencia de su contraparte silvestre de los paneles A y E, respectivamente.

Nótese que la cepa 8401, que carece de su plásmido simbiote pRP2JI, presenta un fenotipo mucoide semejante al de la cepa silvestre 8002, al igual que la cepa 8401 pRL1JI que es la cepa 8401 con el plásmido simbiote pRL1JI de la cepa silvestre *Rhizobium leguminosarum bv. viciae* 248.

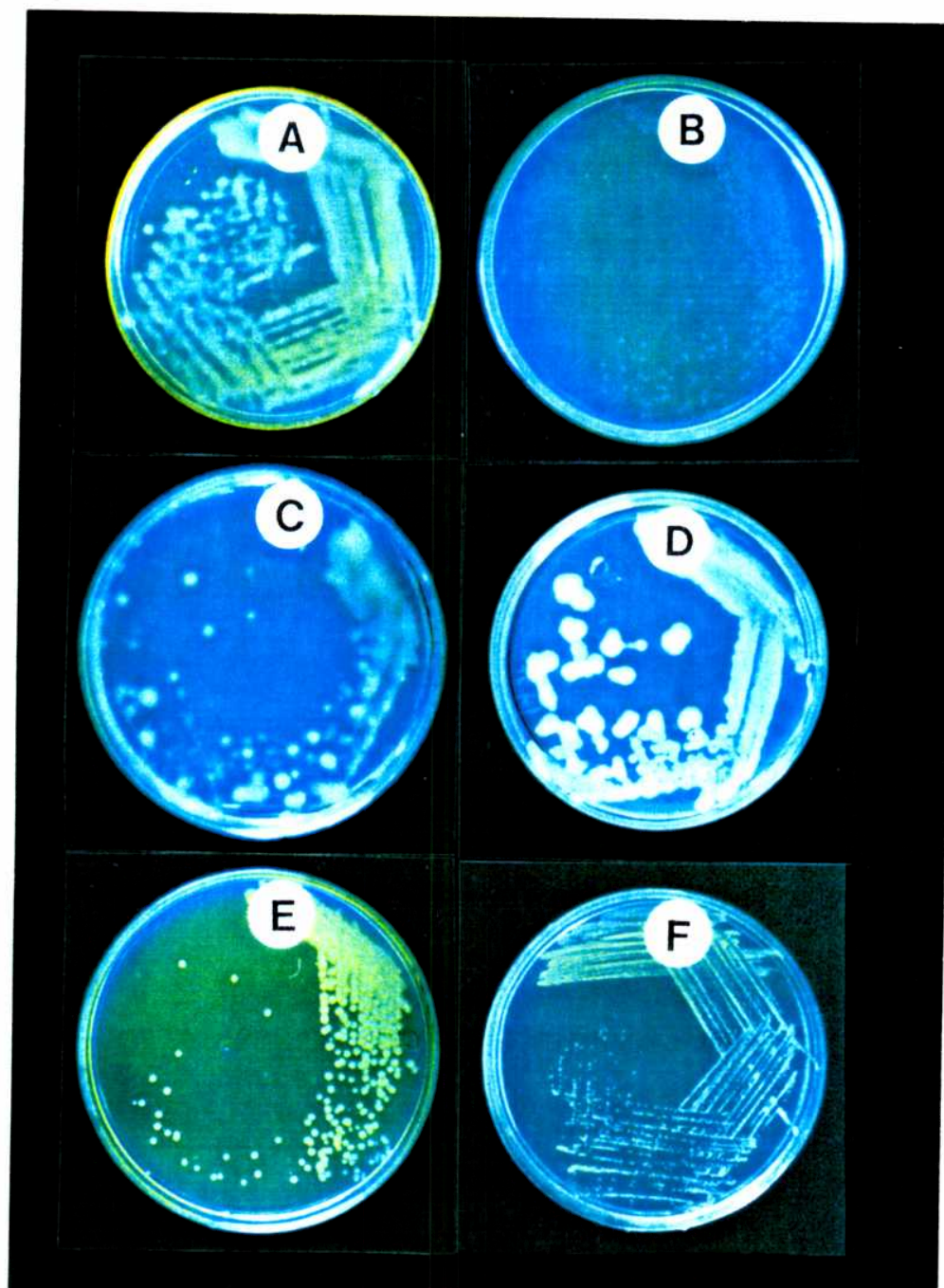


Fig.2: Características fenotípicas en placa de Petri de la mayoría de las cepas utilizadas a lo largo de este trabajo. A, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* 8002 (cepa silvestre, EPS<sup>+</sup>); B, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* RW4 (EPS<sup>-</sup>); C, *Rhizobium leguminosarum* 8401 (EPS<sup>+</sup>); D, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 8401 pRL1JI (EPS<sup>+</sup>); E, *Rhizobium meliloti* 1021 (cepa silvestre, EPS<sup>+</sup>); F y *Rhizobium meliloti* 7094 (EPS<sup>-</sup>).



#### IV.1.b. PRODUCCION DE EPS

Una vez que los cultivos de cada cepa se encontraron en fase exponencial, se cosecharon y se utilizaron los sobrenadantes para obtener, en cada caso, los EPS en solución (Ver Materiales y Métodos).

Con la cepa de *Acetobacter xylinum* RC-Gr1 se procedió de diferente manera ya que hubo que disgregar la zooglea para separar la celulosa formada durante el cultivo (Ver Materiales y Métodos) y luego al filtrado se lo cosechó y se utilizó entonces el sobrenadante para medir presencia de EPS.

Los resultados de la Tabla II muestran que la producción es variada según el caso, por ejemplo, las cepas de *Rhizobium leguminosarum* son muy buenas productoras de EPS. Por otra parte, las cepas de *Rhizobium meliloti* y *Acetobacter xylinum* presentan mucho menor producción, lo que se ve reflejado además en el aspecto de la colonia (por ejemplo, ver foto de la cepa silvestre en el panel E de la Fig. 2 y compararlo con la cepa silvestre del panel A).

Nótese además que la cepa *Rhizobium leguminosarum* 8401 que carece del plásmido simbionte pRP2JI (FIG. 2 - Panel C), tiene un fenotipo mucoso similar al de la cepa silvestre *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* 8002 que contiene el plásmido pRP2JI y puede nodular y fijar nitrógeno en dichos nódulos (Nod<sup>+</sup>, Fix<sup>+</sup>), (FIG. 2 - Panel A).

#### IV.1.c. COMPOSICION DE LOS EPS

Se estudió la composición de restos glicosídicos y la mayoría de los no glicosídicos de cada uno de los exopolisacáridos sintetizados por cada cepa.

Para esto, se tomó cada polisacárido liofilizado y se lo sometió a hidrólisis ácida total en tubos de vidrio como se describe en Materiales y Métodos.

Como se puede ver en la Tabla II, los restos glicosídicos que presenta cada polisacárido corresponden exactamente con los que se proponen en su unidad repetitiva respectiva representada en la Fig. 1.

En los casos de las cepas de *Rhizobium leguminosarum*, todas presentan la misma composición de restos glicosídicos, Glc, Gal y GlcA. En el caso de la cepa de *Rhizobium meliloti*, Glc y Gal; y por último en el caso de *Acetobacter xylinum*, Glc, GlcA, Man y Ram (Tabla II).

Además en la mayoría de los casos se detectó la presencia de ácido pirúvico proveniente del resto cetil-piruvato, también por revelado con plata alcalina (Ver Mat. y Met.), (Tabla II).

Tabla II

*Características generales de los EPS producidos por las diferentes cepas utilizadas.*

Cepa	Nombre	Producción (mg / mg P.H.C*)	Composición**							
			Restos glicosídicos				Restos no glicosídicos			
			Glc	Gal	Man	Ram	GlcA	Ptr.	Ac.	Succ.
8002	EPS	1.56								+
8401	EPS	1.94					+			
RW4										
8401 pRL1JI	EPS	2.10							+	+
NA-30	EPS	1.89					+		+ □	+ □
Rm 1021	Succinoglicano	0.023								
Rm 7094										
RC Gr1	Acetano	0.030								

\* Se midió la producción de mg de EPS liofilizado por mg de peso húmedo de células ( P.H.C.), en las condiciones de cultivo especificadas para cada cepa (Ver Materiales y Métodos).

\*\* En cada caso el EPS aislado de cada cepa, fue liofilizado y luego hidrolizado como se describe en Materiales y Métodos. Los productos de hidrólisis fueron caracterizados por electroforesis y cromatografías en papel y revelados con el reactivo de plata alcalina (Ver Materiales y Métodos). Para el caso de la determinación de restos acetatos se realizó con el polisacárido intacto por el método de la hidroxilamina, ( Hestrin et al., 1947).

□ En algunos casos que se encuentran indicados los datos fueron tomados de trabajos previos realizados por anteriores investigadores del Instituto.

Los restos de acetatos se determinaron por el método de la hidroxilamina (Hestrin, 1949); sólo en el caso de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* *bv.trifolii* NA-30 y *Rhizobium meliloti* Rm 1021, los datos fueron tomados de la literatura. La presencia de restos succinatos presentes en el succinoglicano de *Rhizobium meliloti* también se tomó de la literatura.

#### IV.1.d. PRESENCIA DE OTROS POLISACARIDOS

Se detectó síntesis *in vivo* de glucanos  $\beta$  (1-2) en todas las cepas de *Rhizobium leguminosarum* utilizadas en este trabajo, extrayendo las células con TCA al 1% y filtrando posteriormente en una columna de Bio Gel P4 (Ver Materiales y Métodos). La masa molecular aparente fue aproximadamente de 4.000 Da.

También se detectó la presencia de glucanos en la cepa de *Acetobacter xylinum* RC-Gr1, confirmando lo previamente descrito (García *et al.*, 1974). Su presencia y estructura ha sido descrita previamente en otros trabajos (Sandermann & Dekker, 1979; Amemura *et al.*, 1985). En este último caso se sabe que se sintetiza un glucano de un tamaño aproximado de 500.000 de masa molecular aparente. Esto se comprobó por extracción del glucano de igual manera que en el caso de las células de *Rhizobium leguminosarum* y filtrando por una columna de Bio-Gel A-5m (Ver Materiales y Métodos).

Además se midió la producción de celulosa sintetizada *in vivo* por *Acetobacter xylinum* RC-Gr1 luego de ser cosechada (Ver Materiales y Métodos). En este caso las cantidades de celulosa producida son aproximadamente alrededor de 0,4 mg/ mg de peso húmedo de células.

#### IV.1.e. ENSAYO DE NODULACION

Con el objeto de verificar la capacidad de nodulación de cada una de las cepas de *Rhizobium* utilizadas, se diseñó un ensayo que consistió en inocular cada hospedador con la biovariedad de *Rhizobium* respectiva como se muestra en la Tabla III. De esta manera podemos ver que luego de los 15 días de inoculación (Ver Materiales y Métodos) todas las cepas ensayadas presentan capacidad de nodulación con excepción de *Rhizobium leguminosarum* 8401 que carece de su plásmido simbiote y no puede nodular.

Tabla III : *Ensayo de nodulación*

Realizado con las diferentes cepas de *Rhizobium* utilizadas a la largo de este trabajo, con el objeto de verificar su pureza al analizar la capacidad nodulación a su hospedador específico.

Cepa	Hospedador	Nódulos por planta*
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
bv. <i>phaseoli</i> 8002	Poroto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	6-9
bv. <i>phaseoli</i> RW4		1-2
8401		0
bv. <i>viciae</i> 8401 pRL1JI	Arveja ( <i>Vicia hirsuta</i> )	10-12
bv. <i>trifolii</i> NA-30	Trébol ( <i>Trifolium repens</i> )	4-7
<i>Rhizobium meliloti</i> Rm 1021	Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )	6-8
<i>Rhizobium meliloti</i> Rm 7094		N.D.

\* Los ensayos de nodulación se realizaron como se especifica en Materiales y Métodos, con las aclaraciones de cada caso. Luego de dos semanas de inoculación se investigó la presencia o no de nódulos en las raíces de cada planta. En el caso de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* 8002, RW4 y *viciae* 8401 pRL1JI, se aislaron las bacterias de los nódulos como se describe en el "Manual de Rhizobiología" de Vincent. ( Vincent, 1970) y se continuó la caracterización y posterior estudio.

N.D. : No determinado.

## IV.2. ESTUDIOS DE BIOSINTESIS DE EPS IN VITRO

### IV.2.a. UTILIZACION DE CEPAS DE *Rhizobium leguminosarum*

#### IV.2.a.1. INTRODUCCION

Este estudio de biosíntesis de EPS corresponde a la primera parte de los trabajos realizados en incubaciones *in vitro* utilizando preparados enzimáticos obtenidos tanto con células tratadas con EDTA (Sección IV.2.a.2) como con células electroporadas (IV.2.a.3) (Ver Materiales y Métodos) de las cepas de *Rhizobium* que se enumeran a continuación.

*Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* NA-30 (Se utilizó en la Sección IV.2.a.2. y IV.2.a.3.)

*bv. phaseoli* 8002 (Se utilizó en la Sección IV.2.a.2. y IV.2.a.3.)

8401 (Se utilizó sólo en la sección IV.2.a.2.)

*bv. phaseoli* RW 4 (Se utilizó sólo en la Sección IV.2.a.3.)

*bv. viciae* 8401 pRL1JI (Se utilizó en la sección VI.2.a.2.)

#### IV.2.a.2. UTILIZACION DE CELULAS TRATADAS CON EDTA

##### IV.2.a.2.i. ESTUDIOS DE INCORPORACION DE RADIOACTIVIDAD A DIFERENTES FRACCIONES

Considerando la estructura de la unidad repetitiva propuesta para estas cepas (Fig. 1), los restos glicosídicos componentes son Gal, Glc y GlcA, por lo que se trabajó haciendo incubaciones en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]GlcA primero y UDP[<sup>14</sup>C]Glc luego, tanto en presencia como en ausencia del otro nucleótido no radioactivo como precursor (Ver Tabla IV). Las incubaciones se realizaron en todos los casos a 10°C a no ser que se especifique algo diferente. Los preparados enzimáticos suelen tener actividad de UDPGal-4-epimerasa, lo que hace innecesario el agregado de UDPGal como precursor tanto radioactivo como no radioactivo, pues se forma durante la incubación a partir de UDPGlc.

Tabla IV

*Incorporación de radioactividad a diferentes fracciones a partir de UDP[<sup>14</sup>C]GlcA y de UDP[<sup>14</sup>C]Glc.*

Como preparados enzimáticos se utilizaron células tratadas con EDTA como se describe en Materiales y Métodos.

Cepa	Dador de azúcar		Incorporación de radioactividad (cpm / mg de proteínas)		
	Radioact.	No radioact.	Fracc.1 (EPS)	Fracc.2 (Extr. 1203)	Fracc.3 (Precipitado de células)
<i>R. l. bv. phaseol</i>					
1) 8002	UDPGlcA		780	2.354	130
		UDPGlc	3.200	30.672	800
	UDPGlc		1.300	21.140	560
		UDPGlcA	5.400	34.680	1.180
<i>R. l.</i>					
2) 8401	UDPGlcA		240	1.700	430
		UDPGlc	3.850	41.400	1.470
	UDPGlc	UDPGlcA	2.150	54.300	1.600
<i>R. l. bv. vicine</i>					
3) 8401 pRL1JI	UDPGlcA		740	9.936	180
		UDPGlc	6.400	57.996	1.890
	UDPGlc		2.300	37.870	2.300
		UDPGlcA	3.180	42.484	2.480
<i>R. l. bv. trifolii</i>					
4) NA-30	UDPGlcA		340	2.600	240
		UDPGlc	2.500	36.300	830

Se estudió la transferencia de radioactividad de los precursores nombrados a tres fracciones (Ver Materiales y Métodos): Fracción 1 o sobrenadante de incubación fraccionado, Fracción 2 o "Extracto 1203" y Fracción 3 o precipitado de células extraídas.

El EPS que se muestra en la Tabla IV, corresponde al material de la Fracción 1 que se excluye de una columna de Bio-Gel A-5 m (mayor que  $5 \cdot 10^6$  de P.M.). Estos compuestos se formaron durante las incubaciones y corresponden al respectivo exopolisacárido sintetizado *in vitro* durante la reacción. Como se destacó en "Antecedentes y Objetivos" este era el fin principal de esta parte del trabajo. Debe destacarse que con todas las cepas utilizadas se observó formación de polímero (Tabla IV). De cada uno de ellos nos ocuparemos en mayor detalle más adelante (sección, IV.2.a.2.v. "Formación de polímero *in vitro*").

En todos los casos, también hubo incorporación de radioactividad a la Fracción 2 o "Extracto 1203". Este solvente 1203 ha demostrado ser muy efectivo en la extracción de intermediarios lipídicos que contengan varios azúcares y cargas negativas (Couso *et al.*, 1980). En este extracto se encuentran los potenciales prenil-fosfoazúcares intermediarios en la biosíntesis de los EPS, que se analizarán en la siguiente sección.

Como se puede observar en la Tabla IV, hubo muy buena incorporación a las fracciones 1 y 2 en incubaciones realizadas tanto en presencia de UDP[ $^{14}\text{C}$ ]GlcA como de UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc, en todas las cepas utilizadas.

Por otro lado la incorporación de radioactividad a ambas fracciones fue incrementada en presencia del otro dador no radioactivo. Este efecto de estimulación se observó en todas las cepas utilizadas.

Cada preparado enzimático en particular presentó una cierta cantidad de aceptores lipídicos y nucleótido-azúcares dadores endógenos que variaban en cantidad de preparación en preparación, por lo que es importante aclarar que las incorporaciones obtenidas en cada fracción también variaban de ensayo a ensayo. Por lo tanto, los valores de incorporación de radioactividad a diferentes fracciones que se presentan en la Tabla IV, serían un ejemplo de los valores medios obtenidos en general con cada sistema.

Se puede ver también en estos resultados que los valores de incorporación de radioactividad a cada fracción, y según cada cepa, se correlacionan en cierta medida con los niveles del EPS sintetizados *in vivo* (Ver sección ensayos *in vivo*, Tabla II).

Por último, la radioactividad proveniente tanto de UDP[ $^{14}\text{C}$ ]GlcA como de UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc y asociada a la fracción 3 (precipitados finales extraídos) no se pudo

solubilizar con subsiguientes lavados acuosos. Luego de un tratamiento alcalino suave (1% en Na OH, 5 min, 100°C) toda la radioactividad se transfirió a la fracción álcali soluble (Ver Materiales y Métodos).

Con este resultado se podría descartar la posibilidad de que se hubiera sintetizado celulosa durante la incubación a partir de UDP[<sup>14</sup>C]Glc. Este material así extraído no se estudió en mayor detalle. Cabe la posibilidad de que se trate de los polisacáridos nacientes que están siendo extrudados al exterior al ser sintetizados. Un argumento en favor de esto es que en aquellas incubaciones en donde la síntesis *in vitro* del exopolisacárido final no fue posible (por tratamiento exhaustivo del preparado enzimático con EDTA y shock frío), la radioactividad asociada a pellets era mucho menor o nula, utilizando cualquiera de los precursores (datos no mostrados). Un ejemplo parecido es el caso de lo que se obtuvo en trabajos similares realizados en nuestro laboratorio previamente con la cepa *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* NA-30. En este caso no se logró polimerizar y tampoco se obtuvo incorporación de radioactividad a precipitados de células finales (J.C. Bossio, tesis Doctoral).

#### **IV.2.a.2.ii. ANALISIS DE LOS COMPUESTOS EXTRAIDOS EN LA FRACCION 2 (EXTRACTO 1203)**

Este análisis constó de dos estrategias diferentes para estudiar las propiedades y características de los compuestos presentes en el "Extracto 1203". En primer lugar, el camino utilizado fue el análisis de los "Extractos 1203" por electroforesis en papel sin tratamiento alguno y luego de someter al "Extracto 1203" a un tratamiento ácido suave. En segundo lugar, los extractos 1203 fueron fraccionados por cromatografía en columna de DEAE celulosa y los compuestos así aislados fueron analizados separadamente.

#### **-ANALISIS DEL EXTRACTO 1203 POR ELECTROFORESIS EN PAPEL**

Los compuestos presentes en el "Extracto 1203" (prenil-fosfo-azúcares) marcados radioactivamente tanto en [<sup>14</sup>C]GlcA como en [<sup>14</sup>C]Glc fueron sometidos a electroforesis en papel en buffer acetato de piridina 1,2 M, pH 6,5 (Solvente A), (Materiales y Métodos). Como se puede observar en la Fig. 4A (perfil inferior, [<sup>14</sup>C]GlcA), el material proveniente de incubaciones realizadas con la cepa 8002 permaneció en el origen de siembra, como era de esperar para prenil-fosfo-azúcares, los cuales son insolubles en el solvente utilizado. No obstante, cuando se utilizó material marcado en [<sup>14</sup>C]Glc (Fig.4A,perfil superior), aparece un pico adicional en la



zona neutra, denominado N, y en una cantidad relativamente grande con respecto al pico del origen.

Perfiles similares se obtuvieron utilizando tanto la cepa 8401 como 8401 pRL1JI (No mostrado).

Este componente N, se analizó con mayor detalle en todos los casos, por cromatografías en geles (Bio-Gel P4) y por hidrólisis total (1 N HCl, 10 min, 100°C) o parcial (0,5 N HCl, 1 h, 100°C) (Ver Materiales y Métodos). Se observó un componente de peso molecular aproximado de 4.000 Da, constituido sólo por glucosa. Por hidrólisis parcial y posterior cromatografía en el solvente D liberó una familia de soforooligosacáridos y glucosa (Resultados no mostrados).

Este tipo de compuestos se ha caracterizado como glucanos  $\beta$  (1-2) cíclicos y han sido descritos por primera vez hace ya mucho tiempo en el género *Agrobacterium* (Intire *et al.*, 1942; Gorin *et al.*, 1961). Posteriormente se encontró que las bacterias del género *Rhizobium* también eran capaces de sintetizar glucanos  $\beta$  1,2 cíclicos (Zervenhuizen y Scholten-Koerselman, 1979). Estudios realizados en colaboración con Angeles Zorreguieta del laboratorio del Dr. Luis Ielpi, han logrado ampliar el conocimiento de la biosíntesis de este polisacárido en la bacteria de la especie *Rhizobium leguminosarum*. Como en otros modelos anteriormente descritos de *Rhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* (Zorreguieta *et al.*, 1990), los glucanos cíclicos  $\beta$  (1,2) de *Rhizobium leguminosarum* *bv.* *trifolii*, *Rhizobium leguminosarum* *bv.* *phaseoli* y *Rhizobium leguminosarum* *bv.* *viciae* se sintetizarían a partir de UDPGlc como dador glicosídico y a través de la participación de una proteína intermediaria (Castro *et al.*, 1992)). Estos resultados no se incluyen en esta tesis.

Por otra parte los prenil-fosfo-azúcares se caracterizan por su labilidad al ser sometidos a un medio ácido (pH 2, 10 min, 100°C), liberando entonces un prenil alílico, un grupo pirofosfato y el correspondiente oligosacárido que estaba unido por su extremo reductor, como se puede ver en el esquema de la Fig. 3.

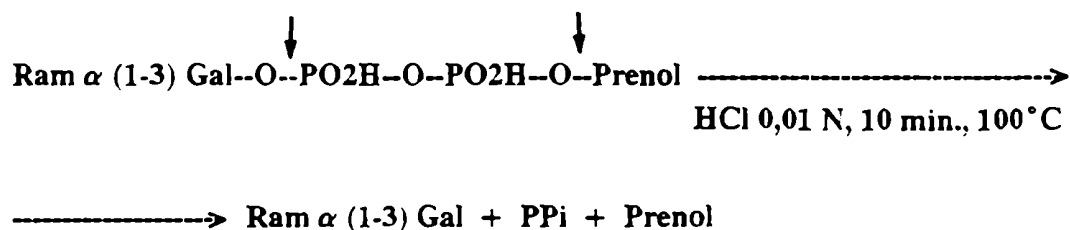


Fig.3: Tratamiento ácido del intermediario del antígeno O de *Salmonella*, ramnosil-gactosil-pirofosfato-prenol. Tomado de Dankert y Behrens (1971). Las flechas verticales en negro indican el lugar donde se cliva la molécula.

Como los prenil-difosfato-azúcares que se obtienen en el "Extracto 1203" se encuentran marcados radioactivamente en la fracción sacarídica con [ $^{14}\text{C}$ ], luego de este tratamiento se analizan los distintos oligosacáridos marcados tanto con [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA ó con [ $^{14}\text{C}$ ]Glc. según el caso, que han pasado a la fase acuosa. En estos estudios no se analizó ni la fracción poliprenólica ni el PPI liberado.

Los oligosacáridos negativamente cargados, que se liberan del lípido son solubles en el buffer de corrida y migran con diferentes movilidades hacia el ánodo. Por lo tanto, el "Extracto 1203" hidrolizado en condiciones ácidas suaves (pH 2, 10 min, 100°C) y luego sometido a electroforesis en papel, permitió observar un perfil diferente al observado con el material sin hidrolizar, tanto con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA (perfil inferior) como con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc (perfil superior), pero semejante para las tres cepas utilizadas: *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* 8002, 8401 y *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 8401 pRL1JI (Fig. 4, Panel B, C y D respectivamente).

Resultados idénticos fueron observados cuando se trabajó con la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NA-30, previamente descriptos (Bossio *et al.*, 1986).

Analizando más en detalle, se observaron cuatro picos al utilizar marca en [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA correspondientes a las movilidades relativas de los estándares internos de AMP, UMP, GlcA y RGlcA=1,22. Dichos picos fueron análogos a los mostrados anteriormente por la cepa ya estudiada de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NA-30, a, b, c y x indicados en la parte inferior de la Fig. 4, Panel A (Ver Antecedentes y Objetivos). A estos nuevos compuestos se los denominó a<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>, c<sub>1</sub>' y x<sub>1</sub> para la cepa 8002 (Fig.4 B); picos A, B, C' y X para la cepa 8401 (Fig.4 C); y picos A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>' y X<sub>1</sub> para la cepa 8401 pRL1JI (Fig.4 D). Resultados semejantes se obtuvieron al utilizar marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc, con la aparición de un nuevo pico en la zona neutra, para cada cepa denominados n<sub>1</sub>', N' y N<sub>1</sub>' correspondientes a las cepas 8002, 8401 y 8401 pRL1JI respectivamente (Fig. 4 B, C y D). Los compuestos x<sub>1</sub>, X y X<sub>1</sub>, de RGlcA=1,22, en todos los casos fueron caracterizados como ésteres fosfóricos cíclicos de los oligosacáridos, formados durante la concentración de la muestra. Esto se comprobó de la siguiente manera: se trataron los distintos compuestos "x" en condiciones ácidas moderadas (pH 1, 10 min, 100°C) y después con fosfatasa alcalina (Materiales y Métodos). Luego se sometieron a electroforesis en papel en el mismo sistema y se obtuvo, en todos los casos, un único pico c<sub>1</sub>', C' ó C<sub>1</sub>' según se tratase de la cepa 8002, 8401 ó 8401 pRL1JI, respectivamente (No mostrado). Idénticos resultados se obtuvieron en la cepa ya estudiada *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NA-30 (J.C. Bossio. Tesis Doctoral).

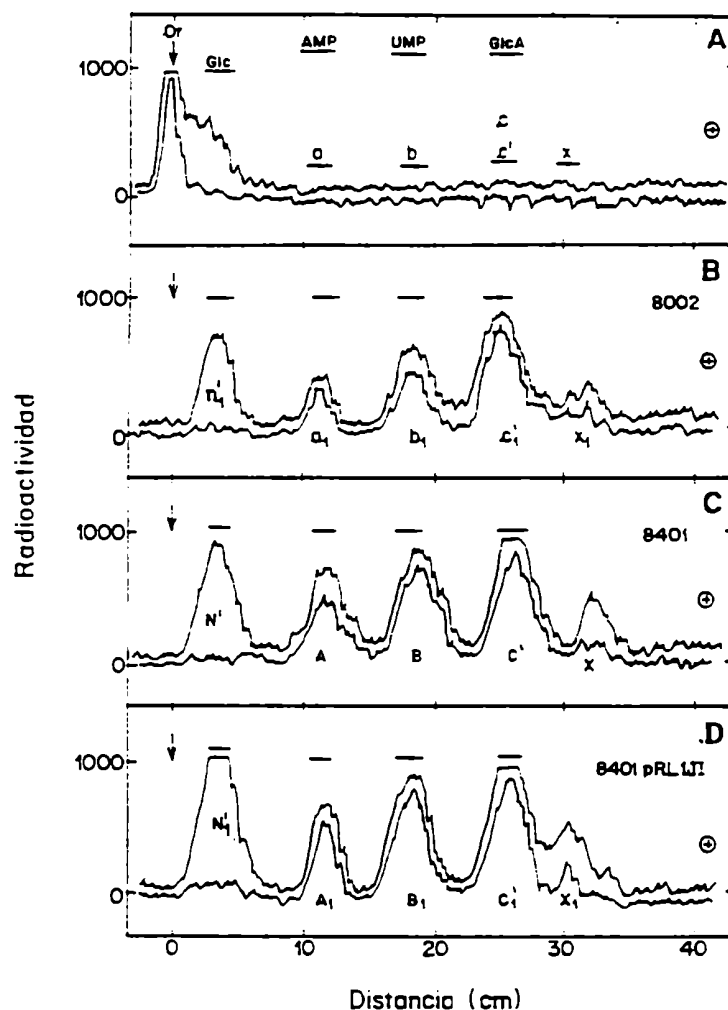


Fig.4: Electroforesis en papel con buffer A de los compuestos presentes en el extracto 1203 tanto con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$  como en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ .

A) El extracto 1203 de la cepa 8002 se sometió a electroforesis en papel con el buffer A, sin tratamiento previo, tanto con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  (línea superior) como con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$  (línea inferior). Idénticos perfiles se obtuvieron con las cepas 8401 y 8401 pRL1JI (No mostrados).

B), C) y D). Los extractos 1203 se hidrolizaron previamente en ácido débil (pH 2, 100 °C, 10 min.) . La línea superior corresponde en todos los casos a la marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  y la inferior a  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$ .

Las cantidades de radioactividad sembradas en cada caso son las siguientes:

A)  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ , 5.420 cpm;  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$ , 3.120 cpm. Cepa 8002.

B)  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ , 28.740 cpm;  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$ , 22.340 cpm. Cepa 8002.

C)  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ , 38.600 cpm;  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$ , 33.300 cpm. Cepa 8401.

D)  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ , 42.800 cpm;  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$ , 38.660 cpm. Cepa 8401 pRL1JI.

Los estándares utilizados son: Glc, GlcA, AMP, UMP; el octasacárido (a) de la cepa NA-30 y sus derivados mono y dipiruvilados (b) y (c), respectivamente, fueron caracterizados en trabajos anteriores (Bossio *et al.*, 1986).

El análisis de los compuestos neutros dio como resultado en todos los casos que además de encontrarse los glucanos ya nombrados había glucosa (Datos no mostrados). Esto indica que dicha glucosa se encontraba asociada a un lípido en forma de poliprenol difosfato glucosa, que al ser sometido al tratamiento ácido suave liberó la glucosa, correspondiendo a la primer glucosa que se incorpora a partir de UDP[<sup>14</sup>C]Glc como primer resto glicosídico entrante, en la síntesis de la unidad repetitiva. (Ver Fig.1 y Fig.52, Discusión). Por último, cabe aclarar que los compuestos a, b y c' de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NA-30 fueron caracterizados anteriormente como el octasacárido que constituye la unidad repetitiva, su derivado monopiruvilado y una mezcla de su derivado dipiruvilado y un trisacárido (GlcA-4GlcA-4Glc), llamado d, respectivamente. Cabía esperar que los compuestos obtenidos con estas tres cepas fueran los mismos y es por ello que se los continuó caracterizando por tamaño en la próxima sección.

#### **-FRACCIONAMIENTO DE LOS OLIGOSACARIDOS POR COLUMNA DE GELES**

Se calibró una columna de Bio-Gel P2 (200-400 mesh) equilibrada con acetato de piridina 1,2 M, pH 5.5, para separar oligosacáridos de hasta 10 restos glicosídicos, con los compuestos a, b, c y d de *R. l. bv. trifolii* NA-30 radioactivos y con estaquiosa, rafinosa, sacarosa y glucosa (Materiales y Métodos). Los compuestos obtenidos por electroforesis tanto con marca en [<sup>14</sup>C]GlcA como en [<sup>14</sup>C]Glc se eluyeron del papel de las áreas "a", "b" y "c" respectivamente y se cromatografiaron en este sistema. Como se puede ver en el gráfico de la Fig.5 A, los compuestos con marca en [<sup>14</sup>C]GlcA de las áreas "a" eluyeron en todos los casos como un solo compuesto con un volumen de elución equivalente a un octasacárido. Este octasacárido representaría la unidad repetitiva sintetizada por estas cepas, es decir los compuestos a<sub>1</sub>, A y A<sub>1</sub>, respectivamente. Los compuestos del área "b" eluyeron también como un único compuesto pero con un volumen de elución menor, correspondiente a un octasacárido monopiruvilado (Ver Fig. 5B), compuestos b<sub>1</sub>, B y B<sub>1</sub>. Por último, al cromatografiar el material de la zona "c", se obtuvo en todos los casos un perfil con tres picos (Ver Fig.5 C). Uno de ellos con un volumen de elución menor aún que el anterior, correspondiente a un octasacárido dipiruvilado y que se denominó c<sub>1</sub>, C y C<sub>1</sub> según sea proveniente de la cepa 8002, 8401 ó 8401 pRL1JI respectivamente. Un segundo compuesto con un volumen de elución aparente correspondiente a un trisacárido que se denominó, respectivamente: d<sub>1</sub>, D ó D<sub>1</sub>. Finalmente, un último compuesto que eluyó con un volumen de elución equivalente a un monosacárido y que fue

caracterizado finalmente como ácido glucurónico. No se estudió con mayor detalle el origen de este último compuesto.

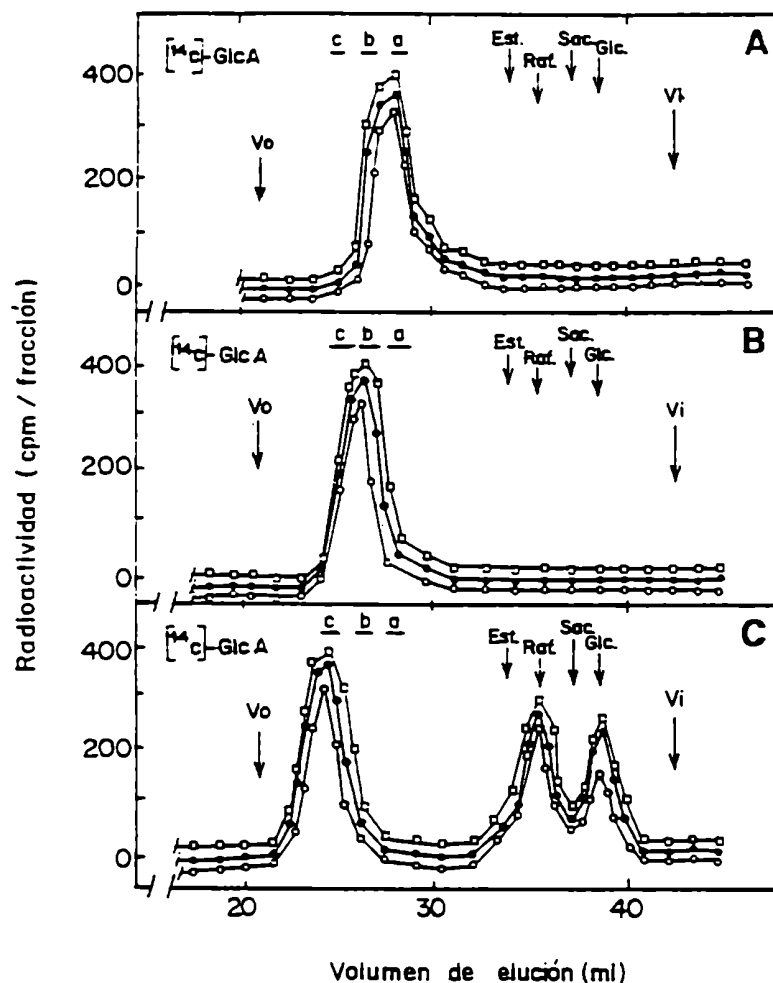


Fig.5: Cromatografía en columna de geles (Bio-Gel P2) de los compuestos fraccionados por electroforesis en papel de la Fig.4.

Los compuestos con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$  descritos en la Fig.4., fueron eluidos del papel de electroforesis y cromatografiados independientemente a través de una columna de Bio-Gel P2 (Ver Materiales y Métodos).

A) Compuestos eluidos de la zona "a"; ( $\square$ ), cepa 8002 (2.120 cpm); ( $\bullet$ ), cepa 8401 pRL1JI (1.680 cpm); ( $\circ$ ), cepa 8401 (1.670 cpm).

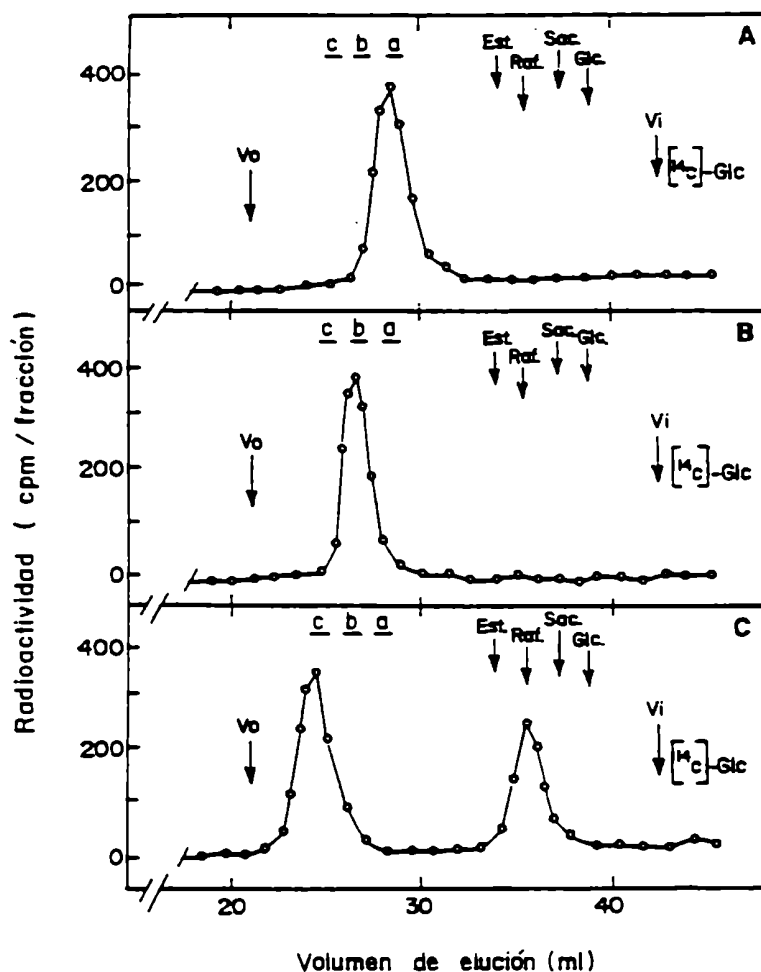
B) Compuestos eluidos de la zona "b"; ( $\square$ ), cepa 8002 (2.350 cpm); ( $\bullet$ ), cepa 8401 pRL1JI (2.100 cpm); ( $\circ$ ), cepa 8401 (1.700 cpm).

C) Compuestos eluidos de la zona "c"; ( $\bullet$ ), cepa 8002 (4.800 cpm); ( $\square$ ), cepa 8401 pRL1JI (4.990 cpm); ( $\circ$ ), cepa 8401 (3.200 cpm).

Estándares utilizados: Compuestos a, b y c, que corresponden al octasacárido (unidad repetitiva del EPS) de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NA-30 y sus derivados mono y dipiruvilados respectivamente, utilizados para calibrar la columna. Estaquiosa (Est.); Rafinosa (Raf.); Sacarosa (Sac.) y Glucosa (Glc.). Azul dextrano (BD) y  $\text{CoCl}_2$  se utilizaron como marcadores del volumen de exclusión e inclusión total, respectivamente.

Un compuesto con similares propiedades fue caracterizado anteriormente en la cepa NA-30 como prenil-monofosfato-galacturónico (Russomando *et al.*, 1992).

Resultados similares se obtuvieron cuando se analizaron los compuestos eluidos del papel de electroforesis de la cepa 8002 con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  (Fig. 6), con la diferencia de que en este caso no se encontró el compuesto con características de ácido glucurónico de la zona "c". Idénticos resultados se obtuvieron con las cepas 8401 (Fig.7) y 8401 pRL1JI (Fig.8).



**Fig.6:** Cromatografía en Bio-Gel P2 de los compuestos de la cepa 8002 con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  eluidos del papel de electroforesis de la Fig.4 A.

Se procedió de igual manera a la indicada en la Fig.5.

Material eluido de la zona "a", (3.300 cpm) (A); de la zona "b", (2.890 cpm) (B) y Material eluido de la zona "c", (4.560 cpm) (C). Estándares: compuestos a, b y c se utilizaron para calibrar la columna, correspondientes a la unidad repetitiva del EPS de *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* NA-30, y sus derivados mono y dipiruvilado, respectivamente. Estaquiosa (Est.); Rafinosa (Raf.); Sacarosa (Sac.) y Glucosa (Glc.), utilizados como marcadores de volumen de elución de un tetra, tri, di y monosacárido, respectivamente. El volumen de exclusión e inclusión total se determinó con Azul dextrano (BD) y  $\text{CoCl}_2$ , respectivamente.

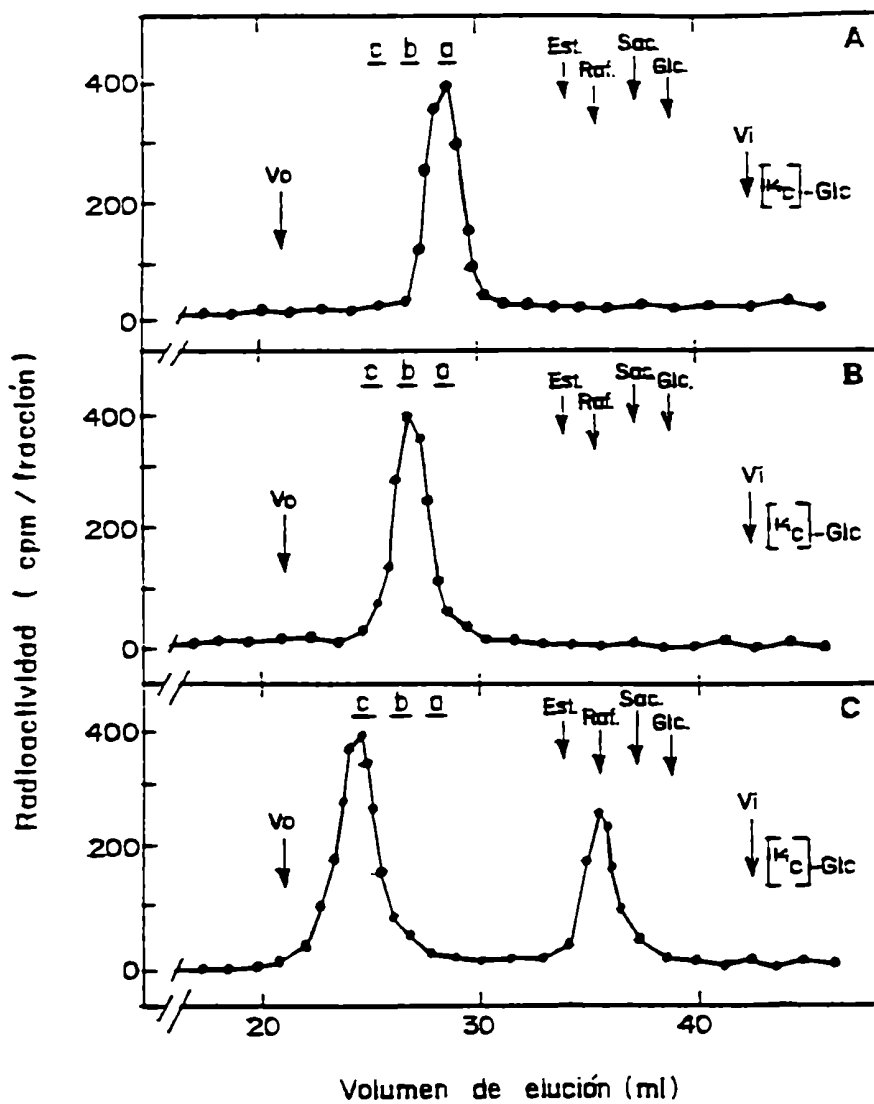
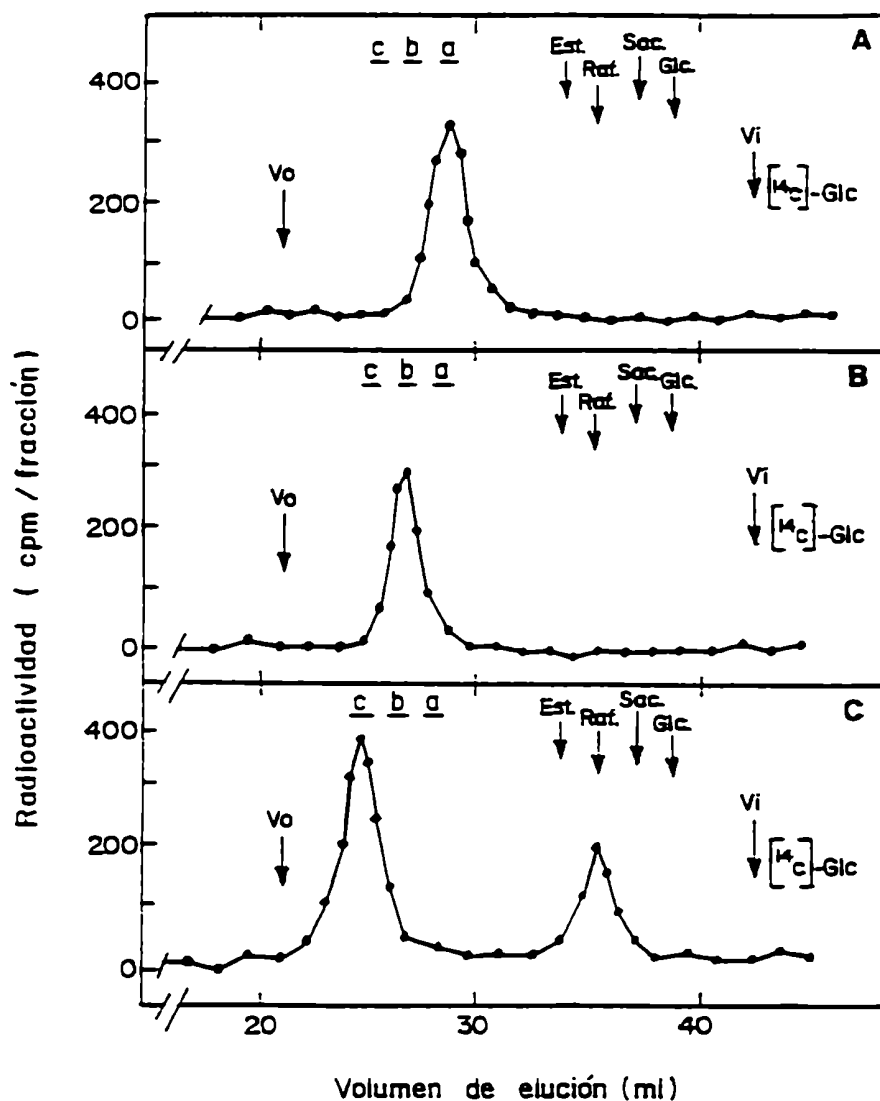


Fig.7: Cromatografía en Bio-Gel P2 de los compuestos de la cepa 8401 con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  eluidos del papel de electroforesis de la Fig.4 C. Material eluido de la zona "a" (4.200 cpm) (A), zona "b" (3.150 cpm) (B) y de la zona "c" (5.250 cpm) (C). Los estándares usados son los mismos que en la Fig.6.



**Fig.8:** Cromatografía en Bio-Gel P2 de los compuestos de la cepa 8401 pRL1JI con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  eluidos del papel de electroforesis de la Fig.4 D. Material eluido de la zona "a" (2.100 cpm) (A), zona "b" (1.800 cpm) (B) y de la zona "c" (4.350 cpm) (C). Los estándares usados son los mismos que en la Fig.6.

Como se mencionó, estudios anteriores realizados con las cepas NA-30 han concluido que el compuesto a, corresponde a la unidad repetitiva (octasacárido), b, a su derivado monopiruvilado y c, a su derivado dipiruvilado, respectivamente. Los tres consisten en un mismo octasacárido no piruvilado o con diferentes grados de piruvilación. Era de esperar que este esquema se diera también en las nuevas cepas en estudio.



### **-HIDROLISIS ACIDA SUAVE DE LOS OCTASACARIDOS PIRUVILADOS**

Para estudiar la interrelación que existe entre los octasacáridos y considerando que el EPS final presenta en todos los casos un grado de piruvilación que es del orden de 2 grupos cetal-piruvatos por unidad repetitiva (Datos no mostrados), era razonable pensar que los diferentes estados de piruvilación son estados fisiológicos antes de ser polimerizados para dar el polisacárido final. Se realizó entonces una hidrólisis ácida suave de los compuestos "b" y "c", para eliminar parcial (pH 2, 10 min, 100°C) ó totalmente (Idem anterior pero durante 90 min) los restos cetal-piruvato presentes. Esto se realizó tanto con los compuestos con marca en [<sup>14</sup>C]GlcA como en [<sup>14</sup>C]Glc. Los productos se analizaron por electroforesis en papel y cromatografías en geles como se describiera anteriormente. En todos los casos, los productos de las cepas 8002, 8401 y 8401 pRL1JI, luego de la depiruvilación total dieron los octasacáridos depiruvilados a<sub>1</sub>, A y A<sub>1</sub>, respectivamente. Cuando se sometió a tratamiento parcial partiendo del octasacárido dipiruvilado, se obtuvo una mezcla de los tres derivados con diferentes grados de piruvilación 0, 1 y 2 (restos cetal piruvatos), (Datos no mostrados). El octasacárido dipiruvilado fue generador del mono y del depiruvilado, en todos los casos. Por último, al partir del monopiruvilado, con un tratamiento parcial, se obtuvo una mezcla del mismo más el depiruvilado (Datos no mostrados). Esto confirmó la interrelación entre estos tres compuestos. Más adelante veremos de que manera se pueden aumentar las cantidades relativas de los octasacáridos piruvilados incubando en presencia de concentraciones crecientes de PEP (fosfo-enol-piruvato), dador fisiológico de restos cetal-piruvatos (Ielpi *et al.*, 1981a).

En la siguiente sección se analizará el "Extracto 1203" por cromatografía en columna de DEAE-celulosa, como una segunda estrategia para estudiar los compuestos con características de lípido-azúcares.

### **-ANALISIS DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN EL EXTRACTO 1203 POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA**

Los diferentes "Extractos 1203" sin tratar, obtenidos en incubaciones realizadas a 10°C como se indica en la Tabla IV, se sometieron a cromatografía en columnas de intercambio aniónico débil diseñada para compuestos lipofílicos (Dankert *et al.*, 1966). Para esto se armó una columna de DEAE-celulosa, equilibrada con metanol 99% y se cromatografiaron los extractos 1203 en un gradiente lineal de 0 a 2 M de acetato de amonio.

Los resultados de la Fig. 9 muestran los perfiles cromatográficos obtenidos con la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* 8002. luego de cromatografiar los

"Extractos 1203" obtenidos tanto con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$  (panel A) como con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  (Panel B). Idénticos resultados se obtuvieron con la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* 8401 (Fig.10) y con la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 8401 pRL1JI (Fig.11), como con la ya descrita *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NA-30 (J.C. Bossio, Tesis Doctoral) (No mostrado).

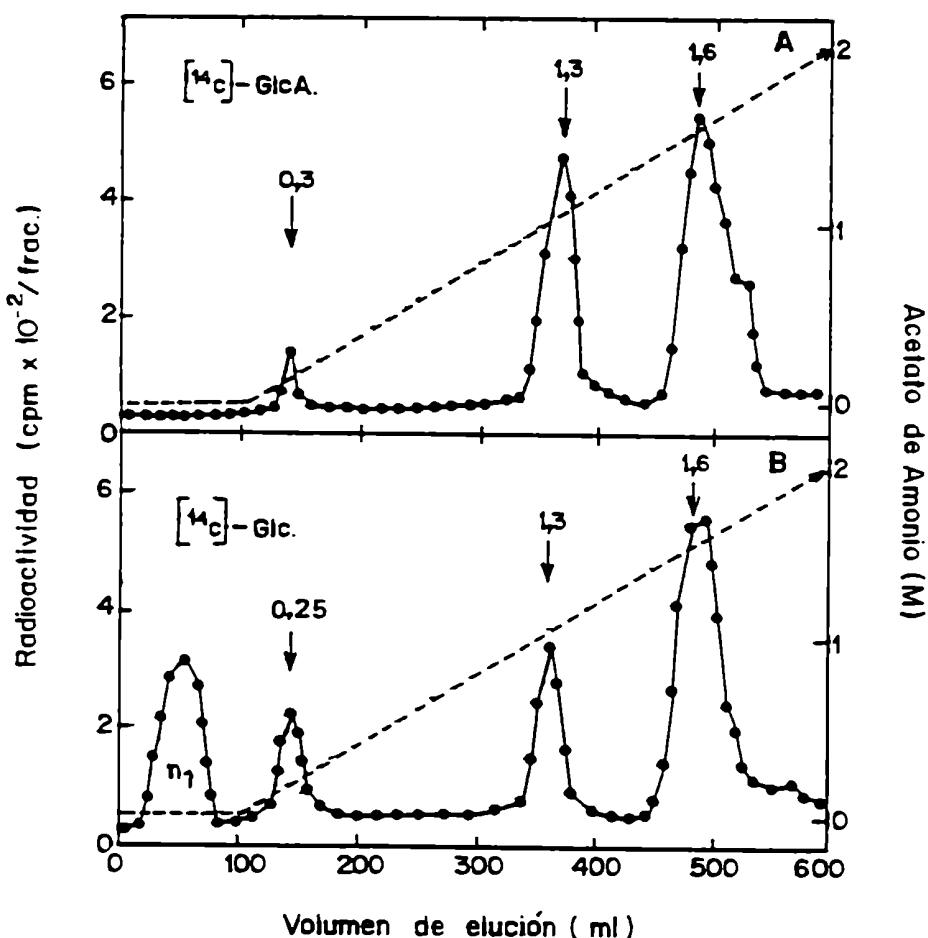
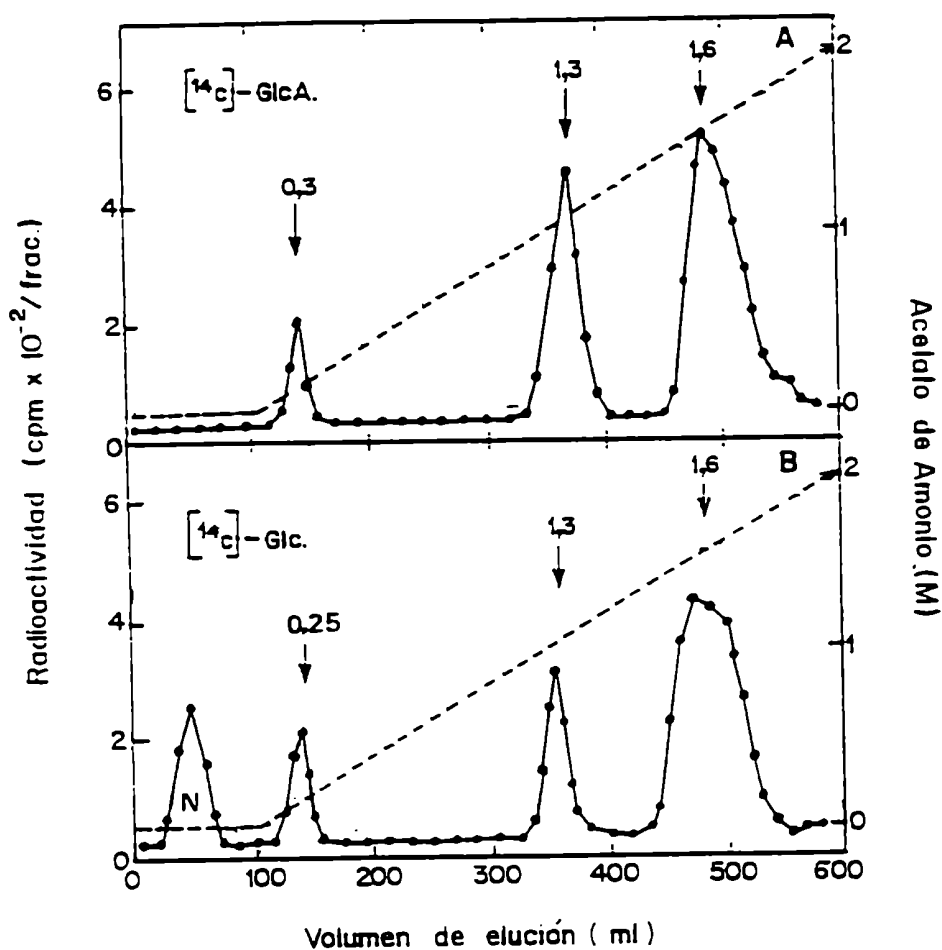


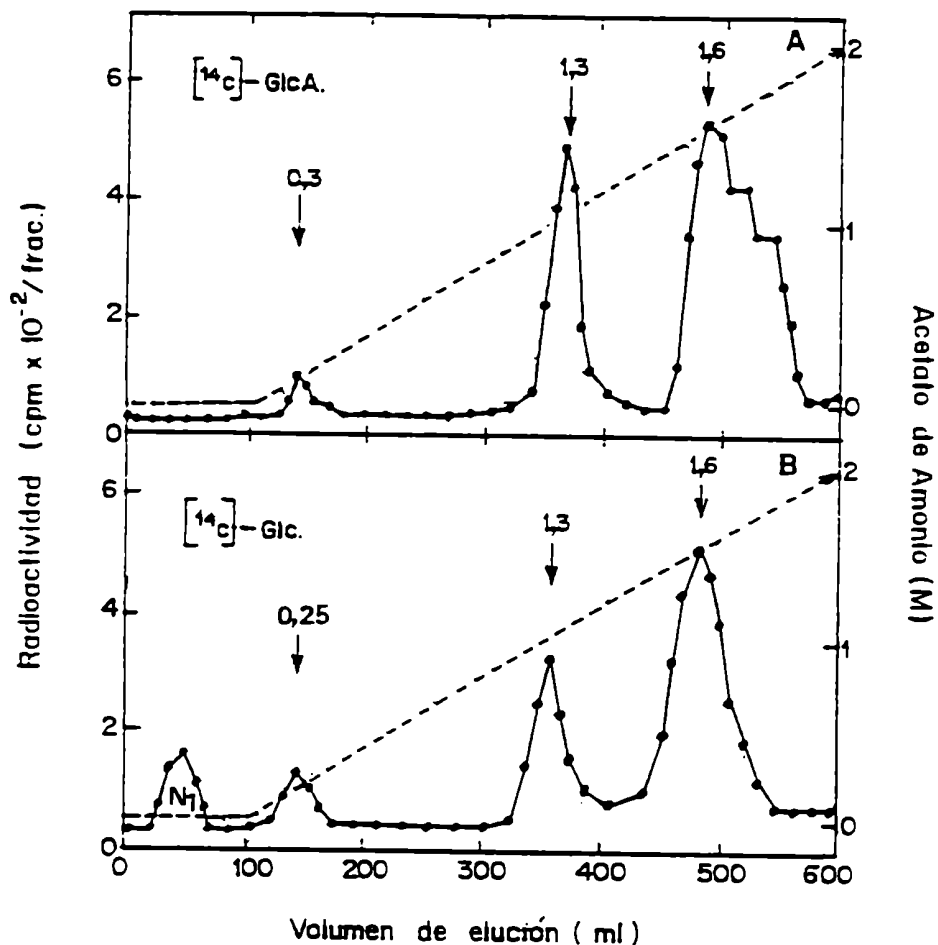
Fig.9: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa

Extractos 1203 sin tratar obtenidos a partir de la cepa 8002, tanto marcados en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$ , (12.800 cpm) panel A, como en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ , (18.400 cpm) panel B, provenientes de ensayos como los que se indican en la Tabla IV, fueron sometidos a cromatografía de intercambio aniónico débil (Ver Materiales y Métodos). Se tomaron 200 fracciones de 3 ml cada una y se midió radioactividad en alícuotas de 0,5 ml de cada fracción. El pico n<sub>1</sub> corresponde a un compuesto neutro. Los números en la parte superior de los picos indican la concentración de acetato de amonio en la cual eluyeron los restantes compuestos.



**Fig.10: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa**

Extractos 1203 sin tratar obtenidos a partir de la cepa 8401, tanto marcados en [<sup>14</sup>C]GlcA, (10.400 cpm) panel A, como en [<sup>14</sup>C]Glc, (12.800 cpm) panel B, provenientes de ensayos como los que se indican en la Tabla IV, fueron sometidos a cromatografía de intercambio aniónico débil (Ver Materiales y Métodos). Se tomaron 200 fracciones de 3 ml cada una y se midió radioactividad en alícuotas de 0,5 ml de cada fracción. El pico N corresponde a un compuesto neutro. Los números en la parte superior de los picos indican la concentración de acetato de amonio en la cual eluyeron los restantes compuestos.



**Fig.11: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa**

Extractos 1203 sin tratar obtenidos a partir de la cepa 8401 pRL1J1, tanto marcado en [<sup>14</sup>C]GlcA, (16.100 cpm) panel A, como en [<sup>14</sup>C]Glc, (18.300 cpm) panel B, provenientes de ensayos como los que se indican en la Tabla IV, fueron sometidos a cromatografía de intercambio aniónico débil (Ver Materiales y Métodos). Se tomaron 200 fracciones de 3 ml cada una y se midió radioactividad en alícuotas de 0,5 ml de cada fracción. El pico N1 corresponde a un compuesto neutro. Los números en la parte superior de los picos indican la concentración de acetato de amonio en la cual eluyeron los restantes compuestos.

En todos los casos, para las tres cepas (8002, 8401 y 8401 pRL1JI), se procedió a analizar los compuestos presentes en cada pico, luego de ser filtrado a través de una columna LH-20 para desalar (Ver Materiales y Métodos) con posterior hidrólisis ácida suave y caracterización por electroforesis en papel con el solvente A y columna de geles (Bio-Gel P2).

En general, con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA (Fig.9, 10 y 11 Panel A), se observan tres compuestos. Un pico pequeño que eluye a 0,3 M de acetato de amonio, que libera sólo [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA libre cuando es sometido a hidrólisis ácida suave y cuya identidad se confirmó por posterior análisis en electroforesis en papel con los solventes A y B. Este compuesto encontrado en todas las cepas sería el que origina el GlcA descrito en la sección anterior (IV.2.a.2.ii.). Su posición de elución en la columna de DEAE correspondería a un lípido-monofosfato-glucurónico. No se estudió con mayor detalle.

Otro pico, grande en los tres casos, que eluye a 1,3 M de acetato de amonio, por posterior tratamiento ácido y análisis electroforético y cromatográfico, liberó un compuesto con características de un trisacárido y su derivado acetilado (Ver más adelante, análisis de los trisacáridos  $d_1$ , D y  $D_1$ ). El pico más cargado, eluido con 1,6 M de acetato de amonio, libera por tratamiento ácido y análisis por electroforesis y cromatografía tres octasacáridos, la unidad repetitiva anteriormente descrita y sus derivados mono y dipiruvilados, como se describió anteriormente en esta sección.

Un perfil semejante fue observado cuando se cromatografió en este mismo sistema el extracto 1203 con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc obtenido con las tres cepas (Fig.9, 10 y 11, Panel B). Los picos de 1,3 M y 1,6 M de acetato de amonio representan los mismos compuestos analizados anteriormente con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA. El pico pequeño de 0,25 M de acetato de amonio, liberó sólo [ $^{14}\text{C}$ ]Glc luego de ser hidrolizado y analizado por cromatografía en papel (Datos no mostrados). Esta posición cromatográfica pertenece a un lípido difosfato monosacárido neutro, y bien podría entonces tratarse de la primera glucosa que entra a partir de UDPGlc que constituiría el primer resto glicosídico entrante de la unidad repetitiva.

Si recordamos los datos descriptos en la sección anterior, esta misma glucosa aparece en la zona neutra de electroforesis de papel luego de analizar el extracto 1203 con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc previamente hidrolizado.

Por último otro compuesto observado con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc fue en los tres casos, un pico neutro (Fig.9, 10 y 11, Panel B), caracterizado como un glucano  $\beta(1-2)$  por cromatografía en Bio-Gel P4 e hidrólisis ácida parcial, ya descrito anteriormente como compuesto  $n_1$ , N ó  $N_1$ , según que la cepa 8002, 8401 ó 8401 pRL1JI, respectivamente lo originara.

#### **IV.2.a.2.iii. OBTENCION DE PRENIL-DIFOSFATO-AZUCARES DE TAMAÑOS INTERMEDIOS**

Como hemos visto en la sección anterior, a partir del análisis de los compuestos extraíbles en el extracto 1203, tenemos que en las condiciones de trabajo utilizadas hasta el momento se forman un poliprenol-difosfato-glucosa, un poliprenol-difosfato-trisacárido y un poliprenol-difosfato-octasacárido. Estos dos últimos con sus correspondientes derivados acetilados y piruvilados respectivamente.

El lector cauto se preguntará entonces en este momento: ¿por qué no se forman los restantes presuntos intermediarios? ¿son acaso las reacciones de transglicosidación restantes tan rápidas que no se pueden detectar otros compuestos intermedios? ¿es la entrada de los restos glucurónicos casi instantánea? ya que luego de la primer glucosa encontramos al trisacárido y luego sigue sin detenerse hasta el octasacárido.

Para responder a estas preguntas se cambió la temperatura de incubación bajándola a 0°C. Se consideró a la temperatura como un factor determinante en las reacciones de transglicosidación. En este caso se usaron células de la cepa 8002.

Se incubó en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]Glc sin agregado de UDPGlcA no radioactivo para favorecer la obtención de compuestos de tamaño intermedio y asumiendo la presencia de UDPGlcA endógeno.

Se obtuvo una buena incorporación de radioactividad al extracto 1203, pero menor que lo observado en condiciones de incubaciones a 10°C, ver Tabla V. También se observó que a esta temperatura la síntesis de polisacárido fue prácticamente nula (Tabla V).

#### **-FRACCIONAMIENTO POR ELECTROFORESIS EN PAPEL**

De igual manera a lo descrito anteriormente, el material presente en el extracto 1203, proveniente de incubaciones realizadas a 0°C, fue sometido a electroforesis en papel. Como vemos en la Figura 12 A, el material sin ser tratado presenta un perfil característico, un pico mayoritario en el origen de siembra y un pico adicional menor en la zona neutra. Este compuesto neutro luego de ser analizado resultó nuevamente glucanò  $\beta(1-2)$  (Datos no mostrados). Si en cambio se somete previamente el extracto 1203 a un tratamiento ácido debil prolongado (pH2, 90 min. 100°C). con el objeto de romper la unión fosfodiéster y además de eliminar completamente los restos cetil-piruvatos presentes, se obtuvo un perfil como el que se muestra en la Figura 12 B.

Se puede ver que en este caso la distribución de la radioactividad es diferente a la observada con el material proveniente de incubaciones a 10°C (Fig.4 B).

Tabla V: *Efecto de la temperatura de incubación.*

Exp.	Dador de azúcar		Temperatura de incubación (° C)	Incorporación de radioactividad (cpm / mg de proteínas)	
	Radioact.	No radioact.		Fracc.1 (EPS)	Fracc.2 (Extrac. 1203)
1)	UDPGlc		10	2.230	28.300
2)*			0		18.450

\* Este ensayo se realizó por duplicado.

**Incorporación de radioactividad a diferentes fracciones a partir de ensayos de incubación realizados con células tratadas con EDTA de la cepa *R. l. bv. phaseoli* 8002. Las incubaciones se realizaron en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]Glc sin el agregado de UDPGlc no radioactivo tanto a 10 como a 0 ° C. El resto del ensayo se procedió de la manera estandar indicada en Materiales y Métodos.**

No se observan los tres picos característicos sino una distribución heterogenea del material a lo largo de la misma zona (Fig.12 B). Se procedió entonces a eluir del papel los compuestos de las zonas "A", "B" y "C", como se indica en la Figura 12 B, y se analizaron como antes por cromatografía en Bio Gel P2.

El material de la zona neutra dio también en este caso dos compuestos al ser analizados, glucosa y glucanos  $\beta(1-2)$ , como era esperable (Datos no mostrados).

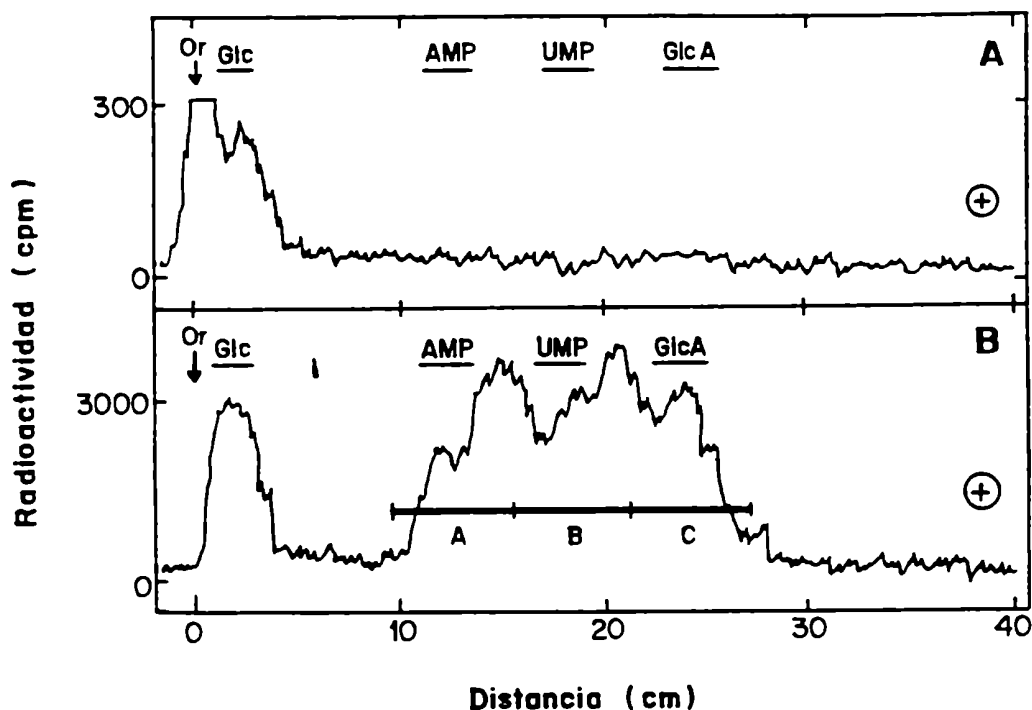


Fig.12: Electroforesis en papel con el solvente A de los compuestos presentes en el extracto 1203 de la cepa 8002, obtenidos en incubaciones a 0°C. El extracto 1203 obtenido en incubaciones realizadas a 0°C de la cepa 8002, como se indica en la tabla V, fue sometido a electroforesis en papel con el solvente A, tanto sin tratar (A), (2.800 cpm) como luego de un previo tratamiento ácido débil en condiciones de depiruvilación (Ver Materiales y Métodos) (B), (24.000 cpm).

#### -FRACCIONAMIENTO POR COLUMNAS DE BIO-GEL P2 DE LOS COMPUESTOS DE LAS ZONAS "A", "B" Y "C"

Los compuestos eluidos de las zonas "A", "B" y "C" de la Fig.12 B, se filtraron por Bio-Gel P2 y los perfiles obtenidos se muestran en la Figura 13 A, B y C, respectivamente. Como se ve en el panel A, al cromatografiar la zona "A", se obtuvieron compuestos que eluyen como un octasacárido, un heptasacárido y un disacárido que se llamó "S"; en el panel B, con la zona "B", un pentasacárido con un hombro que podría tratarse de un hexasacárido y un disacárido; y por último en el panel C, con la zona "C", dos compuestos: un tetrasacárido y un trisacárido. Es decir que el patrón de compuestos resultó más complejo que el visto anteriormente. Del análisis de estos resultados se explica entonces el perfil difuso y poco resuelto de la electroforesis anterior (Fig.12 B). De esta manera fue posible obtener todos los oligosacáridos intermedios buscados.



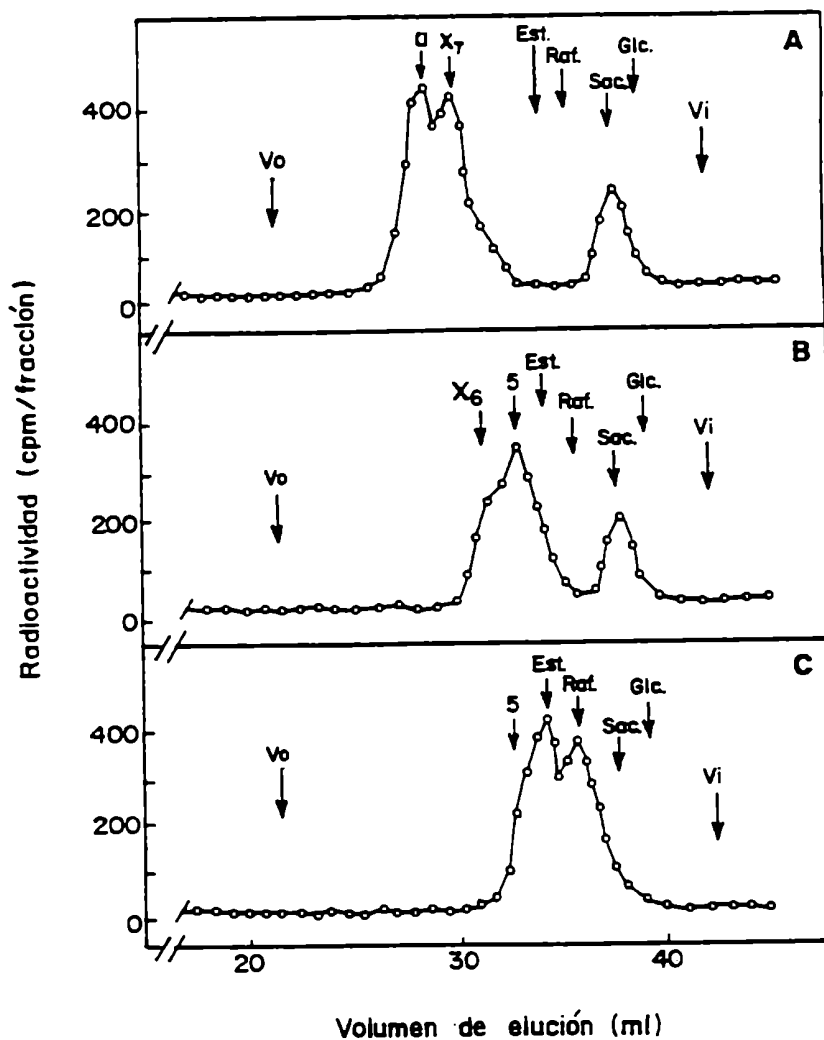


Fig.13: Cromatografía en Bio-Gel P2 de los compuestos eluidos del papel de electroforesis de la Fig.12 B.

Las tres zonas del papel de la electroforesis de la Fig.12 B indicadas como "A", "B" y "C" fueron eluidas con agua y los eluidos se cromatografiaron independientemente a través de una columna de Bio-Gel P2. (A), zona "A" (4.210 cpm); (B), zona "B" (3.100 cpm) y (C), zona "C" (3.550 cpm). Los estándares utilizados en este caso fueron los mismos que se indican en la Fig.6. Los compuestos X<sub>7</sub> y X<sub>6</sub> de *Acetobacter xylinum* (Materiales y Métodos) que indican el volumen de elución de un hepta y de un hexasacárido, respectivamente. 5, indica el volumen de elución aproximado que debería tener un supuesto pentasacárido, entre X<sub>6</sub> y la estaquirosa.

## **-INTERRELACION ENTRE LOS DISTINTOS OLIGOSACARIDOS OBTENIDOS**

Se puede inferir que a partir del trisacárido en adelante cada oligosacárido tendría una movilidad electroforética de acuerdo a la disminución de su carga eléctrica específica.

Se debería crear entonces un gradiente de movilidad a lo largo de la tira de papel: el trisacárido (de mayor carga específica y mayor movilidad) sería seguido por los otros oligosacáridos secuencialmente hasta llegar al octasacárido (de menor carga específica y menor movilidad).

Si esto es cierto podemos de esta manera relacionar todos los oligosacáridos en función del tamaño y de su movilidad electroforética, demostrando que están emparentados y que se diferencian solamente por el agregado secuencial de un residuo de glucosa (que no tiene carga).

El disacárido GlcA-4Glc, no se regiría por esta ley y tendría una movilidad electroforética intermedia entre el trisacárido y el octasacárido. Con esta idea se sometió a electroforesis cada oligosacárido por separado y se calculó su RUMP, datos que se muestran en la Figura 14 A, en donde se incluye además la movilidad de la glucosa (zona neutra), la del disacárido (GlcA-4Glc) y la de los octasacáridos mono y dipiruvilados. Por último en la Figura 14 B, se grafican los RUMP de cada oligosacárido en función del número de restos glicosídicos.

Desde el trisacárido hasta el octasacárido, se observó una linearidad razonable en función del número de restos presentes sugiriendo que están íntimamente emparentados y que se generan uno a partir del otro por agregado de un resto glicosídico neutro (glucosa).

Se realizaron idénticos ensayos con la cepa 8401, obteniéndose resultados semejantes (Datos no mostrados).

No se realizó este tipo de ensayos con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA.

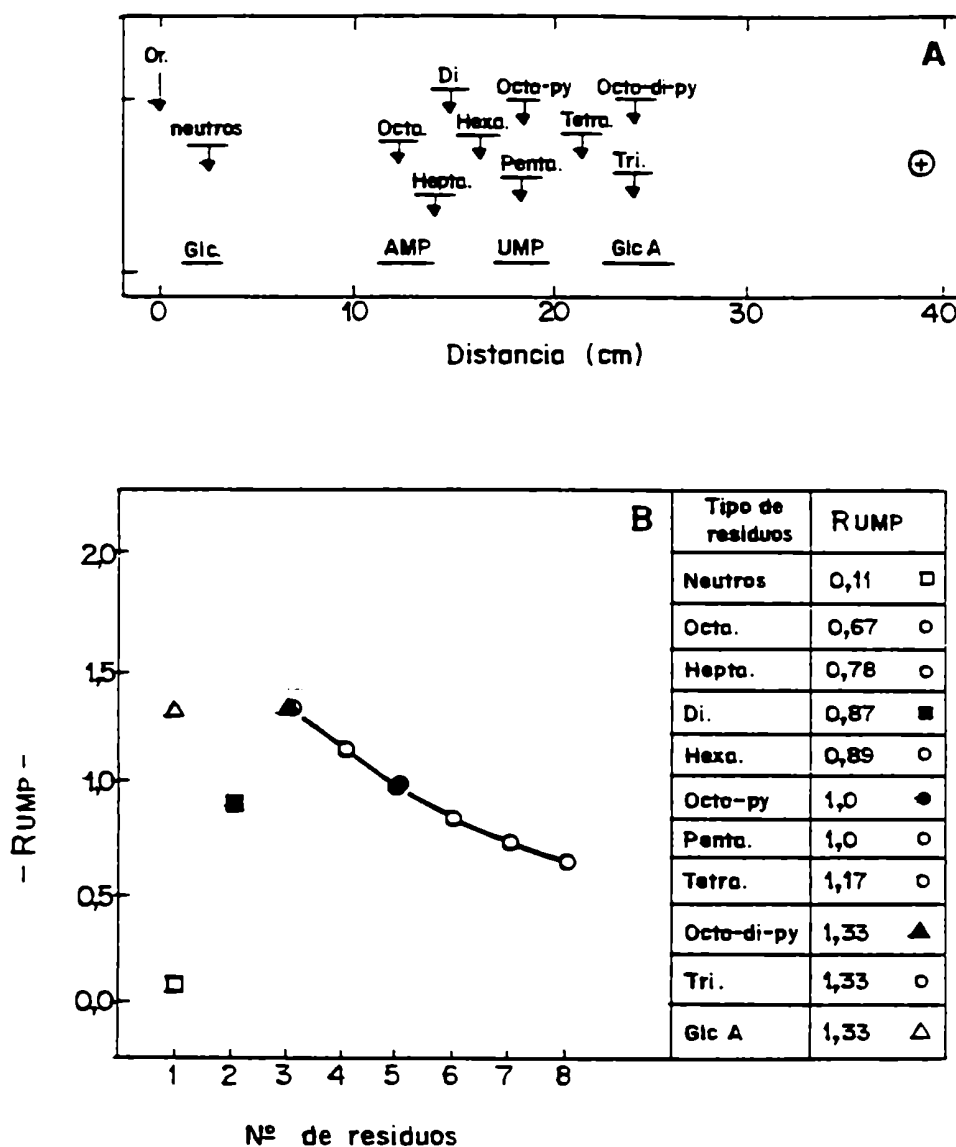


Fig.14: Movilidad electroforética de los oligosacáridos obtenidos en incubaciones a 0 y a 10°C con preparados enzimáticos de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* 8002.

A) Se indica la posición de cada oligosacárido obtenido por biosíntesis y fraccionamiento por electroforesis en papel con el solvente A y por filtración por columnas de Bio-Gel P2, luego de ser sometido independientemente a electroforesis con el solvente A. La figura resume las posiciones observadas con cada corrida electroforética. Glc, neutros; Octa, octasacárido; Hepta, heptasacárido; Hexa, hexasacárido; Penta, pentasacárido; Tetra, tetrasacárido; Tri, trisacárido; Di, disacárido; Octa-py, octasacárido monopiruvilado; Octa-di-py, octasacárido dipiruvilado. Además se indica la movilidad de los estándares internos AMP, UMP y GlcA.

B) Con las movilidades observadas en A) se calculó el RUMP a cada compuesto (Ver Tabla a la derecha) y se graficó el RUMP en función del N° de residuos totales de cada oligosacárido.

#### IV.2.a.2.iv. ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LOS OLIGOSACARIDOS INTERMEDIARIOS OBTENIDOS POR BIOSINTESIS CON LAS CEPAS 8401, 8002 Y 8401 pRL1JI

En esta sección se tratará el análisis de la estructura de cada uno de los oligosacáridos arriba mencionados obtenidos por biosíntesis luego de incubar tanto en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]GlcA como UDP[<sup>14</sup>C]Glc a 10 y a 0°C. Se analizarán uno a uno a medida que aumente su tamaño.

##### 1) ANALISIS DEL POSIBLE PRIMER RESIDUO GLICOSIDICO ENTRANTE

Como ya hemos comentado anteriormente la aparición de [<sup>14</sup>C]glucosa en la zona neutra de electroforesis en papel cuando marcamos a partir de UDP[<sup>14</sup>C]Glc solo se da luego del tratamiento ácido suave del extracto 1203 (Fig.4 B, C y D). El mismo resultado obtenemos cuando sometemos a idéntico tratamiento al compuesto con marca en [<sup>14</sup>C]Glc eluido en cromatografía de DEAE-celulosa a 0,25 M de acetato de amonio (Fig.9, 10 y 11 B). Estos resultados nos llevan a pensar que esta glucosa no sólo esta unida por un enlace difosfato a un aceptor lipídico, sino que además correspondería al primer resto glicosídico que se transferiría como Glc1P, a partir de UDPGlc, a un supuesto aceptor undecaprenol-monofosfato, para dar así como resultado el primer lípido-azúcar intermediario en la síntesis los EPS de *Rhizobium leguminosarum* 8401, *bv. phaseoli* 8002 y *bv. viciae* 8401 pRL1JI (Fig.52). Este paso ya ha sido descrito con mayor detalle en otros sistemas como es el caso de la síntesis del antígeno O de *Salmonella newington* (Wright., et al. 1965) y con el sistema de *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii* NA-30 en donde se demostró la transferencia de Glc-1-[<sup>32</sup>P] al lípido-mono-fosfato aceptor a partir de UDP[<sup>32</sup>P]Glc como precursor (Bossio, tesis Doctoral). En este estudio no se realizaron incubaciones en presencia de UDP[<sup>32</sup>P]Glc con el objeto de poder ver la entrada del fosfato como Glc 1-[<sup>32</sup>P].

##### 2) ANALISIS DEL DISACARIDO "S"

Este compuesto fue obtenido en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]Glc, con preparados enzimáticos de la cepa *Rhizobium leguminosarum bv phaseoli* 8002, sólo al incubar a 0°C (sección IV.2.a.2.iii.). Se pudo ver que su movilidad electroforética y su volumen de elución por columnas de Bio-Gel P2 son idénticas a las del disacárido que se obtiene como resultado de la degradación del trisacárido d<sub>1b</sub> (de *Rhizobium*

*leguminosarum* bv. *phaseoli* 8002) y del trisacárido d<sub>2</sub> (de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NA-30) con glusulasa de intestino de caracol (*Helix pomatia*) y posterior desacetilación alcalina, (Ver sección siguiente).

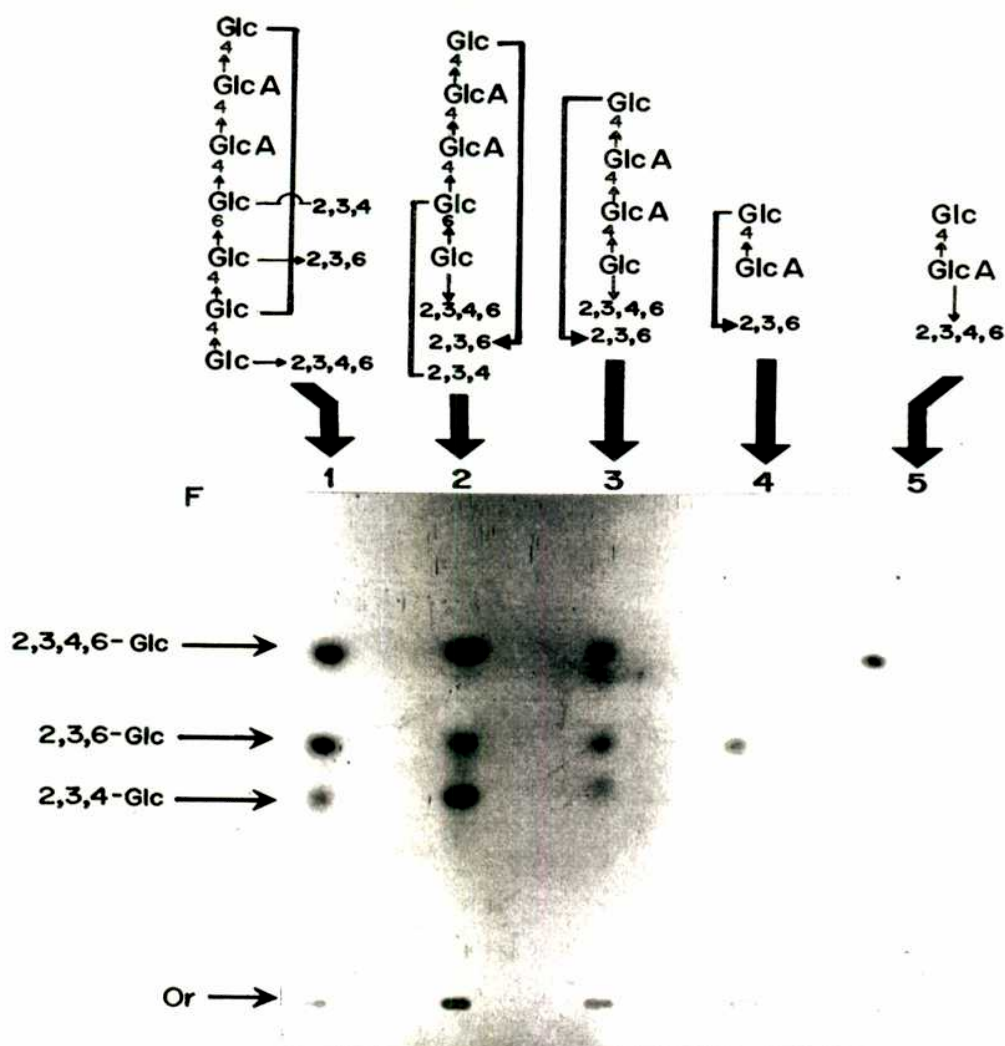


Fig.15: Análisis de los productos permitilados obtenidos de diferentes oligosacáridos. Muestras de oligosacáridos con marca en [<sup>14</sup>C]Glc obtenidos luego de eluirlos del papel de electroforesis de la Fig.14 A, fueron permitilados e hidrolizados y los productos analizados por TLC con el solvente H (Ver Materiales y Métodos). En la figura se muestra la estructura oligosacarádica propuesta en función de los derivados permitilados obtenidos y a las características de cada compuesto, como tamaño y carga. Carril 1, heptasacárido (2.300 cpm); 2, pentasacárido (2.600 cpm); 3, tetrasacárido (4.150 cpm); 4, disacárido (2.500 cpm) y 5, disacárido [<sup>14</sup>C]GlcA (permitilado en dos etapas para obtener el derivado metilado de glucosa)(3.150 cpm). Los números indican la posición de los grupos metilos dentro de la molécula de glucosa permitilada y las flechas las movilidades cromatográficas correspondientes. Or, origen de siembra y F, frente del solvente.

A diferencia del compuesto obtenido por degradación enzimática, el compuesto S obtenido por biosíntesis parecería no tener derivado acetilado (datos no mostrados). Se comportaría como un compuesto único. Esto podría significar que la entrada del resto acetilo a partir de su dador fisiológico acetil-CoA sería recién a nivel del trisacárido. Sin embargo, recordemos que este compuesto proviene de un tratamiento ácido suave durante 90 minutos y tal vez los restos O-acetilos fueron removidos, llegando a una conclusión errónea.

Si al disacárido S (cepa 8002) con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc se lo reduce con borohidruro de sodio (ver Materiales y Métodos) y luego se lo somete a posterior hidrólisis ácida total, se obtiene un único compuesto marcado con movilidad cromatográfica en papel con el solvente G que corresponde a sorbitol (Datos no mostrados).

Por otra parte, si a este mismo disacárido primero se lo permetila (Ver Materiales y Métodos) y posteriormente se lo somete a hidrólisis ácida total, obtenemos sólo el derivado 2,3,6 tri-O-metil[ $^{14}\text{C}$ ]glucosa (Fig.15, calle 4).

Todos estos resultados indicarían que este oligosacárido es un disacárido que contiene una glucosa en el extremo reductor sustituida por un resto ácido glucurónico en posición 4, es decir sería GlcA(1-4)Glc. No se confirmó si el enlace es  $\beta$ .

### 3) ANALISIS DE LOS TRISACARIDOS $d_1$ (8002), D (8401) y $D_1$ (8401 pRL1JI)

Como hemos visto anteriormente, éstos trisacáridos pueden ser obtenidos básicamente de dos maneras diferentes. Una, luego de someter a tratamiento ácido suave al extracto 1203 y posterior fraccionamiento por electroforesis en papel y en columnas de geles (Fig.6, 7 y 8). Otra forma es a partir del fraccionamiento del extracto 1203, sin tratamiento previo, a través de una columna de DEAE-celulosa, eluyendo el respectivo lípido-trisacárido como un único pico a 1,3 M de acetato de amonio (Fig.9, 10 y 11). En todos los casos se observó que se trataba del mismo compuesto (esto se detallará más adelante). Anteriormente se describió que utilizando la cepa *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* NA-30 el trisacárido obtenido por biosíntesis es una mezcla del trisacárido GlcA-4GlcA-4Glc y su derivado monoacetilado (Bossio, tesis Doctoral). También se sabía que el resto acetilo se encontraba en alguno de los dos primeros restos glicosídicos, por ensayos realizados de degradación con glucosidasa (J.C. Bossio; tesis doctoral) y por datos de análisis de espectro de masa (Kuo y Mort, 1986; Canter Cremers *et al.*, 1991b). Para observar si los trisacáridos  $d_1$ , D y  $D_1$  (cepas 8002, 8401 y 8401 pRL1JI, respectivamente) se encontraban acetilados, se los sometió a cromatografía en papel descendente con el

solvente D. Como se puede observar en los perfiles de la Fig.16, en todos los casos el trisacárido con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA eluido de la columna de geles (ver Fig.5, Panel C) se desglosó en dos compuestos, uno sin movilidad cromatográfica y otro que corre entre los estándares internos de maltooligosacáridos  $M_5$  y  $M_6$ . Estos compuestos resultaron ser el trisacárido y su derivado acetilado respectivamente. Este último, al ser más lipofílico, presenta mayor solubilidad en el solvente utilizado. Idénticos resultados se obtuvieron anteriormente con el sistema de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NA-30 (no mostrado) (J.C. Bossio, Tesis Doctoral). Los compuestos obtenidos con las cepas 8002, 8401 y 8401 pRL1J1 que se quedan en el origen de siembra fueron llamados  $d_{1a}$ ,  $D_a$  y  $D_{1a}$  y los que se mueven (acetilados)  $d_{1b}$ ,  $D_b$  y  $D_{1b}$ , respectivamente (Fig.16).

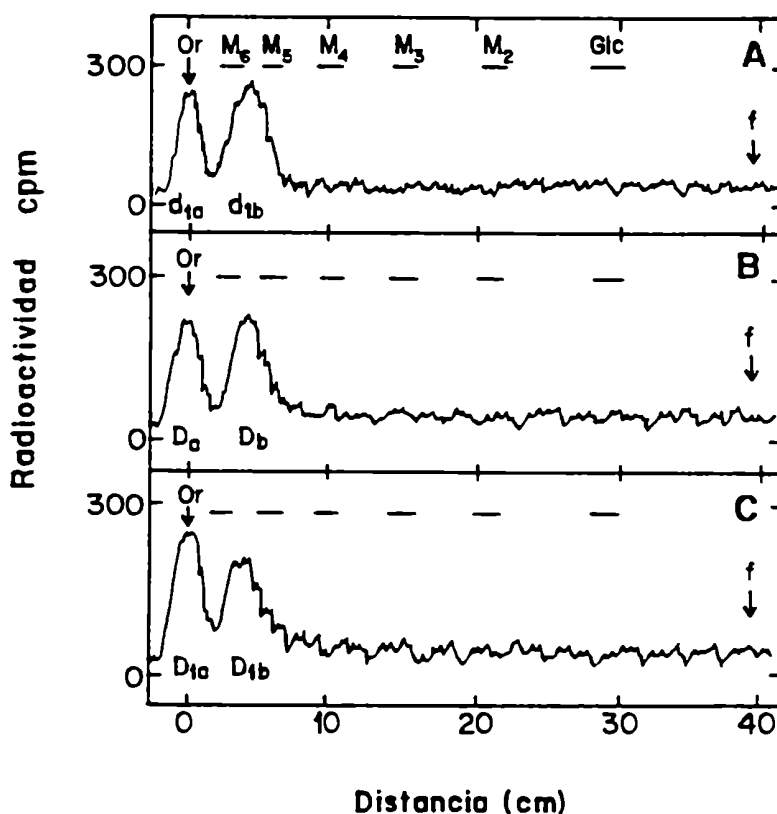


Fig.16: Análisis de los trisacáridos  $d_1$ ,  $D$  y  $D_1$  obtenidos con las cepas 8002, 8401 y 8401 pRL1J1, respectivamente. Los trisacáridos  $d_1$ ,  $D$  y  $D_1$  obtenidos con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA mostrados en la Fig.5, fueron cromatografiados en papel con el solvente D (Ver Materiales y Métodos). Panel (A), trisacárido  $d_1$  (2,350 cpm); (B), trisacárido  $D$  (2,430 cpm) y (C), trisacárido  $D_1$  (2,180 cpm). Estándares: Glc, glucosa;  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$ ,  $M_5$  y  $M_6$ , maltooligosacáridos. Cada compuesto se identifica en su base con el nombre correspondiente.

Se pudo ver además que las tres cepas estudiadas presentan un mismo perfil cromatográfico, siendo las cantidades de uno a otro trisacárido en todos los casos comparables. Idénticos resultados se obtuvieron cuando se cromatografiaron en este mismo sistema los trisacáridos con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  (Datos no mostrados). Al someter este compuesto con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  luego de ser reducido con borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) a hidrólisis ácida total y al analizar los productos observamos que el único compuesto detectado fue  $[^{14}\text{C}]\text{sorbitol}$  (No mostrado). Esto significa que hay una sola glucosa en el trisacárido y se encuentra en el extremo reductor (al igual que el disacárido S). Por último, se procedió al análisis por permetilación del trisacárido d<sub>1</sub> tanto con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$  como en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ . Como se ve en la Figura 17, se obtuvieron los siguientes derivados radioactivos: 2,3,6,tri-O-metilglucosa y 2,3,4,6,tetra-O-metilglucosa a partir del marcado con  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$ .

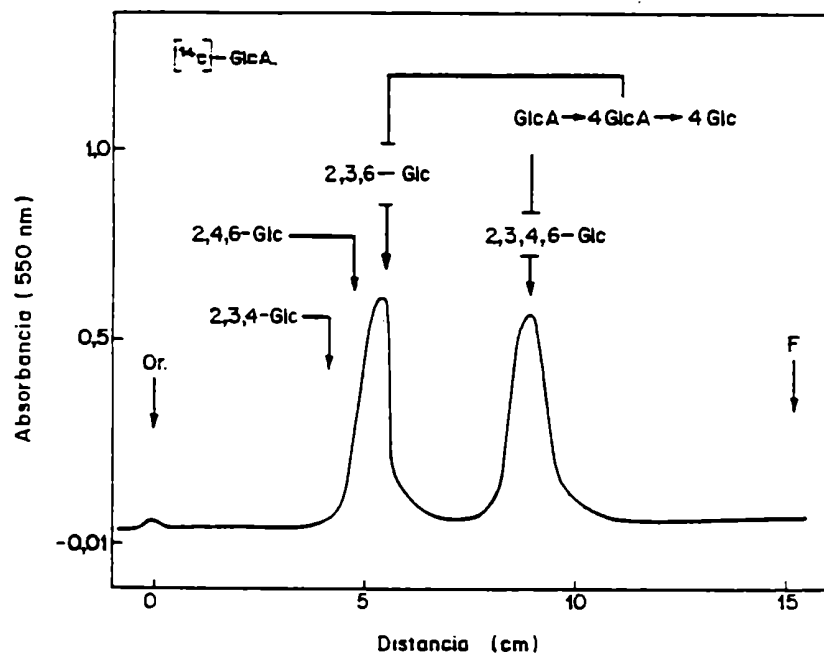


Fig.17: Análisis por TLC de los productos de permetilación del trisacárido d<sub>1</sub>, con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$ , de la cepa 8002. El trisacárido d<sub>1</sub>, con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$ , (10.500 cpm), fue permetilado en dos etapas (para llegar al derivado permetilado de glucosa), hidrolizado totalmente y luego cromatografiado en TLC con el solvente H. En el margen superior derecho se representa la estructura de la molécula del trisacárido que corresponde a los tres primeros azúcares a partir del extremo reductor del oligosacárido completo (octasacárido) (Ver Fig.1). Los números indican la posición de los grupos metilo dentro de la glucosa permetilada y las flechas las movilidades correspondientes de cada derivado metilado. La placa desarrollada se expuso ante una película X-O Maty esta fue revelada y luego densitométricamente medida por absorbancia a 550 nm. Or, origen de siembra; F, frente de solvente.



En cambio cuando el trisacárido estuvo marcado con  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ , sólo se obtuvo el derivado radioactivo 2,3,6,tri-O-metilglucosa (Fig.18).

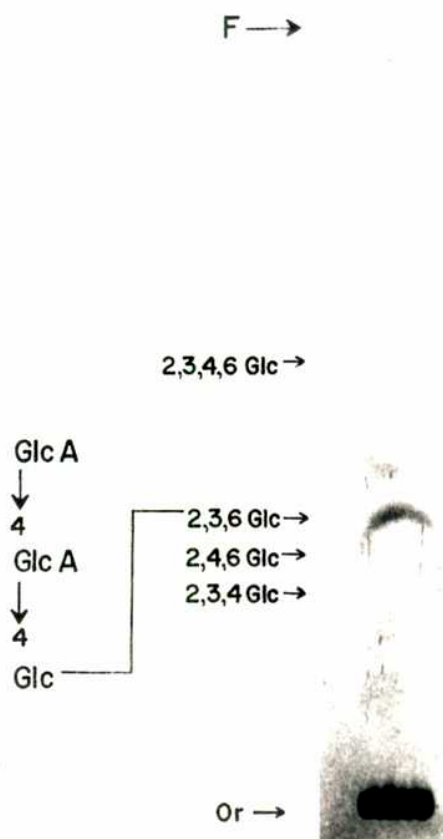


Fig.18: Análisis por TLC del producto de permetilación del trisacárido d<sub>1</sub> marcado en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ , de la cepa 8002.

El trisacárido d<sub>1</sub> con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ , (5.670 cpm), fue permetilado en una etapa, hidrolizado totalmente y los productos cromatografiados en TLC con el solvente H. En este caso se presenta la foto de la placa luego de ser expuesta. Los números indican la posición de los grupos metilo de las glucosas permetiladas usadas como estándares y las flechas sus movilidades cromatográficas respectivas. Or, origen de siembra y F, frente del solvente.

El trisacárido d<sub>1b</sub> obtenido con la cepa 8002 se estudió con más detalle con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$ . Se lo trató con glucosidasa de intestino de caracol y posterior electroforesis en papel con el solvente A, observándose un perfil con dos compuestos

(Fig.19 A). Un compuesto "f<sub>1</sub>" que migró como el estándar de GlcA y otro "e<sub>1</sub>" que tendría la movilidad del disacárido S (RUMP=0,85) (Fig.19 A). El compuesto f<sub>1</sub> fue caracterizado como [<sup>14</sup>C]GlcA por posterior análisis en electroforesis con el buffer B (Dato no mostrado).

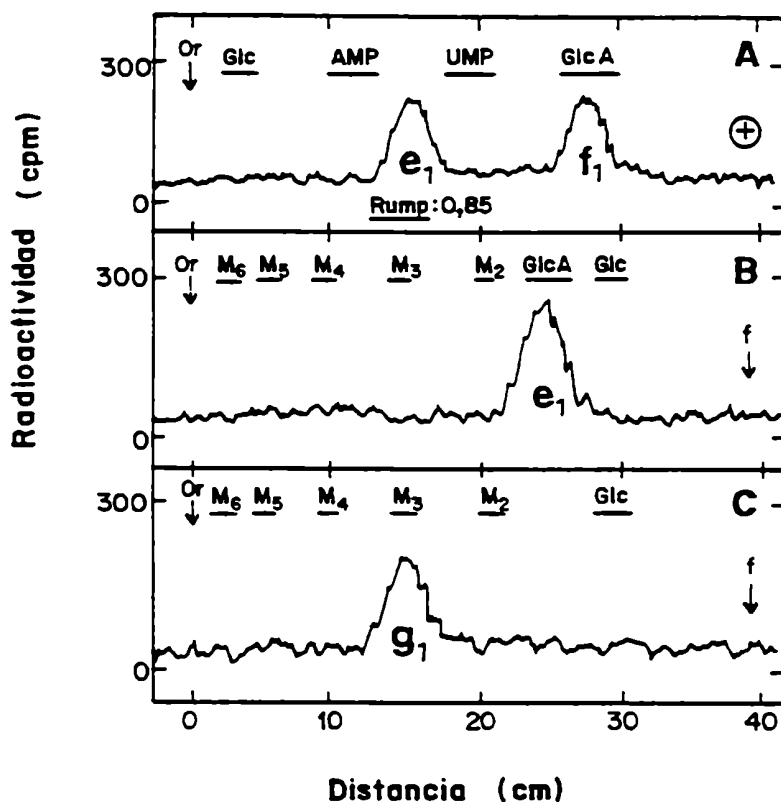


Fig.19: Degradación con glusulasa de intestino de caracol del trisacárido d<sub>1b</sub> de la cepa 8002.

El trisacárido d<sub>1b</sub> con marca en [<sup>14</sup>C]GlcA, obtenido en las condiciones de la Fig.16, fue tratado con glusulasa de intestino de caracol (Ver Materiales y Métodos) y luego sometido a electroforesis en papel con el solvente A, (panel A), (4.340 cpm). El material con movilidad de ácido glucurónico f<sub>1</sub> (1650 cpm), se eluyó del papel se caracterizó posteriormente como ácido glucurónico (no mostrado). El compuesto e<sub>1</sub> (panel A) (2.000 cpm), fue filtrado por una columna de Bio-Gel P2 y eluyó con el volumen de elución de un disacárido (No mostrado); se cromatografió en papel con el solvente D, (panel B). Este compuesto se trató en condiciones alcalinas débiles (Ver Materiales y Métodos) y posteriormente se lo cromatografió en papel con el solvente D, (panel C). Estándares: Panel A: Glc, glucosa; AMP; UMP y GlcA, ácido glucurónico, como estándares internos. Paneles B y C: los mismos utilizados en la Fig.16.

El compuesto ( $e_1$ ) se cromatografió en papel con el solvente D y migró como el estándar interno de GlcA, entre M2 y Glc (Fig.19 B). Luego de desacetilarlo (60 mM OHNa, 5 min, 25°C), su capacidad de migración en el mismo sistema cromatográfico fue menor, equivalente al estándar interno maltotriosa (M3), lo que significa que al perder el resto acetilo se hizo menos liposoluble y su velocidad de migración menor ; se lo llamó  $g_1$  (Fig.19 C). Además, este compuesto  $g_1$  se caracterizó como un disacárido por cromatografiado en columnas de geles (Dato no mostrado). Al ser tratado con glucosidasa se obtuvo sólo [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA (No mostrado), lo que significa que al no tener el grupo acetilo se hizo sensible al ataque enzimático como ya fuera demostrado con el material obtenido con la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NA-30 (J.C. Bossio, tesis Doctoral).

Este disacárido  $g_1$  con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA se permetiló en dos etapas (Materiales y Métodos) y luego se hidrolizó totalmente en medio ácido y se cromatografió en TLC con el solvente H. Como vemos en la Figura 15, calle 5, se obtuvo un sólo derivado permetilado, el 2,3,4,6 tetra-O-metil[ $^{14}\text{C}$ ]glucosa, indicando que en el disacárido original el resto GlcA se encontraba en el extremo no reductor. El disacárido  $g_1$  demostró así tener las mismas características que el disacárido S anteriormente sintetizado in vitro con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc.

Estos resultados en conjunto indicarían que el trisacárido  $d_{1a}$  está formado por una glucosa en el extremo reductor y seguida por dos restos de ácido glucurónico en enlaces 1-4, según la fórmula GlcA-4GlcA-4Glc. No se confirmó si estos enlaces son  $\beta$ , como se demostrara para el trisacárido  $d_1$  obtenido con la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NA-30 (J.C.Bossio, tesis Doctoral). Tampoco se investigó la posición del resto acetilo en el disacárido  $e_1$ .

#### 4) ANALISIS DE LOS TETRA, PENTA Y HEPTASACARIDOS DE LA CEPA 8002

Sólo fueron obtenidos como se describió anteriormente, con ensayos de incubación realizados a 0°C y en presencia de UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc. Además de ser caracterizados por tamaño en columna de geles y por su movilidad electroforética (Ver sección anterior), se estudió el azúcar en el extremo reductor luego de ser reducidos con borohidruro de  $\text{Na}^+$  y posterior hidrólisis total. En todos los casos se obtuvo [ $^{14}\text{C}$ ]sorbitol y [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa como componentes en relación aproximada de 1:1, 1:2 y 1:4 para el tetra. el penta y el heptasacárido, respectivamente (No mostrado), lo que confirmó que presentaban glucosa en el extremo reductor. Otro estudio realizado consistió en analizarlos por ensayos de permetilación. Los derivados permetilados obtenidos concuerdan con la estructura que se esperaba para cada uno de ellos (Fig.

15). Como vemos, el compuesto con características de tetrasacárido nos da tres residuos metilados, 2,3,6 tri-O-metil glucosa; 2,3,4,6 tetra-O-metil glucosa y vestigios de 2,3,4 tri-O-metil glucosa. El residuo 2,3,4 tri-O-metil glucosa no se debería observar si se tratase de un tetrasacárido puro, como se ve en la estructura de la Fig. 15, calle 3; la presencia de este compuesto indicaría que puede estar impurificado con el pentasacárido. Esto distorsiona el resultado esperado para el tetrasacárido.

Tanto el hepta como el pentasacárido dieron los tres mismos residuos metilados que los analizados en el caso del tetrasacárido cuyas estructuras se muestran en la Fig. 15, calle 1 y 2, respectivamente. Nótese además que la intensidad de las bandas es un dato adicional importante. Bandas más intensas se deben a:

1<sup>a</sup>) el derivado 2,3,4,6 tetra-O-metil glucosa proviene de la posición terminal del oligosacárido. es decir el más alejado del extremo reductor. En estas posiciones, por ser las últimas en agregarse durante la biosíntesis, cabe la posibilidad de que sean completadas con [<sup>14</sup>C]glucosa con mayor probabilidad que las primeras (del extremo reductor), que muy probablemente están ya ocupados por azúcares endógenos no marcados (Fig.15).

2<sup>a</sup>) por otra parte, como hay mayor cantidad de enlaces 1-4 los restos 2,3,6 tri-O-metil glucosa se pueden formar en mayor número.

Un ejemplo del primer caso es el compuesto pentasacárido de la calle 2, Fig.15. La banda más intensa es la del derivado 2,3,4,6 tetra-O-metil glucosa, correspondiente al extremo no reductor, y seguida según intensidades decrecientes, se ubican hacia el extremo reductor, el residuo 2,3,4,tri-O-metil glucosa y el menos intenso 2,3,6 tri-O-metil glucosa que corresponde a la glucosa del extremo reductor. Un ejemplo del segundo caso estaría representado por el heptasacárido, en donde vemos que el aporte de 2,3,6 tri-O-metil glucosa es triple y tiene una intensidad aquí semejante a la del resto 2,3,4,6 tetra-O-metil glucosa que es la última en ser transferida. El producto 2,3,4 tri-O-metil glucosa proveniente del centro del oligosacárido es el menos visible (Fig. 15, calle 1).

##### 5) ANALISIS DEL OCTASACARIDO a<sub>1</sub> DE 8002

Como vimos anteriormente, el octasacárido a<sub>1</sub> está relacionado con los compuestos b<sub>1</sub> y c<sub>1</sub> ya que estos dos últimos son los respectivos derivados mono y dipiruvilados. Por otro lado, como podemos ver en la Fig.1, la unidad repetitiva completa es un octasacárido que presenta las mismas características que el heptasacárido descrito anteriormente, más un resto glicosídico adicional que es una galactosa en el extremo no reductor, en enlace β 1-3.

El octasacárido  $a_1$  con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ , se redujo con borohidruro de  $\text{Na}^+$  y se hidrolizó completamente. Se obtuvieron tres compuestos marcados luego de analizar los productos de hidrólisis por cromatografía en papel (Fig.20): glucosa en mayor proporción, luego galactosa y sorbitol (aproximadamente en relación 4:1:0,7 respectivamente). Este último en una relación mas baja a la estequiométrica, posiblemente por la presencia de lípido-azúcares aceptores endógenos.

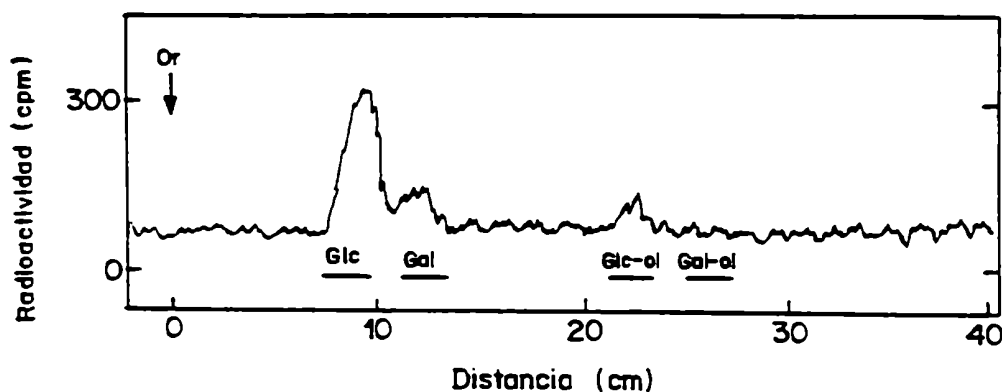


Fig.20: Análisis del octasacárido  $a_1$  de la cepa 8002, con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ . El octasacárido  $a_1$  (7.590 cpm), con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ , obtenido como se muestra en la Fig.6 A, fue reducido con borohidruro de sodio durante 16 horas (Ver Materiales y Métodos) y luego hidrolizado totalmente y cromatografiado en papel con el solvente G. Los estándares utilizados: Glc, glucosa; Gal, galactosa; Glc-ol, sorbitol y Gal-ol, galactitol. Or, origen de siembra y F, frente de solvente.

Por otra parte el octasacárido  $a_1$  con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$ , luego de una hidrólisis total, dió ácido glucurónico como único componente marcado (No mostrado). Por tratamiento con glusulasa de intestino de caracol, se obtiene el mismo disacárido  $e_1$  que el observado a partir del trisacárido acetilado  $d_{1b}$ , y ácido glucurónico libre (No mostrado). Esto quiere decir que debe estar acetilado por lo menos en parte pues se obtiene un producto que es idéntico al  $e_1$  observado a partir del trisacárido acetilado  $d_{1b}$ .

Por último, al someter al octasacárido  $a_1$  con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$ , a doble permetilación (Materiales y Métodos), se obtuvo un sólo derivado que es el 2,3,6 tri-O-metil glucosa (Fig.21).

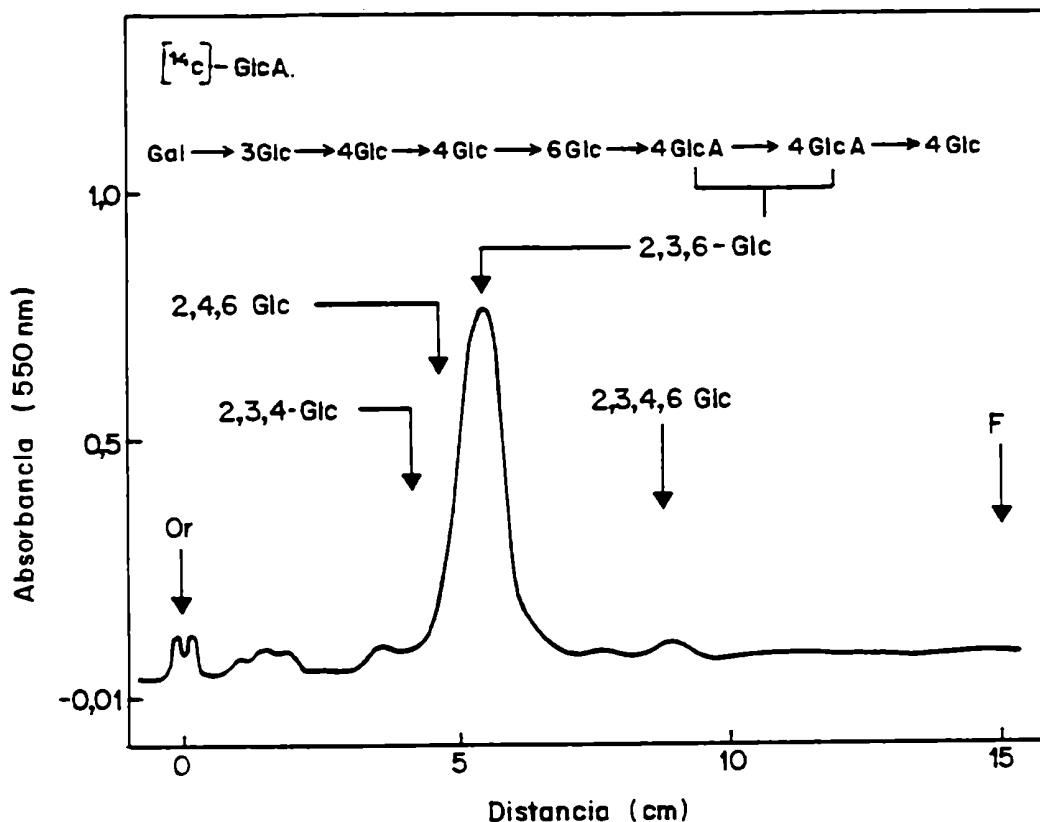


Fig.21: Análisis por TLC de los productos de permetilación del octasacárido a<sub>1</sub> de la cepa 8002 con marca en [<sup>14</sup>C]GlcA.

Una muestra del compuesto a<sub>1</sub> (6.400 cpm) se permetiló en dos etapas, se hidrolizó y se cromatografió en TLC con el solvente H. La autorradiografía obtenida se midió por densitometría y en el gráfico se muestra el resultado de la absorción de la única banda obtenida. En la parte superior de la figura se muestra la estructura propuesta para el octasacárido de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* 8002, destacando la marca en [<sup>14</sup>C]GlcA. Or, origen de siembra y F, frente del solvente.

Al aplicar este mismo tipo de análisis al octasacárido a<sub>1</sub>, con marca en [<sup>14</sup>C]Glc, se observa un patrón de residuos más complejo. Se observó lo esperado: 2.3.4.6 tetra-O-metil galactosa, 2,3,6 tri-O-metil glucosa, 2,4,6 tri-O-metil glucosa y 2,3,4 tri-O-metil Glc. La banda de 2,3,6 tri-O-metil glucosa resultó más intensa porque tenía el aporte de 3 restos glicosídicos (Fig. 22).

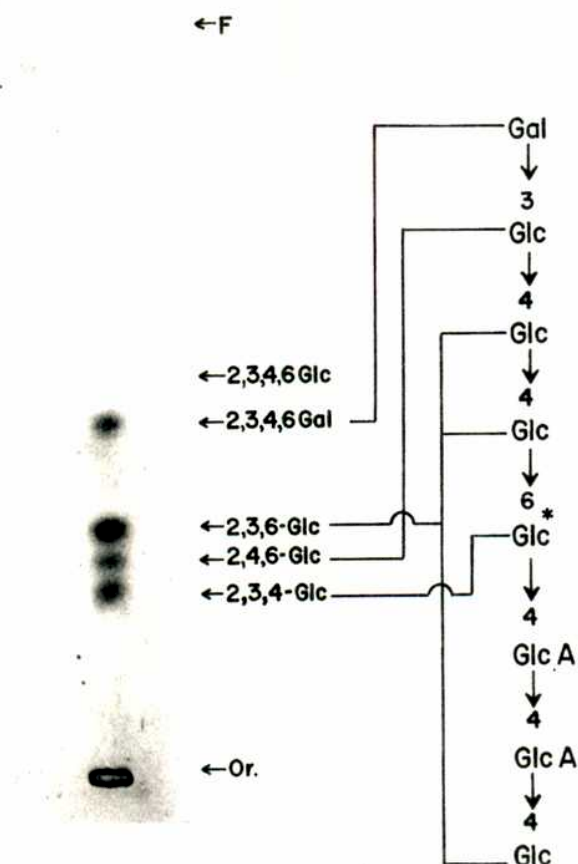


Fig.22: Análisis por TLC de los productos de permetilación del octasacárido a1, con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc, de la cepa 8002.

Una muestra del compuesto a1 (18.600 cpm) se utilizó para realizar este ensayo. Se procedió de igual manera a lo indicado en la Fig.20. El resto glicosídico indicado con un asterisco (\*), representa la glucosa que brindará su oxidrilo en posición 4 para formar un enlace glicosídico (1-4) con la glucosa del extremo reductor de otra unidad repetitiva, en el polímero (Ver Fig.24).

La aparición de 2 bandas nuevas, pone de manifiesto la presencia de la galactosa final en unión 1-3 como se mencionó anteriormente: el resto 2,3,4,6 tetra-O-metil galactosa confirma la presencia de galactosa en el extremo no reductor final, y el derivado 2,4,6 tri-O-metil glucosa que no se encontraba en el heptasacárido (Ver análisis del heptasacárido), pone de manifiesto al enlace 1-3, porque el oxhidrilo 3 está bloqueado en el anteúltimo resto glicosídico por la galactosa terminal (Comparar con la Fig. 15, calle 1).

#### IV.2.a.2.v. FORMACION DE POLIMERO IN VITRO

##### -ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LA FRACCION 1

En la sección anterior nos hemos dedicado a la descripción y estudio de los probables compuestos intermediarios que actuarían en la biosíntesis del EPS complejo de *Rhizobium leguminosarum*. ¿Pero qué ocurre con el producto final? En esta parte del trabajo analizaremos la presencia de polímero en los sobrenadantes de incubación, sus propiedades, estructura y algunas variables que modifican su síntesis, si es que ella ocurre.

##### 1) ANALISIS DE LOS SOBRENADANTES DE INCUBACION

Era de esperar que si durante la incubación, las unidades repetitivas sintetizadas se polimerizaban, liberarían un producto final ("polímero") al medio de incubación. Este quedaría solubilizado en el sobrenadante de incubación y en los lavados acuosos. Por lo tanto, los sobrenadantes acuosos obtenidos a partir de incubaciones en presencia tanto de UDP[<sup>14</sup>C]GlcA como de UDP[<sup>14</sup>C]Glc fueron sometidos a tratamiento ácido débil para destruir el exceso de precursores radioactivos y facilitar su posterior diálisis contra agua bidestilada (Materiales y Métodos).

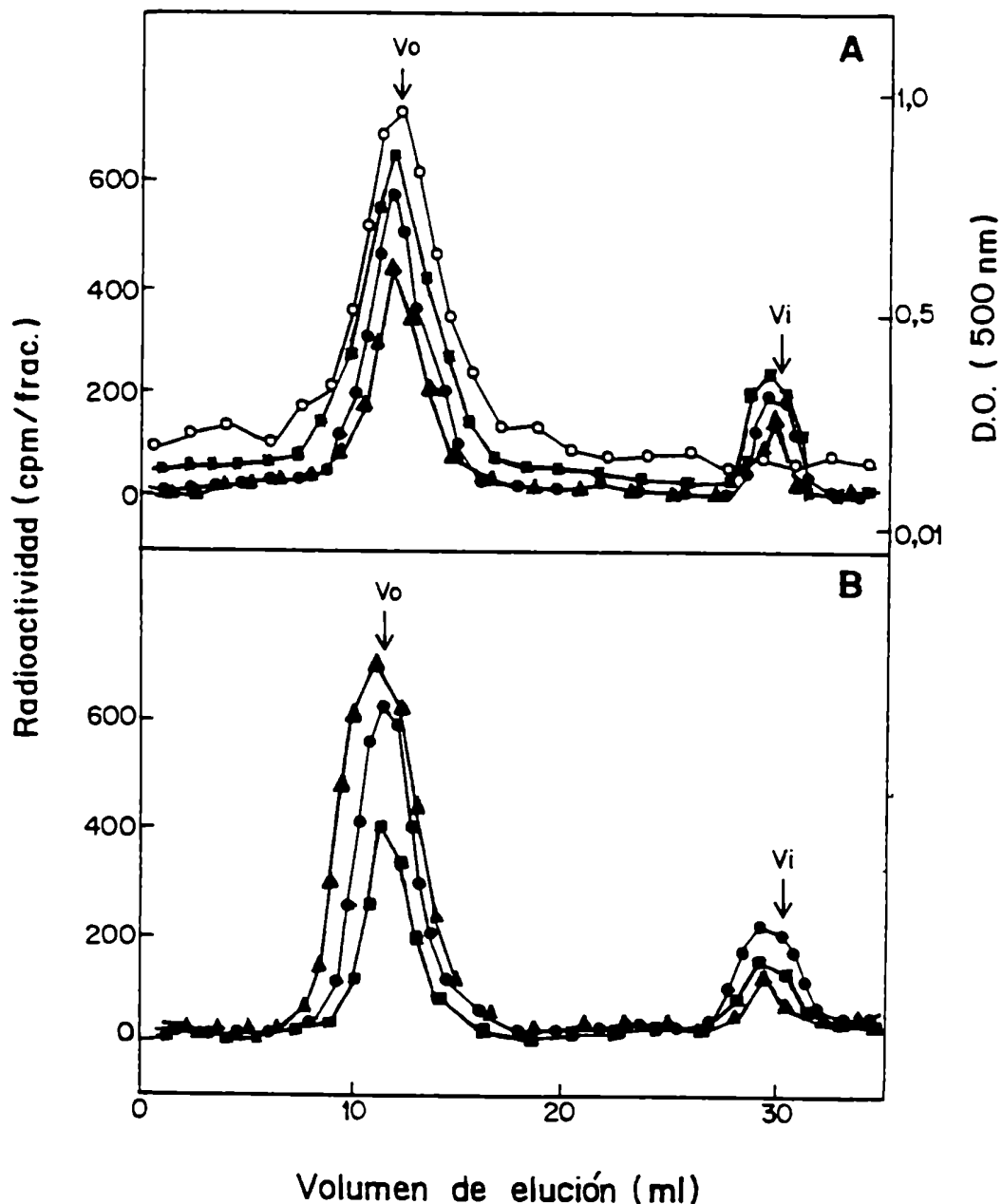
El sobrenadante así tratado se filtró a través de una columna de tamiz molecular Bio-Gel A-5m con tamaño de exclusión mayor a  $5 \cdot 10^6$  dalton (Materiales y Métodos).

En todos los casos se obtuvo un compuesto de alto peso molecular que se excluía totalmente. Al área total del pico, cuantificada como cpm, representa al EPS que se sintetizó *in vitro* durante la incubación (Tabla IV).

En la Fig. 23 vemos el perfil de elución de los EPS sintetizados *in vitro* utilizando la cepa 8002, tanto en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]GlcA como UDP[<sup>14</sup>C]Glc (Fig. 23 A y 23 B, respectivamente). Otro pico que se puede observar en los perfiles de la Fig. 23, es el que sale en el volumen de inclusión. Este compuesto fue analizado por electroforesis en papel con el buffer A y por cromatografía en columnas de Bio-Gel P2, resultando en todos los casos tener las mismas propiedades que la unidad repetitiva libre.

Más adelante veremos que esta unidad repetitiva se produce también en incubaciones en dos etapas. No se estudió el mecanismo por el cual esta unidad repetitiva aparece en el sobrenadante de incubación.





**Fig.23:** Filtración por Bio-Gel A 5m de los sobrenadantes de incubación. Los sobrenadantes de incubaciones realizadas tanto en presencia de UDP[ $^{14}$ C]GlcA como de UDP[ $^{14}$ C]Glc, con preparados enzimáticos de las cepas 8002, 8401 y 8401 pRLJI se procesaron como se indica en Materiales y Métodos y se filtraron a través de una columna de Bio-Gel A 5m (Ver Materiales y Métodos) y Tabla IV. Para cada marcación se corrió una columna diferente. Panel (A), (O-O), estándar interno de EPS frío de la cepa 8002, revelado por el método del fenol-sulfúrico (Smith y Montgomery, 1956) medido en una alícuota de 0,05 ml de una fracción de 0,5ml; Fracción 1 con marca en [ $^{14}$ C]GlcA, 8002 (3.200 cpm) ( $\blacktriangle$ ), 8401 (3.850 cpm) ( $\bullet$ ) y 8401 pRLJI (6.400 cpm) ( $\blacksquare$ ); Panel (B), Fracción 1 con marca en [ $^{14}$ C]Glc, 8002 (5.400 cpm) ( $\blacktriangle$ ), 8401 (2.100 cpm) ( $\blacksquare$ ) y 8401 pRLJI (3.180 cpm) ( $\bullet$ ) (Ver Tabla IV). Los volúmenes de exclusión e inclusión totales se midieron con azul dextrano (BD) y CoCl $_2$ , respectivamente.

Con el resto de las cepas (8002, 8401 y 8401 pRL1JI), también se obtuvieron perfiles semejantes (Fig.23), así como en *R. l. bv. trifolii* NA-30 (No mostrado).

También se puede observar en la Tabla IV que en todos los casos la producción de EPS sintetizado es activable por el agregado del otro nucleótido azúcar dador frío, al igual que los compuestos presentes en el "Extracto 1203".

Esta es la primera vez que se describe biosíntesis *in vitro* de un EPS dentro del género *Rhizobium*. Se utilizaron células tratadas con EDTA como preparado enzimático.

## 2) ANALISIS ESTRUCTURAL DEL POLIMERO SINTETIZADO IN VITRO

Como pudimos ver anteriormente para cada cepa el EPS sintetizado *in vitro* pudo ser marcado tanto con [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA como con [ $^{14}\text{C}$ ]Glc (Fig.23 A y B). Además, el polímero obtenido en incubaciones en presencia de UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc se lo hidrolizó completamente y se observó que contenía glucosa y galactosa marcadas, esta última en menor proporción (Datos no mostrados). Esto confirma que la composición glicosídica es congruente con la estructura propuesta (Fig. 1). Más adelante veremos también que tanto el polímero como las unidades repetitivas pueden ser marcadas con [ $^{14}\text{C}$ ]acetilo en incubaciones realizadas en presencia de UDPGlc y UDPGlcA fríos y [ $^{14}\text{C}$ ]Acetil-CoA. No se estudió la transferencia de restos cetal-piruvatos a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]PEP.

Para confirmar que el polímero obtenido *in vitro* tiene la misma estructura que la unidad repetitiva ya descripta, se procedió a permetilar al polímero con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc (Fig. 24). Como podemos observar, hay bandas comunes a las obtenidas con el [ $^{14}\text{C}$ ]Glc-octasacárido permetilado, siendo estas: 2,3,4,6 tetra-O-metilgalactosa, 2,3,6 tri-O-metilglucosa y, 2,4,6 tri-O-metilglucosa. La desaparición de la banda de 2,3,4 tri-O-metilglucosa (Fig.22) y la aparición concomitante de la banda de 2,3 di-O-metilglucosa en el [ $^{14}\text{C}$ ]Glc-exopolisacárido permetilado, significa que este resto glicosídico (con asterisco en la Fig. 24) presenta una unión nueva en el polímero, creando una "ramificación" y dando como resultado un derivado dimetilado de estas características.

Esta es una prueba muy fuerte de que el polisacárido sintetizado *in vitro* es el resultado de la formación de un enlace glicosídico entre el oxhidrilo en el carbono 1 del extremo reductor de un octasacárido entrante y el oxidrilo en posición 4 del cuarto resto glicosídico de otra unidad repetitiva. A este proceso varias veces repetido se lo denomina polimerización y la adición de muchas unidades repetitivas ( $\approx 2000$ ) da como producto final el polisacárido: estaría mediado por una enzima o complejo

enzimático que por el momento se lo ha llamado "polimerasa". No se investigó la forma en que se produce la polimerización, por ejemplo, si las nuevas unidades repetitivas se agregan en el extremo reductor o en el no reductor de la cadena naciente.

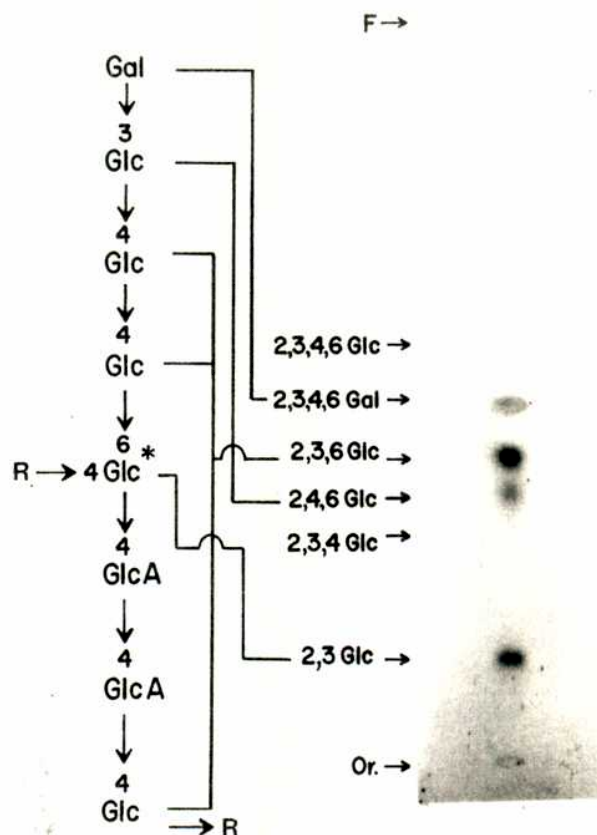


Fig.24: Análisis por TLC de los productos de permethylación del exopolisacárido con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  obtenido *in vitro* a partir de incubaciones en presencia de  $\text{UDP}[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  y preparados enzimáticos de la cepa 8002.

Una muestra del EPS marcada radioactivamente en glucosa fue permethylada, hidrolizada y los productos cromatografiados en TLC con el solvente H, (Materiales y Métodos). A la izquierda de la figura se presenta la estructura propuesta para este EPS. Nótese que la cuarta glucosa marcada con un asterisco (\*), es el resto glicosídico que brinda su cuarto oxhidrilo para establecer la unión glicosídica entre las diferentes unidades repetitivas del EPS. Por lo tanto éste resto glicosídico tiene un derivado dimetilado a diferencia de cuando se encuentra en la unidad repetitiva libre que presenta un derivado trimetilado (Ver Fig.22). Or, origen de siembra, F, frente del solvente.

#### IV.2.a.2.vi. INCORPORACION DE [ $^{14}\text{C}$ ]ACETILO A EXTRACTO 1203 A PARTIR DE [ $^{14}\text{C}$ ]ACETIL-CoA.

A raíz de los resultados obtenidos anteriormente en este trabajo, que sugieren la presencia de un grupo O-acetilo ubicado en alguno de los dos primeros restos glicosídicos del extremo reductor de la unidad repetitiva, y de datos de bibliografía (Fig.1) que indican la existencia de un resto O-acetilo en posición 3 del segundo resto glicosídico (ácido glucurónico) (Canter Cremers *et al.*, 1991b) o en la glucosa (Kuo y Mort, 1986), pareció interesante investigar la incorporación de acetato marcado a diferentes intermediarios de biosíntesis y al polisacárido final, a partir de incubaciones realizadas en presencia de [ $^{14}\text{C}$ ]acetil CoA.

Para esto se utilizaron preparados enzimáticos de las tres cepas, 8002, 8401 y 8401 pRL1JI y se realizaron incubaciones estándares en presencia de [ $^{14}\text{C}$ ]acetil CoA, UDPGlc y UDPGlcA no marcados (Materiales y Métodos).

En los tres casos se observaron buenas incorporaciones de radioactividad a extracto 1203 (cepa 8002: 24.800 cpm; cepa 8401: 30.700 cpm y cepa 8401 pRL1JI: 27.900 cpm), comparables con lo obtenido en incubaciones realizadas en presencia de UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc ó UDP[ $^{14}\text{C}$ ]GlcA. Los Extractos 1203 de cada cepa se sometieron a tratamiento ácido débil y posterior electroforesis en papel con el solvente A. Como se puede observar, el resto acetilo se incorporó a los tres picos clásicos de las zonas "a", "b" y "c" (Fig.25 C).

Análisis de estos compuestos por filtración en columna de Bio-Gel P2 y cromatografía en papel, indicaron que en todos los casos el acetato se incorporó tanto a nivel de octasacárido como de trisacárido (No mostrado). Este material no se analizó en mayor detalle, pero confirma la presencia del grupo O-acetilo en estos compuestos. Idénticos resultados se obtuvieron en trabajos anteriores realizados con la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NA-30 (J.C. Bossio, Tesis Doctoral).

#### IV.2.a.2.vii. INCORPORACION DE [ $^{14}\text{C}$ ]ACETILO A POLIMERO A PARTIR DE INCUBACIONES EN PRESENCIA DE [ $^{14}\text{C}$ ]ACETIL-CoA.

Al analizar los sobrenadantes de incubación del ensayo anterior, en estas tres cepas (8002, 8401, 8401 pRL1JI), por filtración en columnas de Bio-Gel A-5m, se observó en todos los casos la formación de polimero marcado radioactivamente en [ $^{14}\text{C}$ ]acetilo, indicando que éste probablemente se sintetizó a partir de la polimerización de unidades repetitivas previamente acetiladas, como era esperable (Fig.28 B).

#### IV.2.a.2.viii. EFECTO DEL ACETIL-CoA Y DEL PEP EN EXCESO

Estudios previos (No publicados) realizados en nuestro laboratorio sobre la síntesis de xantano con el sistema de *Xanthomonas campestris*, indicaron que los dadores no glicosídicos, acetil-CoA y PEP, inhibían parcialmente la polimerización (Ielpi y Dankert, resultados no publicados). Este tipo de análisis se ha extendido ahora a las tres cepas de *Rhizobium* en estudio: *Rhizobium leguminosarum* 8401, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* 8002 y *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 8401 pRL1JI. Por esto, se continuó investigando el efecto que causa la adición en exceso de los dadores de acetilos y cetil-piruvatos, Acetil-CoA y fosfoenolpiruvato (PEP), respectivamente, sobre la incorporación de diferentes azúcares a nivel de lípido intermediario y en el proceso de polimerización.

Se utilizó UDP[<sup>14</sup>C]GlcA como precursor marcado y se investigó la incorporación de radioactividad tanto a "Extracto 1203" como a polímeros.

#### -EFECTO DEL ACETIL-CoA

Los resultados se resumen en la Tabla VI. En ninguna de las tres cepas el agregado de Acetil-CoA afectó mayormente la incorporación de [<sup>14</sup>C]GlcA a "Extracto 1203". Análisis de estos extractos por electroforesis en papel, luego de ser sometidos a hidrólisis ácida suave mostraron idénticos perfiles con o sin agregado de Acetil-CoA. En la Fig. 25 se muestran los resultados para las cepas 8002, 8401 y 8401 pRL1JI, en ausencia (panel A) y en presencia de Acetil-CoA (panel B).

Los picos X, de la Fig. 25 A y B resultaron ser una mezcla de ésteres fosfóricos de tri y de octasacáridos dipiruvilados, formados por degradación accidental de los respectivos prenil-difosfato derivados (No mostrado).

Por otra parte, al analizar el pico c<sub>1</sub>' con marca en [<sup>14</sup>C]GlcA de la cepa 8002 en ausencia (Fig.25 A) y en presencia de acetil-CoA en exceso (Fig.25 B) por filtración por Bio-Gel P2, que separa al octasacárido dipiruvilado (compuesto c<sub>1</sub>) del trisacárido (compuesto d<sub>1</sub>), se observó que la cantidad del primero disminuía significativamente en comparación con el segundo cuando se obtenían en presencia del dador de acetato, Acetil-CoA (Fig. 26 A y B, respectivamente). Este fenómeno también se observó en las restantes cepas (No mostrado).

Tabla VI

*Efecto de los dadores no glicosídicos sobre el proceso de polimerización.*

Cepa	Dador no glicosídico		Incorporación de radioactividad ( cpm / mg de proteínas )	
	Acetil-CoA ( $\mu$ M )	PEP ( $\mu$ M )	Fracc.1 ( EPS )	Fracc.2 ( Extracto 1203 )
<i>R. l. br. phaseoli</i>				
1) 8002			1.200	28.780
	350		< 100	27.880
2) 8401			2.000	57.260
	350		< 100	60.120
<i>R. l. br. viciae</i>				
3) 8401 pRL1JI			1.800	55.700
	312		< 100	45.560
	1250		< 100	56.300
		312	< 100	65.000
		1250	< 100	57.900

Se realizaron incubaciones estándares utilizando UDP[<sup>14</sup>C]GlcA como marcador y en presencia de UDPGlc no radioactivo, con células tratadas con EDTA de las cepas mencionadas en cada caso, en presencia, o no, de Acetil-CoA o Fosfo-enol-piruvato ( PEP ), en las concentraciones indicadas, a 20 ° C y durante 60 minutos. Las incubaciones se inactivaron con agregado de un exceso de EDTA como de costumbre y luego se procesaron de manera estándar como se indica en Materiales y Métodos para la obtención de las diferentes fracciones de extracción.

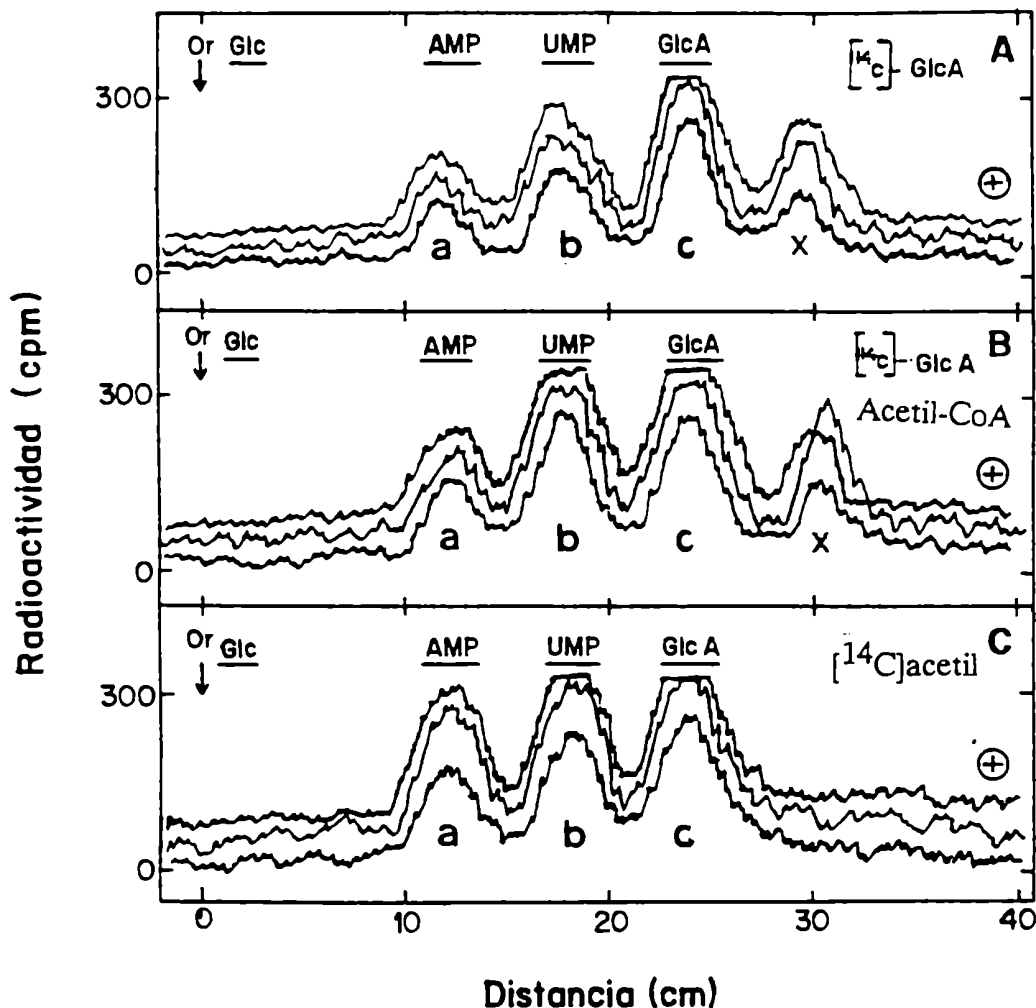
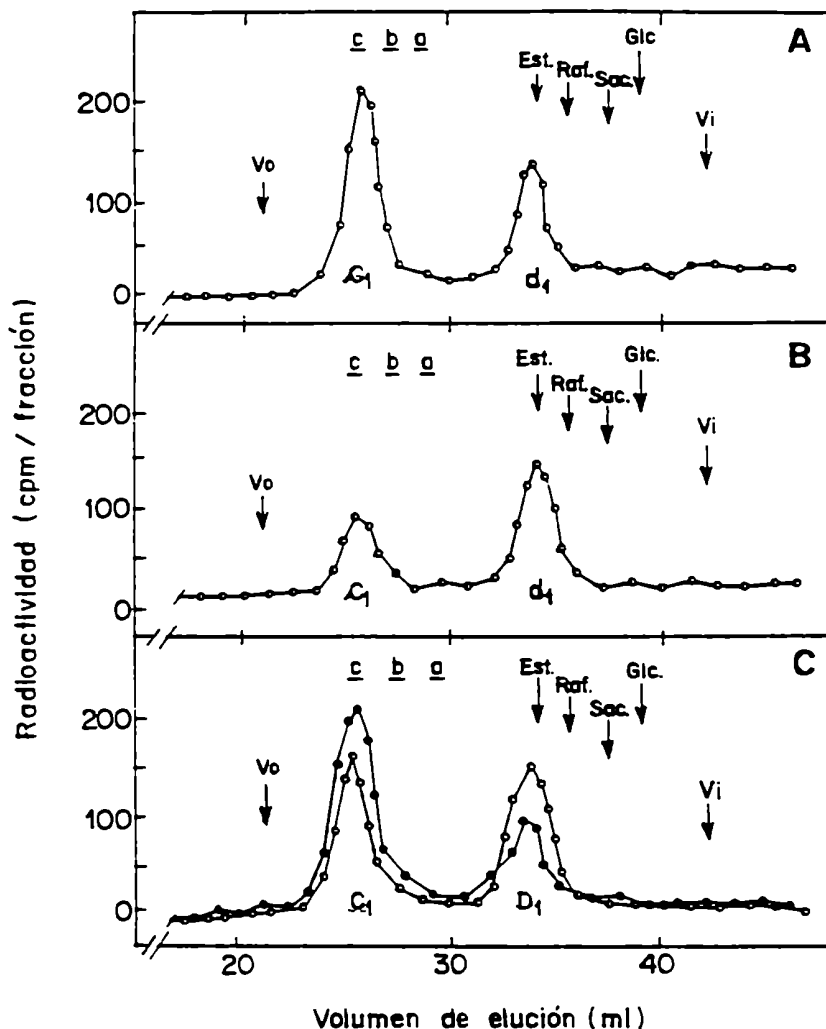


Fig.25: Análisis de los extractos 1203 obtenidos con células de las cepas 8002, 8401 y 8401 pRL1J1 tratadas con EDTA en incubaciones realizadas en presencia de Acetil-CoA en exceso y en incubaciones llevadas a cabo en presencia de  $[^{14}\text{C}]$ acetyl-CoA como precursor radioactivo. Alícuotas de los extractos 1203 obtenidos como se describe en la Tabla VI, se trataron en condiciones ácidas débiles y se sometieron a electroforesis en papel con el solvente A. Panel (A), incubación estándar, en presencia de  $\text{UDP}[^{14}\text{C}]\text{GlcA} + \text{UDPGlc}$  no radioactiva: cepa 8002 (12.300 cpm) (línea superior), cepa 8401 (11.460 cpm) (línea media) y cepa 8401 pRL1J1 (9.200 cpm) (línea inferior); Panel B, idem A pero en presencia de acetyl-CoA no radioactivo ( $350 \mu\text{M}$ ): cepa 8002 (14.800 cpm) (línea superior), cepa 8401 pRL1J1 (10.600 cpm) y cepa 8401 (8.400 cpm) (línea inferior); Panel C, incubación estándar en presencia de  $[^{14}\text{C}]\text{acetyl-CoA}$  y  $\text{UDPGlc} + \text{UDPGlcA}$  no radioactivos (Materiales y Métodos): cepa 8002 (16.800 cpm) (línea superior), cepa 8401 (14.500 cpm) (línea media) y cepa 8401 pRL1J1 (6.700 cpm) (línea inferior). Estándares internos: Glc, glucosa; GlcA, ácido glucurónico; AMP y UMP.



**Fig.26:** Efecto del acetil-CoA y del PEP en exceso sobre la formación de octasacárido dipiruvilado. Filtración por Bio-Gel P2 de los compuestos de la zona "c" de electroforesis en papel.

Los compuestos con movilidad electroforética en la zona "c", mostrados en las Fig. 25 A, B y Fig.29 A, B, con marca en [ $^{14}$ C]GlcA se eluyeron del papel y se filtraron individualmente por una columna de Bio-Gel P2, (Ver Materiales y Métodos). Panel (A), cepa 8002 (Fig.25, A, pico c1') (9.200 cpm) obtenido en ausencia de acetil-CoA; (B), cepa 8002 (Fig.25, B, pico c1', 3.000 cpm) en presencia de exceso de acetil-CoA; (C), cepa 8401 pRL1JI (Fig.29, A, pico C1') en ausencia de PEP (4.000 cpm) (O-O); (Fig.29, B, pico C1') en presencia de exceso PEP (1250  $\mu$ M) (3.800 cpm) (●-●). Los estándares utilizados son los mismos descriptos para la Fig.5.

Se investigó, además, el grado de acetilación del trisacárido d1 en ambos casos, obtenido con la cepa 8002. La cromatografía en el solvente D produjo idéntico perfil tanto en presencia (Fig.27 A) como en ausencia de Acetil-CoA (Fig.27 B): un compuesto en el origen de siembra ( $d_{1a}$ ) correspondiente al trisacárido  $\text{GlcA} \rightarrow 4\text{GlcA} \rightarrow 4\text{Glc}$ , y otro de movilidad intermedia entre M5 y M6 ( $d_{1b}$ ) correspondiente a su derivado acetilado anteriormente descrito. Tratamiento alcalino suave del



derivado acetilado ( $d_{1b}$ ) produjo el desacetilado ( $d_{1a}$ ) (Fig.27 C, línea superior). Naturalmente, igual tratamiento al producto obtenido en presencia de exceso de Acetil-CoA también produjo el componente ( $d_{1a}$ ) (Fig.27 C, línea inferior).

Con los trisacáridos D y D<sub>1</sub> de las cepas 8002 y 8401 pRL1JI, respectivamente, se observaron análogos perfiles cromatográficos, tanto obtenidos en ausencia como en presencia de exceso de Acetil-CoA (No mostrado).

En otras palabras, el exceso de Acetil-CoA en ningún caso aumentó la acetilación de los trisacáridos. Aparentemente el exceso de este metabolito actuaría inhibiendo la síntesis del octasacárido a un nivel diferente.

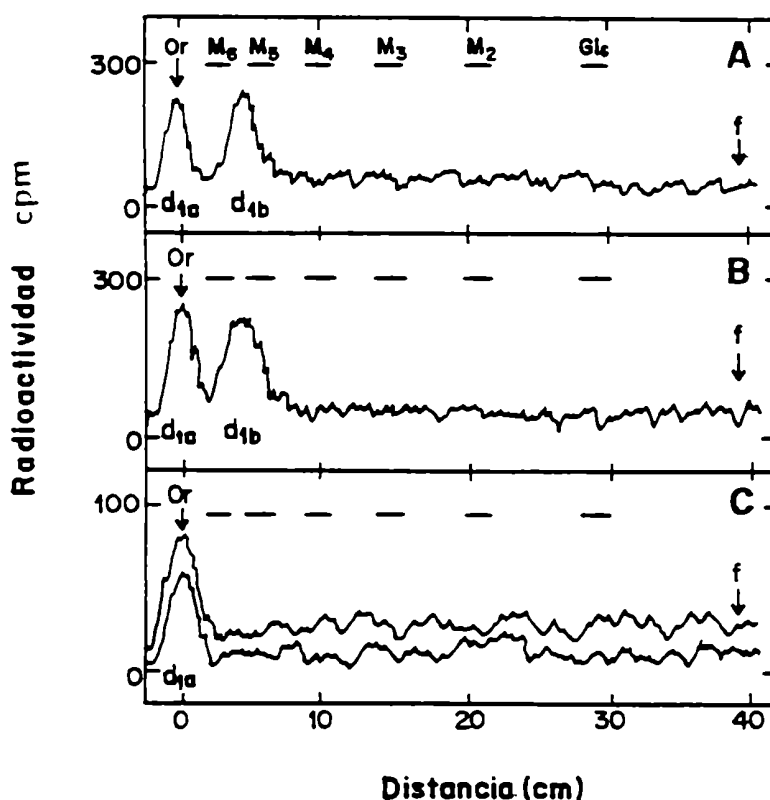


Fig.27: Análisis de los trisacáridos  $d_1$  obtenidos tanto en presencia como en ausencia de Acetil-CoA.

Los trisacáridos  $d_1$  obtenidos con la cepa 8002 con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$  aislados por filtración en Bio-Gel P2 (Fig.26, A y B) se cromatografiaron en papel con el solvente D. Panel (A), compuesto  $d_1$  obtenido en ausencia de acetil-CoA (de la Fig.26 A) (4.000 cpm); (B), compuesto  $d_1$  obtenido en presencia de acetil-CoA (de la Fig.26, B) (2.100 cpm) y (C), los compuestos  $d_{1b}$  de esta figura, paneles A y B, se eluyeron del papel y se trataron en condiciones alcalinas débiles (Ver Materiales y Métodos) y se cromatografiaron en este mismo sistema. Aproximadamente 1.000 cpm c/u;  $d_{1b}$  (de A) línea superior y  $d_{1b}$  (de B), línea inferior. Como estándares internos se utilizaron glucosa (Glc) y maltooligosacáridos (M2, M3, M4, M5, M6).

Con respecto a la incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA a polímero, con todas las cepas se observó inhibición en presencia de exceso de acetyl-CoA (Tabla VI). El perfil obtenido por filtración a través de Bio-Gel A-5m del sobrenadante de incubación dializado se muestra en la Fig. 28 A para el caso de la cepa: 8002. Con las cepas 8401 y 8401 pRL1JI los perfiles obtenidos fueron semejantes (No mostrados).

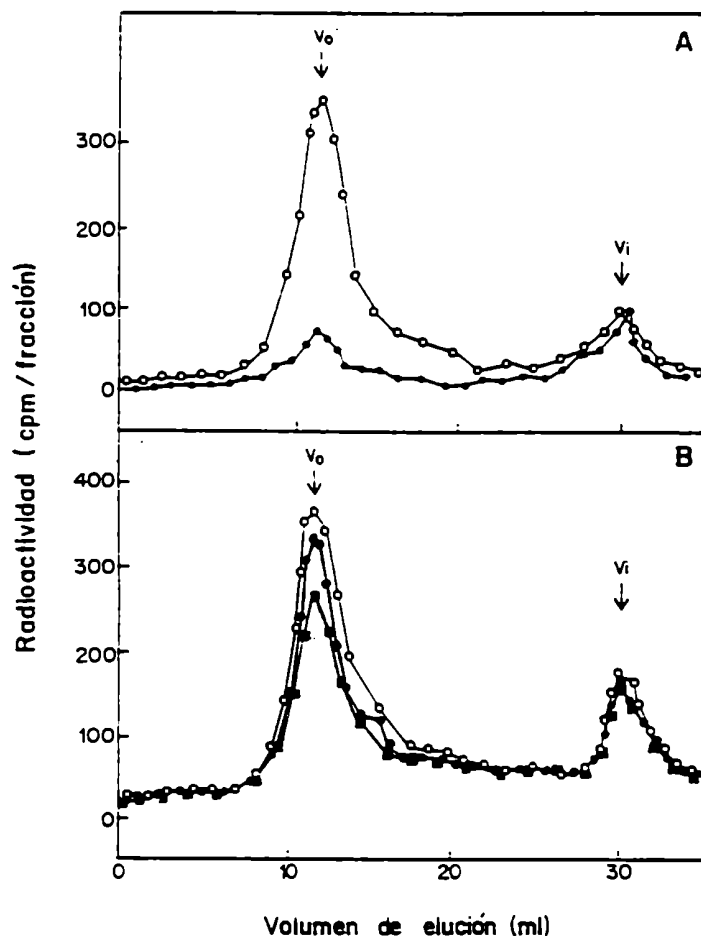


Fig.28: Síntesis de polímero con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]acetyl y efecto del acetyl-CoA en exceso sobre la formación de polímero.

Panel A, Cromatografía en columna de Bio-Gel A-5m de los sobrenadantes de incubaciones de la cepa 8002 obtenidos en incubaciones estándar a partir de UDP[ $^{14}\text{C}$ ]GlcA y UDPGlc no radioactivo y en ausencia de acetyl-CoA (5.600 cpm) (○) y en presencia de 350  $\mu\text{M}$  de acetyl-CoA (●). Los sobrenadantes se procesaron y filtraron como se describe en Materiales y Métodos.

Panel B, idéntico al anterior pero obtenido en incubaciones en presencia de [ $^{14}\text{C}$ ]acetyl-CoA y de UDPGlcA y UDPGlc no radioactivos, cepa 8002 (3.700 cpm) (○), cepa 8401 (2.760 cpm) (●) y cepa 8401 pRL1JI (1.800 cpm) (■).

Estándares: azul dextrano y glucosa, usados como marcadores de volumen de exclusión ( $V_0$ ) e inclusión total ( $V_i$ ), respectivamente.

### -EFECTO DEL PEP EN EXCESO

Como se observara en ensayos anteriores, la unidad repetitiva obtenida por biosíntesis *in vitro* con las tres cepas ( $c_1$ , C y  $C_1$ , de las cepas 8002, 8401 y 8401 pRL1JI, respectivamente) presenta dos restos cetil piruvatos (Fig.1). En trabajos anteriores realizados con la cepa *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* NA-30, se observó que los restos cetil piruvatos se transferían a la unidad repetitiva (a) a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]PEP (J.C. Bossio, Tesis Doctoral) previamente descrito como dador fisiológico de restos cetil piruvatos (Ielpi *et al.*, 1981b). No obstante no se realizó este tipo de ensayo en este trabajo, sino que se probó el efecto que producía el exceso de PEP no marcado en la biosíntesis del EPS.

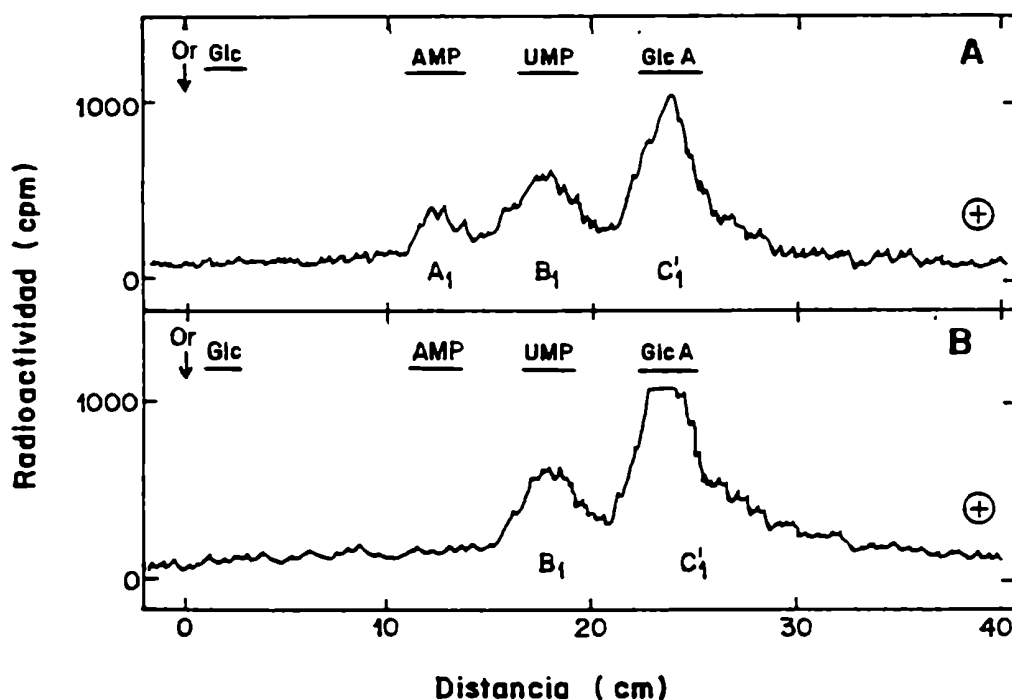


Fig.29: Análisis de los extractos 1203 obtenidos de incubaciones en presencia de PEP, con la cepa 8401 pRL1JI.

Los extractos 1203, con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA, obtenidos como se describe en la Tabla VI, se sometieron a electroforesis en papel con el solvente A luego de ser tratados en condiciones ácidas débiles. Los paneles A y B muestran los perfiles obtenidos en ausencia (50.000 cpm) o en presencia de PEP (1250  $\mu\text{M}$ ) (52.000 cpm), respectivamente. Se utilizaron los estándares como se describe en la Fig.25.

El efecto de exceso de PEP en la mezcla de incubación se estudió sólo con la cepa 8401 pRL1JI. No se alteró mayormente la incorporación al "Extracto 1203" por el agregado de concentraciones crecientes de PEP (Tabla VI). El perfil

electroforético en cambio indicó un aumento del componente C<sub>1</sub>' (trisacárido y octasacárido dipiruvilado) a expensas del A<sub>1</sub> (octasacárido) (Fig.29).

Filtración por Bio-Gel P2 mostró que, como era de esperar, en presencia de exceso de PEP había aumentado la cantidad relativa de octasacárido dipiruvilado (Componente C<sub>1</sub>) con respecto al trisacárido (Componente D<sub>1</sub>) (Fig. 26 C).

También se observó inhibición en la síntesis de polímero con exceso de PEP (Tabla VI) para el caso de la cepa 8401 pRL1JI. Los perfiles cromatográficos son similares a los vistos con el efecto del Acetil-CoA (No mostrado). Estos resultados confirman lo observado previamente con el sistema de *Xanthomonas campestris* (Ielpi y Dankert, resultados no publicados).

#### **IV.2.a.2.ix. LIPIDO-OCTASACARIDO COMO INTERMEDIARIO EN LA SINTESIS DEL EPS**

##### **-ENSAYO DE INCUBACION EN DOS ETAPAS**

Uno de los principales objetivos de este trabajo era demostrar la participación de los prenil-fosfo-azúcares como potenciales intermediarios en la biosíntesis de los EPS complejos. Para demostrar ésto, se diseñó un ensayo de incubación que consistió en dos etapas (Ver Materiales y Métodos). La primera etapa era una incubación similar a la ya utilizada en los ensayos descriptos. Células tratadas con EDTA se incubaron en presencia de nucleótido-azúcares marcados, en este caso UDP[<sup>14</sup>C]GlcA y UDPGlc no radioactivo y Mg<sup>2+</sup>, a 10°C, durante 30 minutos. La reacción se detuvo por el agregado de exceso de EDTA y las células fueron lavadas tres veces con buffer Tris-HCl 70 mM para eliminar todos los nucleótido-azúcares que no reaccionaron durante la primera incubación. Luego el pellet celular fue resuspendido en 100 µl del mismo buffer. La mitad de las células se extrajeron con solvente 1203 para obtener el primer "Extracto 1203". La otra mitad se reincubó a 20°C, en presencia de Mg<sup>2+</sup> durante 2 horas, para permitir la polimerización de los intermediarios formados en la primer incubación. Luego la reacción se detuvo con exceso de EDTA y las células se procesaron de igual manera que en la 1ª etapa, obteniéndose 2 fracciones más: un segundo sobrenadante de incubación y un segundo "Extracto 1203". Los sobrenadantes de la primera y segunda etapa fueron filtrados independientemente a través de una columna de Bio-Gel A-5m, para detectar el polímero sintetizado *in vitro*. Si el EPS fuera detectado luego de esta segunda incubación, significaría que sólo pudo ser formado a partir de los prenil-difosfato octasacáridos preexistentes (unidades repetitivas) acumuladas

Tabla VII: *Incubación en dos etapas utilizando preparados enzimáticos de las cepas 8002, 8401 y 8401 pRL1JI.*

En todos los casos se utilizaron células tratadas con EDTA como preparado enzimático y se llevaron a cabo los ensayos de incubación en dos etapas como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]GlcA y UDPGlc no radioactiva en las cantidades estándares indicadas. Luego de la incubación se obtuvieron cuatro fracciones, Fracciones 1 y 3 que corresponden a los sobrenadantes de incubación de la primera y segunda etapa respectivamente y de igual manera las Fracciones 2 y 4 que corresponden a los Extractos 1203 de la primera y segunda etapa respectivamente.

Cepa	Incorporación de radioactividad ( cpm totales / mg de proteína. )		
	Sobrenadante de incubación*		Extracto 1203
	EPS[ <sup>14</sup> C]GlcA	Unidad rep.	
<b>1ra Etapa: 30 min., 10° C</b>	<b>Fracción 1</b>		<b>Fracción 2</b>
8002	2.750		35.000
8401	4.300		49.400
8401 pRL1JI	3.800		58.100
<b>2da Etapa: 120 min., 20° C</b>	<b>Fracción 3</b>		<b>Fracción 4</b>
8002	2.480	1.800	29.800
8401	3.900	1.550	42.180
8401 pRL1JI	2.830	1.200	53.230

\* Los sobrenadantes de incubación combinados con los lavados acuosos se analizaron de la siguiente manera: la Fracción 1, se trató en cada caso con ácido débil ( 0,001 N HCl, pH 2, 100° C, 10 min.) y luego se dializó como se describe en Materiales y Métodos. El material dializado se filtró a través de una columna de Bio-Gel A 5m y el compuesto radioactivo que salió en el volumen de exclusión total se consideró EPS, se cuantificó el pico y es el valor en cpm que figura en cada caso en la Fracción 1. La Fracción 3 se filtró directamente en el mismo sistema obteniéndose dos picos, uno de EPS y otro en el volumen de inclusión total que se caracterizó posteriormente como la unidad repetitiva completa, también liberada al medio de incubación. Los Extractos 1203, Fracciones 2 y 4, se expresan en cpm totales.

durante la 1<sup>º</sup> etapa, ya que no hubo nucleótido-azúcares presentes durante la segunda incubación.

Los resultados de la Tabla VII, muestran que hubo transferencia de radioactividad a los "Extracto 1203" y a polímero en la 1<sup>º</sup> etapa de incubación. En la 2<sup>º</sup> incubación, en cambio, la incorporación a polímero se hizo a expensas de la fracción 1203. Este resultado, observado también con las restantes cepas en estudio, confirmó la hipótesis inicial: los prenil-fosfo-azúcares son intermediarios, y en cierto modo también precursores, del EPS final (Tabla VII).

Con las tres cepas se observó también liberación de unidades repetitivas aisladas (Tabla VII). Este fenómeno ya había sido observado en estudios previos de síntesis *in vitro* del xantano (Ielpi *et al.*, 1993) y también *in vivo* (Ielpi y Dankert, resultados no publicados).

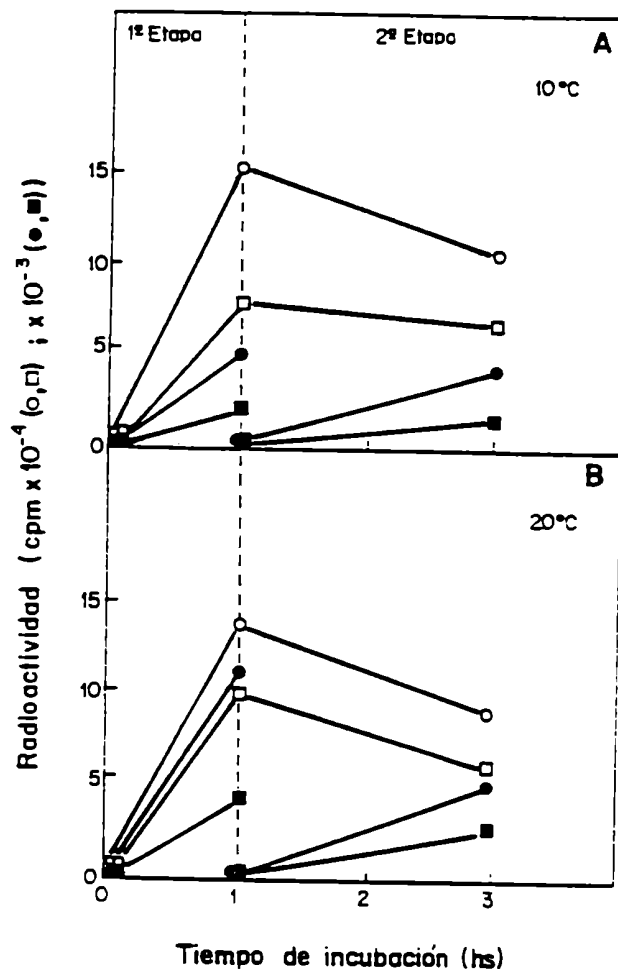
#### **IV.2.a.2.x. VARIABLES QUE AFECTAN EL PROCESO DE POLIMERIZACION**

##### **-TEMPERATURA DE INCUBACION Y CONDICIONES DE AEREACION DURANTE EL CULTIVO DE LAS CELULAS**

En esta última parte se estudió el efecto de la temperatura de incubación (10° y 20°C) sobre la incorporación de radioactividad a extractos 1203 y a polímero, así como el efecto de la mayor o menor aereación de los cultivos utilizados para preparar las células tratadas con EDTA. Esto último se logró llenando el frasco de Erlenmeyer utilizado con medio de cultivo en relación 1/10 o 1/5 de su volumen total, respectivamente. Se trabajó con la cepa 8401 y con UDP[<sup>14</sup>C]GlcA como marcador. Por otra parte, para tener la certeza de que los precursores directos del polímero son prenilfosfo-azúcares, estos estudios se desarrollaron haciendo incubaciones en dos etapas.

En la primera incubación, tanto a 10° como a 20°C, las incorporaciones a extractos 1203 fueron comparables, pero preparados obtenidos de células cultivadas con mayor aereación incorporaron más radioactividad (Fig. 30, círculos blancos) que las obtenidas en menor aereación (Fig. 30, cuadrados blancos).

La formación de polímero también fue mayor con preparados de células más aereadas (Fig. 30, círculos negros), especialmente en incubaciones a 20°C (Fig. 30, B, círculos negros) que con las menos aereadas, a ambas temperaturas (Fig. 30, cuadrados negros).



**Fig.30: Incubación en dos etapas con preparados enzimáticos de la cepa 8401, obtenidos con diferente aereación e incubadas a 10 y 20 °C.**  
 La cepa 8401 se cultivó con agitación circular (200 rpm) en Erlenmeyer de 500 ml de capacidad, que contenían 50 ml (alta aereación: 1:10) o 100 ml (baja aereación: 1:5) de medio de cultivo. Con las células obtenidas se hicieron preparados enzimáticos con EDTA. Se realizaron incubaciones en dos etapas usando UDP[<sup>14</sup>C]GlcA como dador marcado, tanto a 10 como a 20 °C. Los sobrenadantes y lavados acuosos se combinaron (Fracción 1) y se estudió la presencia de polímero formado en cada caso como se indica en Materiales y Métodos. Los precipitados de células se resuspendieron y se dividieron en dos alíquotas, una se extrajo con solvente 1203 (extracto 1203= Fracción 2), quedando un precipitado de células (Fracción 3). La otra alíquota se reincubó, a 10 o 20 °C según se indique en cada caso, durante 2 horas (segunda etapa). Se obtuvo un segundo sobrenadante acuoso (Fracción 4), un extracto 1203 (Fracción 5) y un segundo precipitado de células (Fracción 6). Ambas incubaciones se realizaron a 10 °C (A) ó a 20 °C (B). Se midió extracto 1203 (-O-O-O-) y polímero (-●-●-●-) tanto en células aereadas (relación 1:10), como células poco aereadas (relación 1:5) (extracto 1203, -□-□-; polímero, -■-■-).

En la segunda etapa de incubación, realizada siempre a la misma temperatura que la primera, los resultados fueron similares. Con las células más aereadas la formación de polímero fue evidente y mayor a 20°C que a 10°C (Fig. 30, círculos negros).

La caída de material extraíble con solvente 1203 fue similar entre 20°C y 10°C (Fig. 30, círculos blancos).

En las células menos aereadas la formación de polímero en la segunda etapa también fue mayor a 20 que a 10°C (Fig. 30, cuadrados negros), pero inferior a lo observado con las más aereadas (Fig.30, círculos negros); y la caída de extracto 1203 fue también mayor a 20°C (Fig. 30, cuadrados blancos).

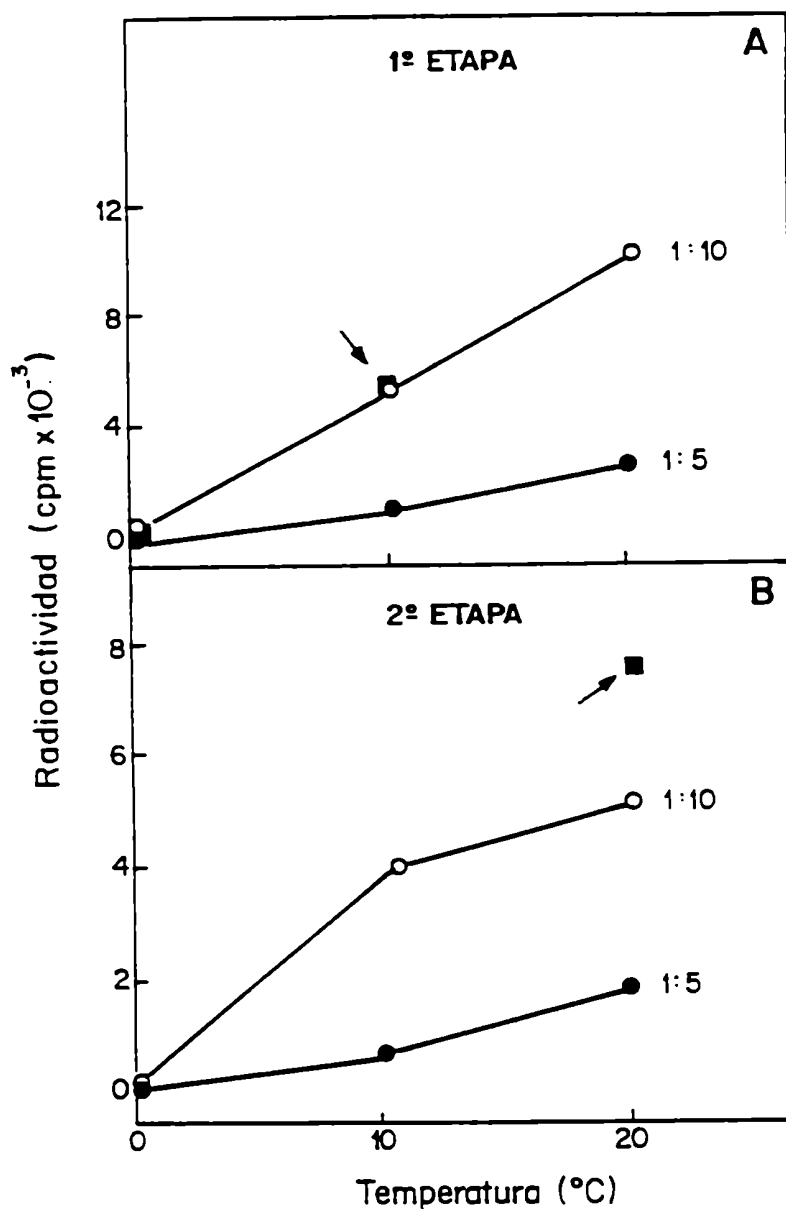
En incubaciones realizadas a 0°C la formación de polímero fue nula en todos los casos.

Parte de estos resultados se pueden presentar de otra manera (Fig. 31), en donde se ve en forma más clara la dependencia que la formación de polímero tiene con la temperatura, tanto con células con más o con menos aereación (1:10 y 1:5, respectivamente) como en la primera o en la segunda incubación (Fig. 31).

Este efecto de la temperatura es todavía más evidente con las células más aereadas al hacer la primer incubación a 10°C (Fig. 31, A, cuadrado negro, destacado con la flecha) y la segunda a 20°C (Fig. 31 B, cuadrado negro, destacado con la flecha): la formación de polímero en la 2ª etapa es mayor que cuando las dos incubaciones se realizan a 10 ó a 20°C.

Una posible explicación es que si bien la formación de material extraíble con 1203 es relativamente independiente de la temperatura, especialmente con las células más aereadas (Fig. 31), y que a 20°C las enzimas polimerizantes son más activas, la degradación de éstas durante la 1ª incubación debe ser mayor a temperaturas altas.





**Fig.31:** Dependencia de las condiciones de oxigenación durante el cultivo de las células de la cepa 8401 y de la temperatura de incubación *in vitro*, en la producción de exopolisacárido (EPS).

Los valores y las condiciones de incubación son las descritas en la Fig.30. EPS obtenido con células muy aereadas (1:10) (-O-O-). EPS obtenido con células menos aereadas (1:5) (-●-●-). En un experimento análogo con células muy aereadas (1:10), la primera etapa se realizó a 10°C, (EPS formado=■ y flecha, panel A) y la segunda etapa a 20°C, (EPS formado=■ y flecha, panel B).

### -EFECTO DE LA EDAD DE LOS PREPARADOS ENZIMATICOS

Finalmente se estudió el efecto de la edad del preparado enzimático sobre su capacidad para producir polímero y material extraíble con solvente 1203. Se utilizó la cepa 8401 cultivada con buena aereación (1:10). Se observó que la radioactividad incorporada a 1203 por un preparado enzimático fresco aumentaba gradualmente con la edad del preparado hasta llegar a más del doble, a los 12 días (Fig. 32).

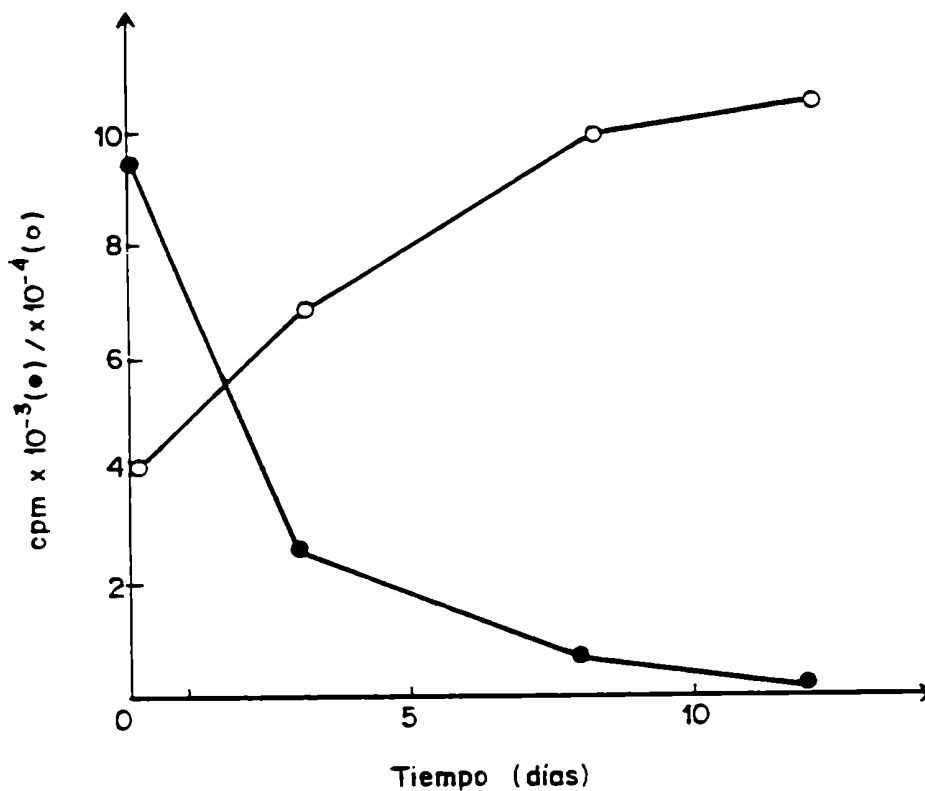


Fig.32: Producción de EPS y de material soluble en el extracto 1203 en función de la edad de los preparados enzimáticos.

Se trabajó con células de la cepa 8401 cultivadas con buena aereación (1:10), tratadas con EDTA y conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En los preparados frescos y en los tiempos indicados se hicieron incubaciones estándar en presencia de  $\text{UDPGlc}$ ,  $\text{UDP}[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$  y  $\text{Mg}^{++}$  a  $20^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos. Extracto 1203: -○-○-; Exopolisacárido: -●-●-. Cada punto se determinó con 0,4 mg de proteínas y los resultados se expresan en cpm/mg de proteína (Ver diferencia de escalas).

Contrariamente, la formación de polímero resultó máxima con enzima recién preparada, decayendo rápidamente hasta ser prácticamente nula a los 12 días (Fig. 32). Estos resultados confirman la mayor labilidad o inestabilidad de las enzimas polimerizantes, ya observada en las incubaciones en dos etapas (Fig. 30). El aumento de incorporación a 1203 con la edad del preparado posiblemente se deba a una mayor permeabilidad de la pared celular, causada por lisis parcial de la misma.

Las enzimas responsables de la síntesis de la unidad repetitiva asociada al poliprenol serían relativamente más estables hasta llegar a un equilibrio permeación/inactivación a los 10-12 días de preparar las células tratadas con EDTA y conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

≈ O ≈

### IV.2.a.3. UTILIZACION DE CELULAS ELECTROPORADAS

La técnica de electroporación ha sido utilizada en los últimos años para posibilitar la entrada de fragmentos de DNA a distintas células sin causar daño, pues la mayoría permanecen viables (Potter, 1988). Consiste básicamente en facilitar el ingreso de sustancias cargadas eléctricamente mediante una descarga de alto voltaje y de duración muy breve (en el orden de los microsegundos).

La presencia del fragmento, o plásmido, de DNA se detecta por la expresión fenotípica de la información genética que codifica, a través de las sucesivas generaciones de células.

En esta parte del trabajo se describe la aplicación de éste método para introducir un sustrato, que normalmente no lo haría, al interior de la célula. Consiste en electroporar células para permeabilizarlas y usarlas de esta manera como preparado enzimático (Materiales y Métodos). Como los daños producidos al sistema celular son mínimos, se consigue obtener un sistema *in vitro* que reproduce casi exactamente las condiciones *in vivo*; y de esta manera se ha logrado que toda la vía metabólica de síntesis de EPS funcione completamente. Se ha extendido este estudio a otros géneros de bacterias relacionados (Ver Tabla I) que confirman la efectividad del método. De esta manera se ha ampliado la lista de sistemas en donde ahora la biosíntesis de EPS completa es posible. En la Discusión final (sección V) comentaremos sobre la utilización de este método en otros estudios relacionados con la introducción de moléculas dentro de células que no ingresarían por mecanismos naturales.

#### IV.2.a.3.i. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA MUTANTE RW4 EPS<sup>-</sup> DE *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*

*R. l. bv. phaseoli* RW4 es una mutante derivada de la cepa silvestre 8002, defectiva en la síntesis de EPS (EPS<sup>-</sup>), no mucoide (Ver Fig. 2 B), obtenida por mutagénesis con el transposón Tn5 (Borthakur *et al.*, 1988).

Con el objeto de caracterizarla bioquímicamente, originalmente se trató de estudiar la transferencia de radioactividad a diferentes extractos a partir de incubaciones realizadas en presencia tanto de UDP[<sup>14</sup>C]GlcA y UDPGlc ó UDP[<sup>14</sup>C]Glc y UDPGlcA, utilizando células tratadas con EDTA como preparado enzimático.

No se obtuvieron buenas incorporaciones de radioactividad a extracto 1203 (No mostrado). Los productos analizados en estos casos no nos permitieron ver con demasiada claridad de qué compuestos se trataba. Un sólo compuesto fue detectado

con claridad al incubar en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]Glc, el glucano cíclico  $\beta(1-2)$ , previamente visto en la cepa silvestre 8002.

A raíz de estos resultados negativos, se llevaron a cabo experimentos similares pero utilizando células electroporadas de la cepa RW4 como preparado enzimático. También se realizó un ensayo en paralelo con la cepa silvestre 8002 y la silvestre NA-30 con el doble propósito de ver de que manera se comportaban en este sistema y como medida de comparación con la cepa mutante RW4. En la Tabla VIII se presentan los resultados de las incorporaciones de radioactividad tanto a la Fracción 1 (EPS); como a la Fracción 2 (Extracto 1203) y Fracción 3 (Precipitado final de células). Se pudo observar que las cepas silvestres 8002 y NA-30 sintetizaban una cantidad extremadamente grande de polímero *in vitro* en contraste con lo sintetizado con el sistema de células tratadas con EDTA (Ver Tabla IV). La cepa RW4 como era de esperar no incorporó radioactividad a esta fracción tanto con marca en [<sup>14</sup>C]GlcA como en [<sup>14</sup>C]Glc. En cuanto a la incorporación de radioactividad a extractos 1203, también en este caso las cepas silvestres 8002 y NA-30 demostraron ser muy eficientes comparadas nuevamente con las incorporaciones observadas con el sistema de células tratadas con EDTA. También hubo una cantidad considerable de radioactividad incorporada a este extracto en el caso de los ensayos en los que se usó la cepa RW4 (Tabla VIII). Esta cantidad de radioactividad nos permitió seguir trabajando en la caracterización de esos compuestos formados.

### **-ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS INCORPORADOS**

Primeramente, al analizar los productos de incorporación al extracto 1203 de la cepa silvestre 8002 se observó, por electroforesis en papel, filtración en geles (Bio-Gel P2) y cromatografías en papel, que se trataba de los mismos compuestos previamente descritos en la primera parte de este trabajo utilizando células tratadas con EDTA. Un octasacárido a<sub>1</sub> y su derivado mono (b<sub>1</sub>) y dipiruvilado (c<sub>1</sub>); un trisacárido (d<sub>1a</sub>) y su derivado monoacetilado (d<sub>1b</sub>) y los glucanos  $\beta(1-2)$  también sintetizados en este sistema (Resultados no mostrados). Idénticos resultados se obtuvieron al analizar los productos obtenidos con la cepa NA-30 (No mostrados).

Al someter a electroforesis en papel al extracto 1203 obtenido con la cepa RW4 (Tabla VIII), tanto con marca en [<sup>14</sup>C]GlcA como con marca en [<sup>14</sup>C]Glc, sin hidrolizar, se observó un perfil característico semejante al visto anteriormente en estas mismas condiciones para el caso de la cepa silvestre: un pico en el origen de siembra, para el caso de marca en [<sup>14</sup>C]GlcA y un perfil con 2 picos, uno en el origen y otro en la zona neutra (glucanos) para el caso de los compuestos con marca en

Tabla VIII

*Incorporación de radioactividad a diferentes fracciones a partir de UDP[<sup>14</sup>C]GlcA y de UDP[<sup>14</sup>C]Glc*

Se utilizaron en todos los casos células electroporadas como preparado enzimático (obtenidas a 1,5 Kv, 200 ohm y 25  $\mu$ Fd) con las cepas 8002, RW4 y NA-30 (Materiales y Métodos).

Cepa	Dador de azúcar		Incorporación de radioactividad (cpm / mg de proteína)		
	Radioact.	No radioact.	Fracc.1 (EPS)	Fracc.2 (Extr. 1203)	Fracc.3 (Precipitado de células)
<i>R. l. bv. phaseoli</i>					
1) 8002	UDPGlcA		7.800	15.800	3.600
		UDPGlc	60.500	101.300	8.900
	UDPGlc		35.500	124.700	5.700
		UDPGlcA	70.600	145.000	6.590
2) RW4	UDPGlcA			7.500	< 100
		UDPGlc		8.900	470
	UDPGlc			12.500	350
		UDPGlcA			14.300
<i>R. l. bv. trifolii</i>					
3) NA-30	UDPGlcA		3.200	8.570	1.400
		UDPGlc	28.400	65.200	7.590
	UDPGlc		15.700	36.900	2.300
		UDPGlcA	44.980	78.500	5.600

[ $^{14}\text{C}$ ]Glc (Fig.33 A). Luego del tratamiento con ácido débil, los extractos 1203 mostraron un nuevo perfil (Fig.33 B y C).

Con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA, se obtuvo un perfil difuso con un máximo de movilidad (RUMP=1,2) y el resto que corría alrededor de la posición del ácido glucurónico (RUMP= 1,33) (Fig.33 B).

Con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc, se obtuvieron perfiles con los mismos máximos (RUMP=1,2 y RUMP= 1,33), mas un compuesto neutro N (Fig.33 C), que se caracterizó como glucano  $\beta(1-2)$  (Experimentos no mostrados).

La zona de movilidad electroforética de RUMP= 1,2 incluyendo el hombro a su derecha (RUMP= 1,33; compuesto c<sub>2</sub>') (Fig.33 C) se eluyó del papel y se trató con ácido débil durante 90 min. con el objeto de eliminar los posibles grupos cetil piruvatos presentes en los oligosacáridos. Esto se realizó tanto con los compuestos con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA como en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc (Fig.33 B y C, respectivamente). Posteriormente se sometieron a electroforesis en este mismo sistema. El perfil obtenido para el caso de los productos con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc se muestra en la Fig.33 D.

Como se puede observar, hay un compuesto con movilidad en la zona "a" (a<sub>2</sub>), otro con movilidad RUMP= 0,78, y un tercero con la movilidad del estándar de ácido glucurónico (RUMP= 1,33). Idéntico perfil se obtuvo con los productos con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA (No mostrado). Estos compuestos eluidos del papel y filtrados independientemente por Bio-Gel P2, se comportaron como un octasacárido a<sub>2</sub> (zona "a"), un heptasacárido (el de RUMP= 0,78) y un trisacárido (el de RUMP= 1,33) (No mostrado).

Para el caso de los productos con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA, se comportaron igual a excepción del compuesto de RUMP= 1,33 que se desglosó en dos, un trisacárido y un presunto monosacárido que podría tratarse de ácido glucurónico (No estudiado en mayor detalle). El análisis de todos estos resultados, nos permite suponer que el compuesto original de RUMP= 1,2 es un heptasacárido monopiruvilado, ya que la movilidad de este compuesto en ese sistema debe ser mayor que la del octasacárido monopiruvilado, que es de RUMP= 1,0. Otro compuesto presente es posiblemente el octasacárido dipiruvilado y también el trisacárido, en menor proporción. Esto indicaría que en esta mutante RW4, se sintetizarían los intermediarios completos pero por alguna razón desconocida las cantidades sintetizadas son muy pequeñas, provocando que no se llegue a producir polímero o que se sintetice tan poco que sea muy difícil de medir. Esta ausencia de EPS estaría de acuerdo con la baja capacidad que tiene esta cepa para nodular y fijar nitrógeno (Borthakur *et al.*, 1988).

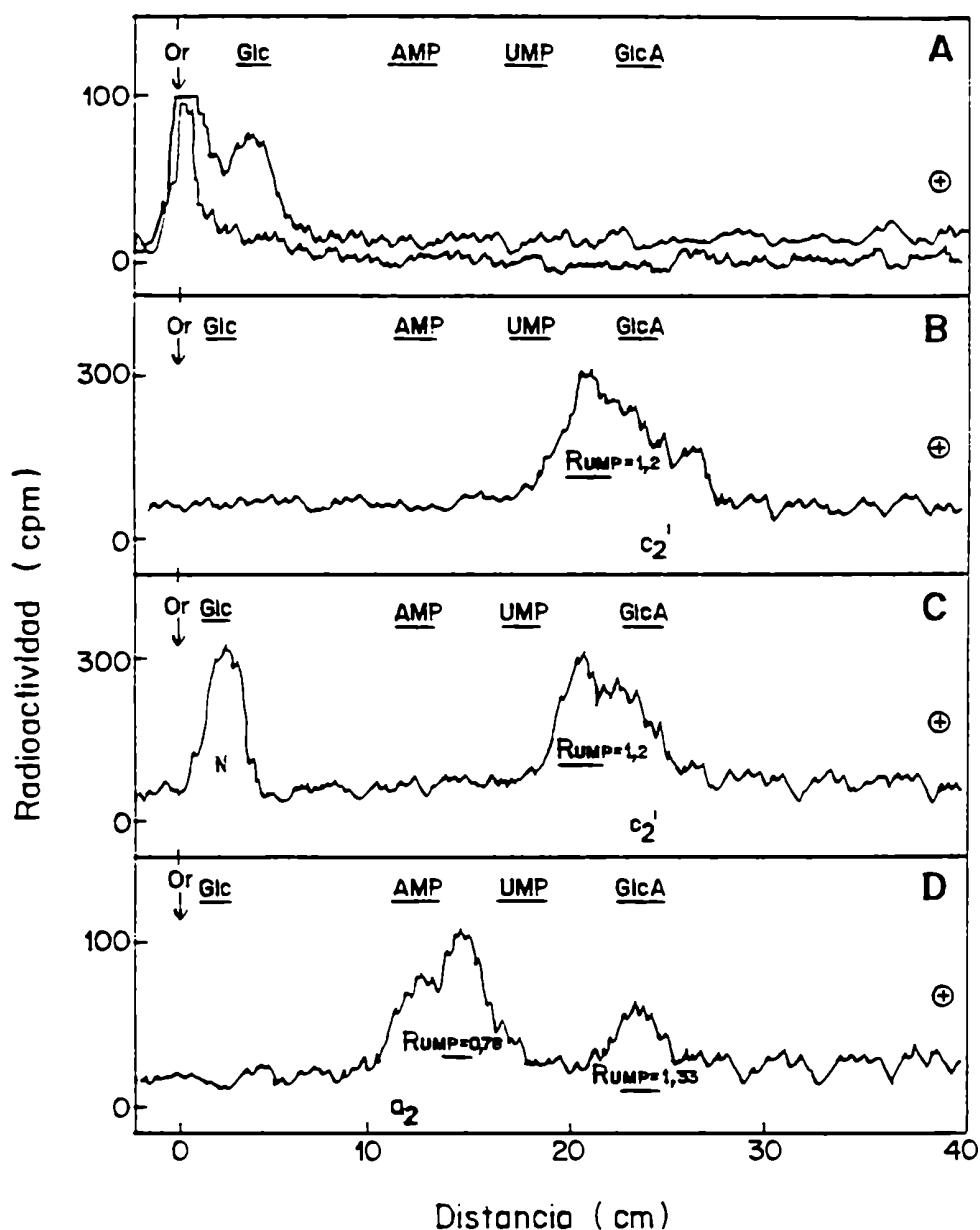


Fig.33: Análisis de los extractos 1203 obtenidos con la cepa RW4. Alícuotas de extractos 1203 como se presentan en la Tabla XIII fueron sometidos a electroforesis en papel con el solvente A. (A) Muestras sin tratar, con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  (3.250 cpm) (línea superior) o con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$  (1.100 cpm) (línea inferior). Muestras tratadas en condiciones ácidas débiles: (B), marca en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$  (6.100 cpm); (C), con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  (12.400 cpm). Los compuestos con movilidad electroforética del panel C ( $\text{RUMP}=1,2$  y  $c_2'$ ), fueron eluidos del papel conjuntamente, depiruvilados en condiciones ácidas débiles y sometidos a electroforesis en este mismo sistema, (D), (1.500 cpm).



#### IV.2.b. SINTESIS DE SUCCINOGLICANO IN VITRO UTILIZANDO EL SISTEMA DE *Rhizobium meliloti*

Como se comentó anteriormente *Rhizobium meliloti* sintetiza un exopolisacárido llamado succinoglicano o EPS I cuya estructura se muestra en la Fig.1. Parte de su biosíntesis ha sido aclarada (Tolmasky *et al.*, 1980; 1982). En estos trabajos, utilizando células tratadas con EDTA como preparado enzimático, se describieron algunos pasos de biosíntesis que llevaron a la formación de la unidad repetitiva (octasacárido, ver Fig.1) a nivel de lípido-azúcar intermediario. Hasta el momento de iniciar este trabajo, con este tipo de ensayos, no se pudo lograr actividad de polimerización que diera como producto final el succinoglicano *in vitro*.

Utilizando inicialmente, en este trabajo, la cepa *Rhizobium meliloti* 1021 (silvestre) nos pareció interesante aplicar la técnica de electroporación con el objeto de ver si ahora este nuevo sistema enzimático es capaz de sintetizar *in vitro* el succinoglicano.

##### IV.2.b.1. UTILIZACION DE LA CEPA SILVESTRE Rm 1021

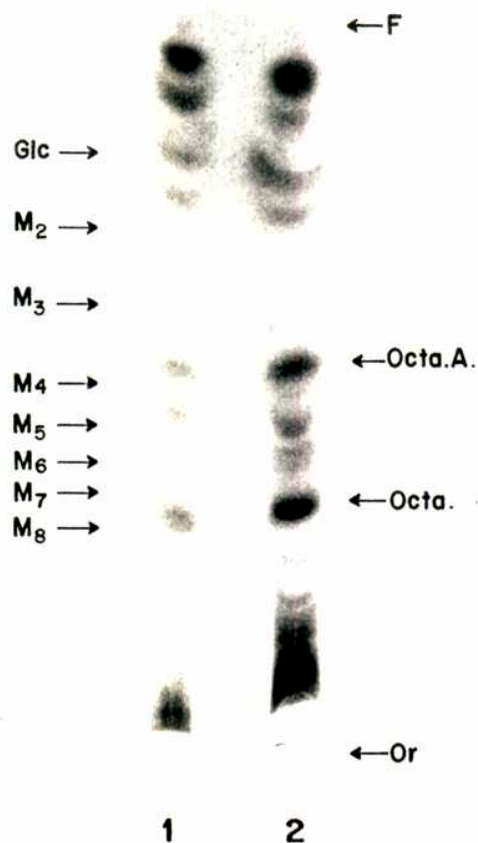
En esta parte del trabajo se describe la utilización de células electroporadas de *Rhizobium meliloti* Rm 1021 (Tabla I), como preparado enzimático. Con este sistema se hicieron incubaciones en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]Glc durante 60 min. a 28°C, como se realizara con el sistema de *Acetobacter xylinum* (Ver mas adelante). También se hizo un ensayo control, utilizando células tratadas con EDTA y shock frío (Tabla IX, ensayo 1 y 2, respectivamente). Como podemos observar se obtuvieron buenas incorporaciones al "Extracto 1203" en ambos casos aunque muy superior con las células electroporadas (ensayo 1). Al analizar estos extractos por TLC con el solvente F, luego de ser hidrolizados en condiciones ácidas débiles, se pudo observar que en ambos casos el patrón de bandas es el mismo (Fig. 34, ensayo 1 y 2). Esto implica que tanto en un sistema como en otro, la formación de los intermediarios de biosíntesis (lípido-PP-octasacárido) es igualmente funcional y similar a lo descrito anteriormente por otros investigadores en donde se confirmaron las movilidades del octasacárido (Octa) y de su derivado acilado (Octa.A.) por cromatografía en TLC, como se muestra en la Fig.34 (Tolmasky *et al.*, 1980, 1982).. Las bandas de Octa (octasacárido) y OctaA (su derivado acilado) se eluyeron de la placa de silica gel (Fig. 34) y se filtraron independientemente, para cada caso, a través de una columna de Bio-Gel P2 (Materiales y Métodos) obteniendo los perfiles de elución que se observan en la Fig. 35 A y B, respectivamente.

Tabla IX

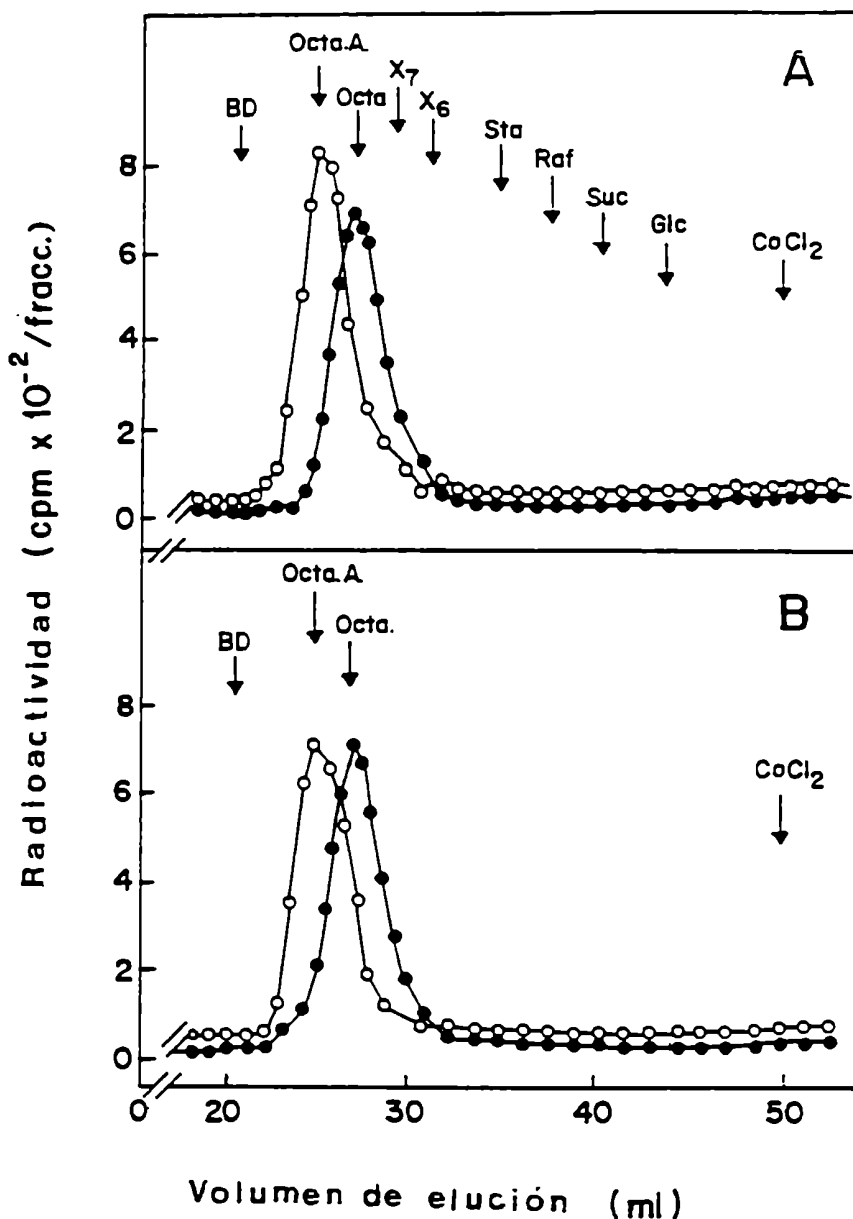
*Síntesis in vitro de succinoglicano*  
*Complementación in vitro de la cepa Rm 7094 ( exo B<sup>-</sup> )*

Se utilizaron tanto células electroporadas (obtenidas a 1,5 Kv, 200 ohm y 25  $\mu$ Fd) como células tratadas con EDTA, como fuente de preparados enzimáticos, y se incubaron en presencia de los dadores de azúcar (UDPGlc y/o UDPGal), uno de ellos alternativamente marcado en [<sup>14</sup>C], en las cantidades que se especifican en Materiales y Métodos.

Exp.	<i>Rhizobium meliloti</i>	Dador de azúcar		Incorporación de radioactividad en (cpm / mg. de proteína)	
		Radioac.	No radioac.	Succinoglicano	Extracto 1203
<b>Rm 1021</b>					
1	electroporadas	UDPGlc		7.000	48.300
2	tratadas con EDTA	UDPGlc			19.400
<b>Rm 7094</b>					
3	electroporadas	UDPGlc			9.000
4	"	UDPGlc	UDPGal	17.700	43.760
5		UDPGal		600	39.000
6		UDPGal	UDPGlc	1.230	36.000



**Fig.34: Análisis por TLC de los compuestos presentes en el extracto 1203.** Extractos 1203 obtenidos en incubaciones realizadas en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]Glc con preparados enzimáticos de células tratadas con EDTA (19.400 cpm) (1), o células electroporadas (48.300 cpm) (2), de *Rhizobium meliloti* Rm 1021 (Ver Tabla IX), fueron hidrolizados en condiciones ácidas débiles y cromatografiados en TLC con el solvente F. La radioactividad de cada banda se detectó al exponer la placa de TLC a una película radiográfica (Ver Materiales y Métodos). Glc, glucosa; M2, M3, M4, M5, M6, M7 y M8, maltooligosacáridos; Octa.A., octasacárido acilado de la cepa Rm 1021; Octa. es el mismo compuesto sin ningún sustituyente no glicosídico. Or, origen de siembra y F, frente del solvente.



**Fig.35: Filtración por columna de Bio-Gel P2 de los oligosacáridos Octa.A. y Octa. obtenidos con la cepa Rm 1021 (Fig.34). Las bandas indicadas como Octa.A. y Octa. tanto obtenidas con células tratadas con EDTA (A), (O-O) Octa.A. (4.800 cpm), (●-●) Octa. (3.700 cpm) o como con células electroporadas (B), (O-O) Acta.A (3.900 cpm), (●-●) Octa. (3.560 cpm), fueron eluidas de la placa de sílicagel y cromatografiadas por una columna de Bio-Gel P2 con el solvente C (Ver Materiales y Métodos). Los estándares fueron los mismos utilizados en la Fig.5.**

En ambos casos se observó un perfil similar. El compuesto OctaA eluyó con un volumen de elución correspondiente a un nonasacárido y el compuesto Octa como un octasacárido. El compuesto Octa.A. depiruvilado y vuelta a filtrar por Bio-Gel P2, presentó una movilidad cromatográfica idéntica al octasacárido (Octa) (No mostrado). Sin embargo, al analizar en ambos casos los sobrenadantes de incubación

por filtración en Bio-Gel A-5m, sólo al usar células electroporadas se encontró formación de polímero *in vitro* (Tabla IX, exp. 1 y 2). Se observó un sólo compuesto de alto peso molecular que correspondía con el volumen de elución del succinoglicano frío usado como estándar (Fig.36 A). Esta fue la primera vez que se describió *in vitro* las síntesis completa del exopolisacárido de *Rhizobium meliloti*, el succinoglicano.

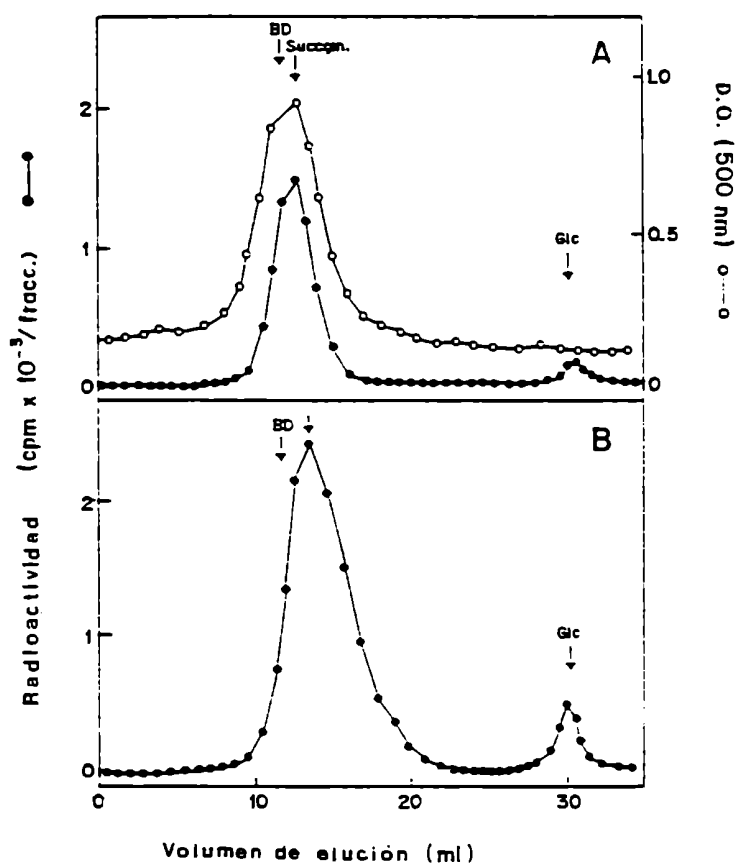


Fig.36: Síntesis *in vitro* del succinoglicano. Filtración por columnas de Bio-Gel A 5m. Las incubaciones se realizaron en presencia de UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc con células electroporadas de las cepas Rm 1021 (silvestre) y Rm 7094 (mutante exo B). En este caso se incluyó UDP-Gal no radioactivo en la mezcla de incubación. Los sobrenadantes de las incubaciones se procesaron como se indica en Materiales y Métodos y luego se filtraron a través de una columna de Bio-Gel A 5m (Ver Tabla IX). (A), cepa Rm 1021 (7.000 cpm) (●-●); succinoglicano frío revelado por el método del fenol-sulfúrico (O-O) (Ver Materiales y Métodos); (B), cepa Rm 7094 (17.700 cpm) (●-●). Se utilizaron azul dextrano (BD) y Glc para determinar el volumen de exclusión e inclusión total, respectivamente. Succgn, succinoglicano.

Tanto el polímero formado con marca en UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc (Fig.36 A), previamente dipiruvilado (pH 2, 100°C, 180 min.), como el [ $^{14}\text{C}$ ]Glc-octasacárido

sin ningún resto no glicosídico (Fig.35 B, Octa), fueron sometidos a un análisis por permetilación como se hiciera con el acetano de *Acetobacter xylinum* (Ver mas adelante). Como era de esperar, en ambos casos se obtuvieron las bandas características de 2,3,4,6 tetra-O-metil[ $^{14}\text{C}$ ]glucosa; 2,3,6 tri-O-metil[ $^{14}\text{C}$ ]glucosa; 2,4,6 tri-O-metil[ $^{14}\text{C}$ ]glucosa; 2,3,4 tri-O-metil[ $^{14}\text{C}$ ]glucosa y 2,4,6 tri-O-metil[ $^{14}\text{C}$ ]galactosa (Fig. 37). Sólo en el caso del polímero permetilado se observó un compuesto extra que corresponde al 2,3 di-O-metil[ $^{14}\text{C}$ ]glucosa, que es producto de la metilación del resto de la 4ª glucosa que interviene en la ramificación (Fig. 37).

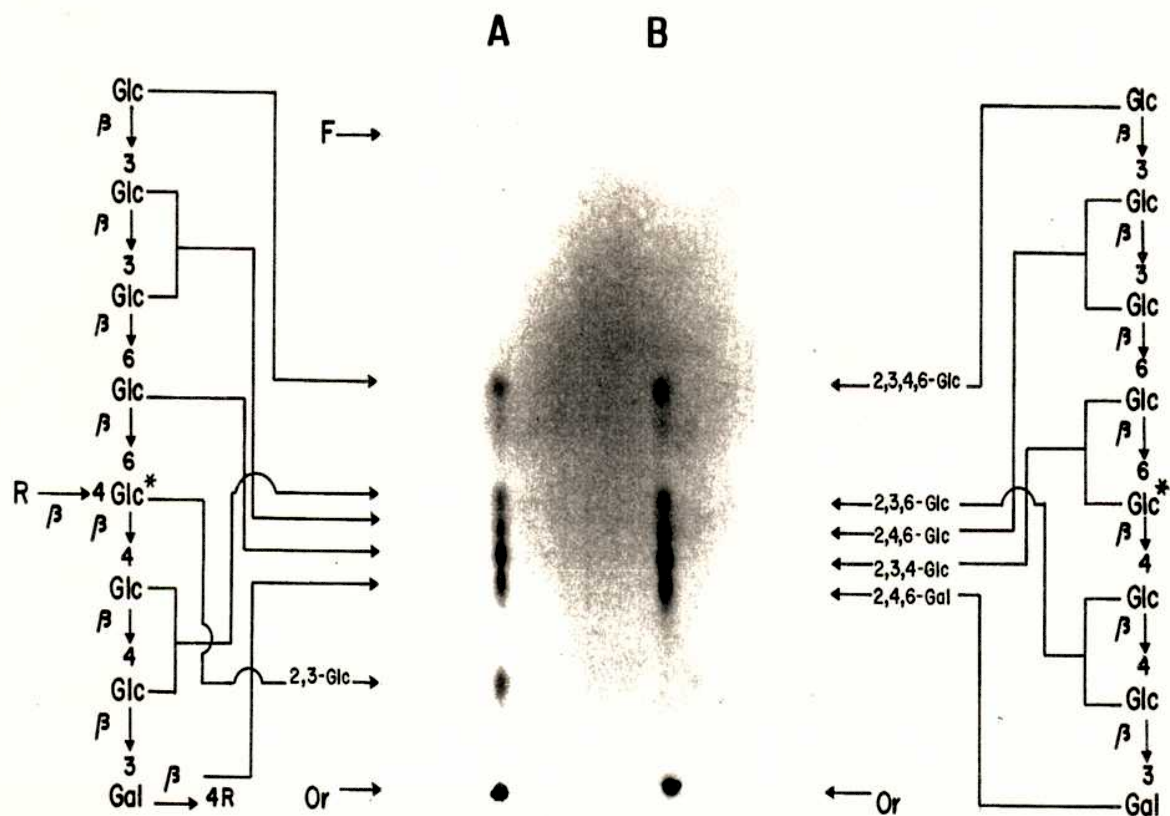


Fig.37: Análisis por TLC de los productos de permetilación del succinoglicano y octasacárido (Octa.) con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc, de la cepa R m 1021. Muestras de succinoglicano-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc (15.000 cpm) (A) y Octa-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc (21.000 cpm) (B), totalmente depiruvilados, fueron permetilados, hidrolizados y sus productos cromatografiados por TLC con el solvente H. La estructura de una unidad repetitiva interna (en el succinoglicano) (A), o la unidad repetitiva libre (B), muestran el origen de los diferentes derivados metilados de glucosa y galactosa. El asterisco (\*) indica la posición del azúcar que interviene en la ramificación. R, resto de la molécula de succinoglicano; Or, origen de siembra y F, frente del solvente.

#### IV.2.b.2. SINTESIS IN VITRO DEL SUCCINOGLICANO

##### -COMPLEMENTACION IN VITRO DE LA CEPA Rm 7094 (exo B<sup>-</sup>)

Puesto que se obtuvo polimerización *in vitro* con la cepa silvestre, un interesante ensayo fue tratar de complementar *in vitro* la mutante *exoB* de *Rhizobium meliloti*, Rm 7094, que carece de la enzima UDP-Gal-4-epimerasa y por lo tanto no puede producir UDP-Gal a partir de UDP-Glc. Si el UDP-Gal es agregado *in vitro*, usando células tratadas con EDTA como preparado enzimático y UDP(<sup>14</sup>C)Glc como dador radioactivo, se forman todos los intermediarios de la biosíntesis del succinoglicano anteriormente vistos utilizando la cepa silvestre, pero tampoco se logra sintetizar polímero en este sistema (Uttaro *et al.*, 1993).

A raíz de esto se diseñó un experimento en el que se usaron células electroporadas de *Rhizobium meliloti* Rm 7094 como preparado enzimático. Los resultados se muestran en la Tabla IX. La mutante fue complementada *in vitro* siempre que se usó UDP-Gal como dador de azúcar y el succinoglicano se formó en cantidades considerables. Cuando se utilizó UDP[<sup>14</sup>C]Glc en presencia de UDPGal no radioactivo, se observó una buena incorporación de radioactividad tanto a polímero como a compuestos extraíbles en solvente 1203 (Tabla IX, exp. 4 y Fig.36 B). En este caso la formación de polímero fue mucho mayor que al utilizar la cepa silvestre Rm 1021, indicando que los aceptores endógenos (lípidos intermediarios) estaban todos vacíos, pues el sistema estaba bloqueado en la 1<sup>o</sup> etapa.

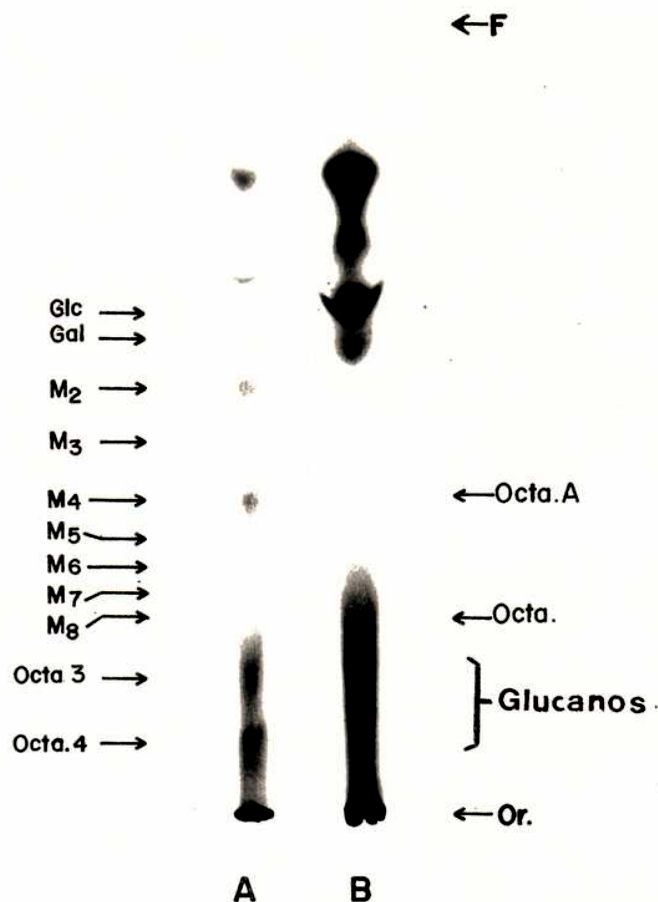
No se observó formación de polímero cuando el ensayo fue llevado a cabo en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]Glc solo, confirmando la ausencia de interconversión de UDP-Glc en UDP-Gal (Tabla IX, exp. 3).

Cuando se utilizó UDP[<sup>14</sup>C]Gal y UDPGlc no radioactivo se observó formación de polímero, pero en menor cantidad (Tabla IX, exp.6). Esto podría ser en parte debido a que en el polisacárido están entrando 7 veces más glucosas que galactosas; además la cantidad en pmoles de UDPGal es tan pequeña (0,69) que podría ocurrir que el sistema no desplazara la reacción hacia la síntesis completamente porque no está saturado de sustrato. En cambio, cuando se usa UDP[<sup>14</sup>C]Glc, éste probablemente existe endógenamente; al agregarle UDPGal no radioactivo el sistema trabajaría en presencia de gran cantidad de UDP-Gal (24 nmoles) y de UDPGlc, desplazando todas las reacciones más eficientemente hacia la síntesis.

Se realizaron dos controles, uno en donde se incubó sólo en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]Glc, y otro sólo en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]Gal.



En el primer control, con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa, no se observó formación de ningún intermediario de la biosíntesis de succinoglicano ni formación de polímero (Tabla IX, exp. 3; Fig. 38 B). En este último caso se observó formación de gran cantidad de compuestos muy lipofílicos con movilidad superior a la glucosa (no caracterizados), y compuestos con poca movilidad cromatográfica que fueron caracterizados como Glucanos  $\beta$  (1-2) en posteriores análisis (No mostrado).

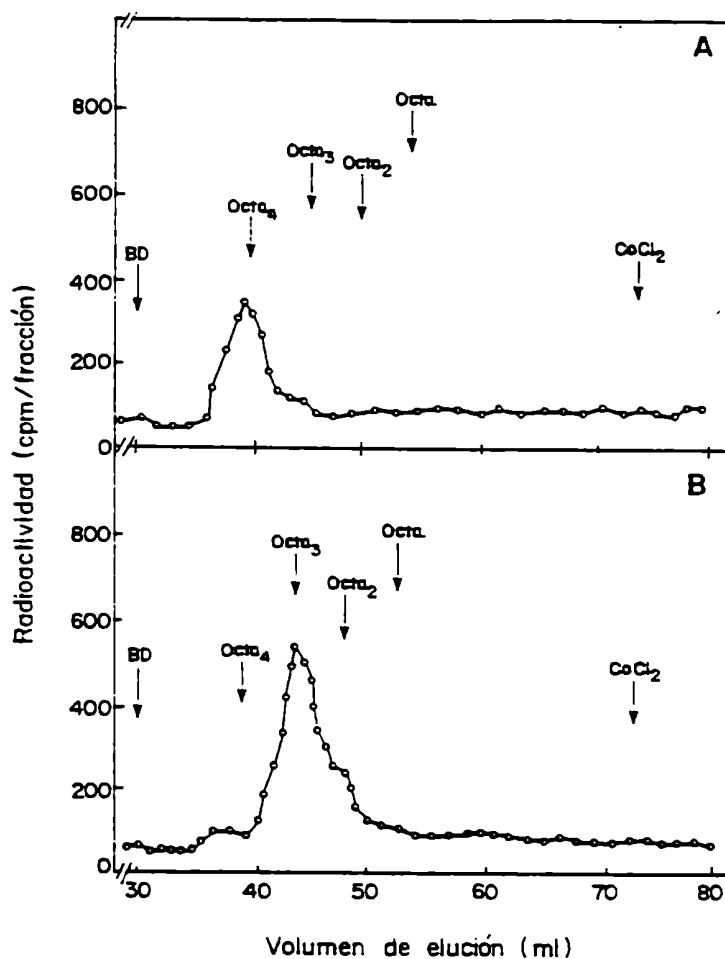


**Fig.38:** Análisis por TLC de los extractos 1203 tanto con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Gal como en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc de la cepa Rm 7094.

Muestras de extractos 1203 tratados en condiciones ácidas débiles (A), [ $^{14}\text{C}$ ]Gal (1.100 cpm) (Tabla IX, exp.5) o (B), [ $^{14}\text{C}$ ]Glc (9.000 cpm) (Tabla IX, exp.3), fueron cromatografiadas por TLC con el solvente F. Para estándares ver Fig.34. Octa3 y Octa4 corresponden a polímeros de tres y cuatro unidades repetitivas (OctaA), respectivamente.



En el segundo control, vemos que hay poca formación de polímero (Tabla IX, exp. 5, 600 cpm) y una considerable incorporación a extracto 1203 (Tabla IX, exp. 5, 39.000 cpm). Al analizar este extracto por TLC (Fig.38 A) se observa que hay formación de OctaA.



**Fig.39:** Cromatografía en Bio-Gel P4 de los compuestos Octa.4 y Octa.3 eluidos de la placa de TLC de la Fig.38 A. Muestras de Octa.4-<sup>14</sup>C]Gal (2.570 cpm) (A) y Octa.3-<sup>14</sup>C]Gal (7.630 cpm) (B), fueron cromatografiados por Bio-Gel P4, como se describirá mas abajo (Ver Fig.40). Octa.2, es la posición probable de un supuesto dímero formado por dos unidades de octasacárido, nunca visto *in vivo* (Battisti *et al.*, 1992).

También hay formación de di y trisacáridos como de otros compuestos con mayor movilidad que la glucosa (no identificados). Por último, se observó también en este caso formación de compuestos radioactivos cerca del origen de siembra con menor movilidad cromatográfica (Fig.38 A, comp. Octa3 y Octa4). Estos compuestos

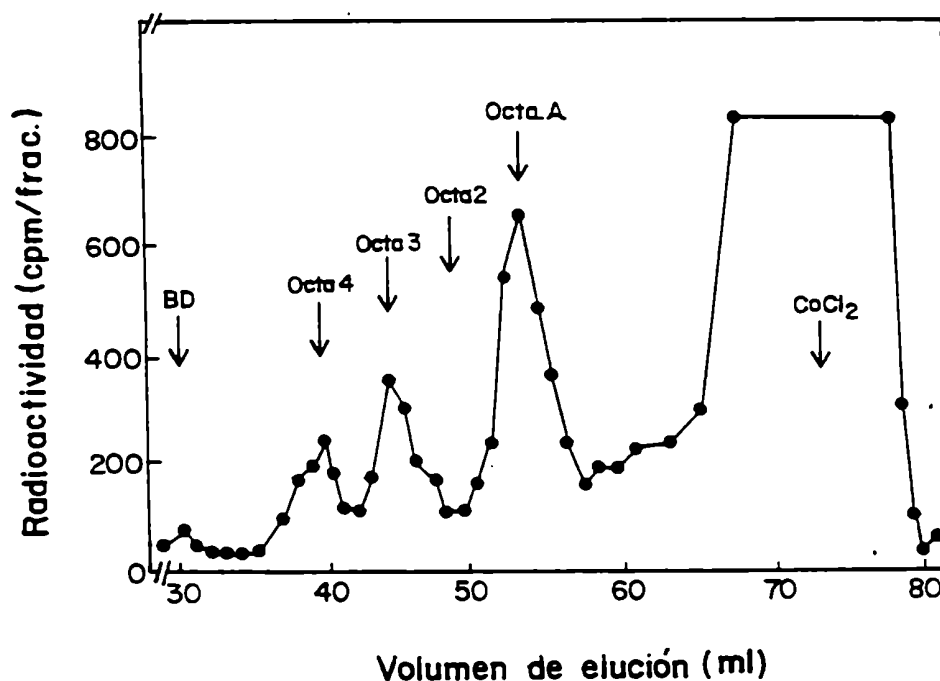
eluidos de la sílica y cromatografiados independientemente por Bio-Gel P4, muestran el perfil cromatográfico que se presenta en la Fig.39 A y B, respectivamente. Como se ve aquí, se obtienen los compuestos Octa3 y Octa4 de tres y cuatro unidades de octasacárido polimerizadas, respectivamente, lo que significaría que se están sintetizando *in vitro* a nivel de prenil-PP-azúcares. Esta suposición se confirmó al observar que por electroforesis en papel del Extracto 1203 marcado en [<sup>14</sup>C]Gal sin tratar, toda la radioactividad permaneció en la zona de siembra. Los compuestos Octa3 y Octa4 migran con un RUMP=0,17 (No mostrado). Como la marca utilizada en este caso es [<sup>14</sup>C]galactosa, la posibilidad de ser confundidos con posibles glucanos β (1-2) queda descartada. Además quedan retenidos en una columna de intercambio iónico mixto (Amberlite MB 3), demostrando que presentan un cierto tipo de carga tal vez brindada por los grupos cetil piruvatos o succinatos.

Al analizar los compuestos presentes en el sobrenadante de incubación dializado, luego de ensayos donde se usó UDP[<sup>14</sup>C]Gal y UDPGlc, se observó formación no sólo de polímero (Tabla IX, exp.6) sino también, menor cantidad, de otros compuestos de menor masa molecular aparente (Fig.36 B). Al repetir el ensayo pero sin dializar el sobrenadante y filtrándolo directamente a través de una columna de Bio-Gel A 5m se obtuvo el siguiente perfil: un pico de inclusión total como componente mayoritario (compuestos de bajo peso molecular que se dializaban) y luego en igual cantidad que antes, el polímero (No mostrado). El material incluido (compuestos de bajo peso molecular) se filtró a través de una columna de Bio-Gel P4 y se observaron cuatro componentes principales, tres de ellos que podrían ser respectivamente, octasacárido acilado (OctaA) y dos polímeros de éste de tres y cuatro unidades, Octa3 y Octa4 (Fig. 40). Estos compuestos ya habían sido descritos anteriormente *in vivo* y sus volúmenes de elución corresponden exactamente con los ya informados previamente en este tipo de cromatografía (Battisti *et al.*, 1992). Son fisiológicamente liberados por *Rhizobium meliloti* al medio de cultivo y está descrito que cumplen una función importante en el proceso de infección de *Rhizobium meliloti* por su planta hospedadora (alfalfa) (Battisti *et al.*, 1992).

El cuarto compuesto, de mayor volumen de elución, se lo consideró como el exceso de nucleótidos usados como dadores durante la incubación (Fig.40) y no fue analizado.

También fue observado, en ensayos similares con la cepa silvestre 1021, la presencia de Octa3 y Octa4, ya formados a nivel de prenil-fosfo-azúcares presentes en el extracto 1203 (No mostrado). El ser detectados en el sobrenadante de

incubación, sugiere que por algún mecanismo no conocido éstos polímeros incompletos son enviados al exterior celular.



**Fig.40:** Análisis por Bio-Gel P4 de los compuestos de baja masa molecular liberados al sobrenadante de incubación.

Los sobrenadantes de incubación de ensayos estándares en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]Gal y de UDPGlc, usando células electroporadas de la cepa Rm 7094, fueron filtrados a través de una columna de Bio-Gel A 5m sin tratamiento previo. Se obtuvo succinoglicano en el Vo (1.500 cpm) y material en la zona de inclusión total (no mostrado). Este último se filtró por una columna de Bio-Gel P4 (Materiales y Métodos). BD, azul dextrano (marcador de Vo) y CoCl<sub>2</sub> (de Vi); Octa., octasacárido de Rm 1021. Otros compuestos como Octa2 (teórico); Octa3 y Octa4, representan las movilidades cromatográficas de los polímeros de 2, 3 y 4 unidades de octasacárido, tomadas de la literatura (Battisti *et al.*,1992).

#### IV.2.b.3. POLIPRENOL – DIFOSFATO – OCTASACARIDO COMO INTERMEDIARIO EN LA SINTESIS DEL SUCCINOGLICANO

De igual manera a lo realizado con los sistemas de *R. leguminosarum* y siguiendo la técnica aplicada con el sistema de *Acetobacter xylinum* (Ver mas adelante), en este caso también se diseñó un ensayo de incubación en 2 etapas. Se utilizó la cepa 7094 (mutante *exoB*) ya que como vimos anteriormente presenta mayor eficiencia en la polimerización (ensayo de complementación *in vitro*, tabla IX, exp 4). En la 1ª etapa, se incubó en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]Glc y de UDPGal no radioactiva, a 28°C durante 30 minutos. El exceso de los nucleótido-azúcares que no reaccionaron fue eliminado por centrifugación. las células lavadas así 3 veces se reincubaron también a 28°C pero durante un período de 2 hs. Los resultados se muestran en la tabla X. Se puede observar que en la segunda etapa hubo una buena producción de polímero equivalente a lo producido en la primera etapa (Fracción 6, 2.750 cpm y Fracción 1, 2.400 cpm, respectivamente).

Por otra parte, la cantidad de compuestos extraíbles por el solvente 1203 en la primer etapa fue superior que en la 2ª, demostrando que los intermediarios lipídicos acumulados durante la 1ª etapa fueron utilizados en parte en la 2ª etapa para producir el polímero. De esta manera se demostró que el polímero formado es producto de la polimerización del octasacárido descrito como la unidad prepetitiva del succinoglicano de *Rhizobium meliloti*.

No obstante, la diferencia de compuestos radioactivos entre los "Extractos 1203" de la 1ª y de la 2ª incubación no es justificable solamente con la transformación del material en polisacáridos; hay otros compuestos en el sobrenadante que compensan dicha diferencia (Tabla X, fracción 6, 20.700 cpm). Más adelante se volverá a tratar sobre ellos.

Por ahora se hará el análisis de los compuestos presentes en cada "Extracto 1203". Para esto se trataron los extractos en condiciones de hidrólisis ácidas débiles a 100°C y luego se cromatografiaron en TLC con el solvente F. De la placa de TLC así corrida se obtuvo una autoradiografía que fue medida densitométricamente. Los resultados de cada corrida se muestran en la Fig. 41. Los perfiles de ambos extractos muestran que hubo una disminución general de toda la gama de compuestos luego de la 2ª etapa con respecto a la 1ª. Debajo del gráfico se particulariza cada pico. Las zonas así delimitadas se eluyeron y midieron (cpm). En cada zona se analizaron sus componentes por las técnicas ya descritas (Fig. 41, Tabla X). Resultaron ser todos intermediarios de biosíntesis del EPS, a excepción de la zona VI (Glucosa) y de parte de la zona I que era una mezcla de Octa3-Octa4 y Glucanos  $\beta(1-2)$ , (Fig. 43, Tabla).

Tabla X

*Lípido-Octasacárido como intermediario en la biosíntesis del succinoglicano*

La cepa Rm 7094 (*exo* B<sup>-</sup>) fue usada para llevar a cabo un ensayo de incubación en dos etapas usando células electroporadas como preparado enzimático (obtenidas a 1.5 Kv, 200 ohm y 25 µFd) en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]Glc y de UDPGal no radioactivo (Materiales y Métodos). Los resultados se expresan en cpm totales incorporados a diferentes fracciones de extracción.

1ra etapa 28° C, 30 min					2da etapa 28° C, 120 min				
Fracc.1	Ext.1203	(lavado acuoso)	(alcali sol.)	(alcali insol.)	Fracc.6	Ext.1203	(lavado acuoso)	(alcali sol.)	(alcali insol.)
2.400*	43.000	6.150	6.940	10.800	2.750*	16.200	6.890	4.300	11.080
					20.700**				

(\*) Succinoglicano presente en el sobrenadante de incubación.

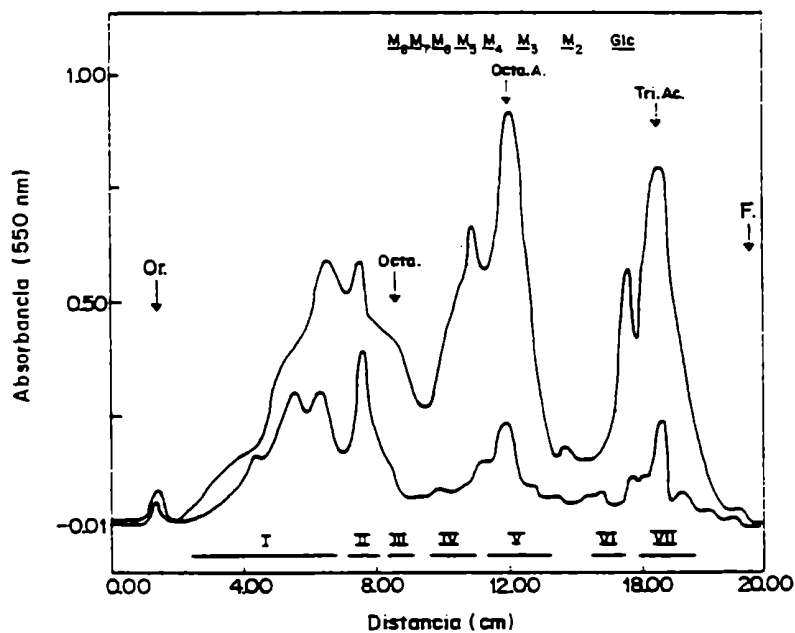
(\*\*) Otros compuestos también presentes en el sobrenadante de incubación : Mezcla de Glucano B(1-2), Octa<sub>A</sub>, Octa<sub>3</sub> y Octa<sub>4</sub>, ( 11.300 cpm); el trisacárido Glc-4Glc-3Gal, (8,500 cpm) y glucosa (1.100 cpm).

De esta manera se vió que la cantidad de octasacárido acilado (compuesto V, octasacárido acetilado y piruvilado), decreció de 9.400 cpm a 2.400 cpm (diferencia=7.000 cpm), mucho más que la cantidad de polisacárido producido (Tabla X, Fracción 6, 2.750 cpm). Posiblemente se transforme en otro tipo de compuestos que podrían ser los Octa3 y Octa4.

Los otros compuestos intermediarios como: octa, octa-mono-fosfato, octa-mono-acilado y trisacárido acetilado, cuyas movilidades cromatográficas en TLC han sido previamente descritas (Tolmasky *et al.*, 1980, 1982; Reuber y Walker, 1993), que están presentes en el "Extracto 1203" de la 1ª etapa, también decrecen en la 2ª etapa (Fig.41). Esto significa que una parte de los prenil-difosfato octasacáridos se polimerizó (Tabla X, Fracción 6, 2.750 cpm) y la restante se liberó también al medio de incubación como octasacárido acilado libre o como polímero de 3 o 4 unidades de octasacárido (Octa3 y Octa4, respectivamente), previamente observados *in vivo* y llamados "polisacáridos LMW" (del inglés: Low Molecular Weight polysaccharides) (Battisti *et al.*, 1992).

Cuando se analizó el sobrenadante de incubación de la 2ª etapa, no solo se encontró polímero, sino un compuesto de bajo peso molecular que se incluía en la columna de corrida (Bio-Gel A-5m) y que consistía en aquella diferencia de radioactividad que se comentó anteriormente entre los extractos 1203 de la 1ª y 2ª etapa (Tabla X, Fracción 6, 20.700 cpm). Este material se filtró por una columna de resina mixta (Amberlite MB 3) y se obtuvieron dos fracciones. La primera, neutra, que se caracterizó como glucanos (1-2) luego de cromatografiarlos a través de una columna de Bio-Gel P4 y posterior hidrólisis parciales y cromatografía en papel. La segunda, cargada y que eluyó de la resina mixta con una concentración de NaCl de 0.8 M, fue caracterizada como una mezcla de los compuestos Octa3 y Octa4 por columna de Bio-Gel P4, dando un perfil semejante al mostrado en la Fig.40 (Datos no mostrados).

Regresando por un momento a la Tabla X, se ve que existen también compuestos extraíbles en las fracciones de "lavado acuoso", "álcali soluble" y "álcali insoluble". Los compuestos extraíbles en las dos primeras fracciones de extracción fueron caracterizados como posibles intermediarios de los glucanos  $\beta$  (1-2) y no fueron analizados en detalle. El compuesto presente en la fracción álcali insoluble se consideró como celulosa que esta bacteria produce y tampoco se estudió en mayor detalle.



RADIOACTIVIDAD (cpm) ELUIDA DE CADA ZONA DE LA TLC								
ETAPA	I	II	III	IV	V	VI	VII	TOT.
1ª	12.300	2.860	2.150	4.280	9.400	1.200	9.300	41.490
2ª	7.520	1.700	870	680	2.400	300	2.300	15.770
	Octa 3+4 Gluc.β(1-2)	Octa.P	Octa.	Octa/ mono.A.	Octa.A.	Glc.	Tri. A.	

Fig.41: Análisis por TLC de los extractos 1203 de un ensayo de incubación en dos etapas con la cepa Rm 7094.

Muestras de extracto 1203 con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  de la primera (perfil superior) y de una segunda etapa (perfil inferior) (Ver Tabla X), se trataron en condiciones ácidas débiles y luego se cromatografiaron independientemente por TLC con el solvente F. En la figura superior se muestran los perfiles obtenidos luego de medir con un densitómetro cada carril (Materiales y Métodos). Los estándares utilizados son los mismos indicados en la Fig.36. En la base de la figura superior se indican las bandas eluidas de cada carril y en la tabla inferior se cuantifica su radioactividad y el tipo de compuesto caracterizado en cada caso. Gluc  $\beta$  (1-2), glucanos  $\beta$  (1-2); Octa.3+4, Octa.3 + Octa.4; Octa.P, octasacárido monofosfato; Octa.monoA, octasacárido mono sustituido; Octa.A., octasacárido acilado y Tri.A., trisacárido (Glc-4Glc-3Gal) acetilado.

≈ 0 ≈

#### IV.2.c. SINTESIS IN VITRO DE ACETANO CON EL SISTEMA DE *Acetobacter xylinum*

##### IV.2.c.1. ANALISIS DE LOS PRODUCTOS INCORPORADOS

*Acetobacter xylinum* es una bacteria Gram negativa no emparentada con el género *Rhizobium*, produce un exopolisacárido complejo mostrado en la Fig.1 C, hallado en nuestro laboratorio.

Se ha detallado la síntesis secuencial de la unidad repetitiva a nivel de preno-fosfo-azúcar, pero no se logró aquí tampoco su polimerización o producción de acetano *in vitro*, a pesar de que resultados indirectos sugieran la función de los lípido-azúcares como intermediarios de biosíntesis (Couso *et al.*, 1987).

Estudios previos han demostrado que en incubaciones realizadas a 30°C con células tratadas con EDTA de *Acetobacter xylinum* RC Gr1, UDP[<sup>14</sup>C]GlcA y el resto de los nucleótido-azúcares no radioactivos (Ver Materiales y Métodos), la radioactividad incorporada al extracto 1203 (Fracción 2) consistía en dos compuestos: un preno-difosfato-heptasacárido (unidad repetitiva) y un lípido-glucurónico (Couso *et al.*, 1982; Couso *et al.*, 1986).

Se han realizado similares experimentos pero usando células electroporadas como sistema enzimático. El análisis por cromatografía en una columna de DEAE-celulosa del extracto 1203 ha demostrado que se sintetizan los mismos compuestos. En la Fig.42 se muestra el perfil cromatográfico obtenido.

El compuesto I, eluido a 0,7 M de acetato de amonio corresponde al lípido-glucurónico y el compuesto II, que eluye a 1,1 M de acetato de amonio corresponde al preno-difosfato-heptasacárido.

Incubaciones preliminares realizadas en las mismas condiciones pero variando la temperatura de incubación entre 0 y 30°C, demostraron que la incorporación de radioactividad al extracto 1203 aumentaba concomitantemente con la temperatura, siendo óptima a 30°C (No mostrado). El análisis del extracto 1203 por electroforesis en papel mostró que toda la radioactividad quedó retenida en el origen de siembra (Fig.43 A).



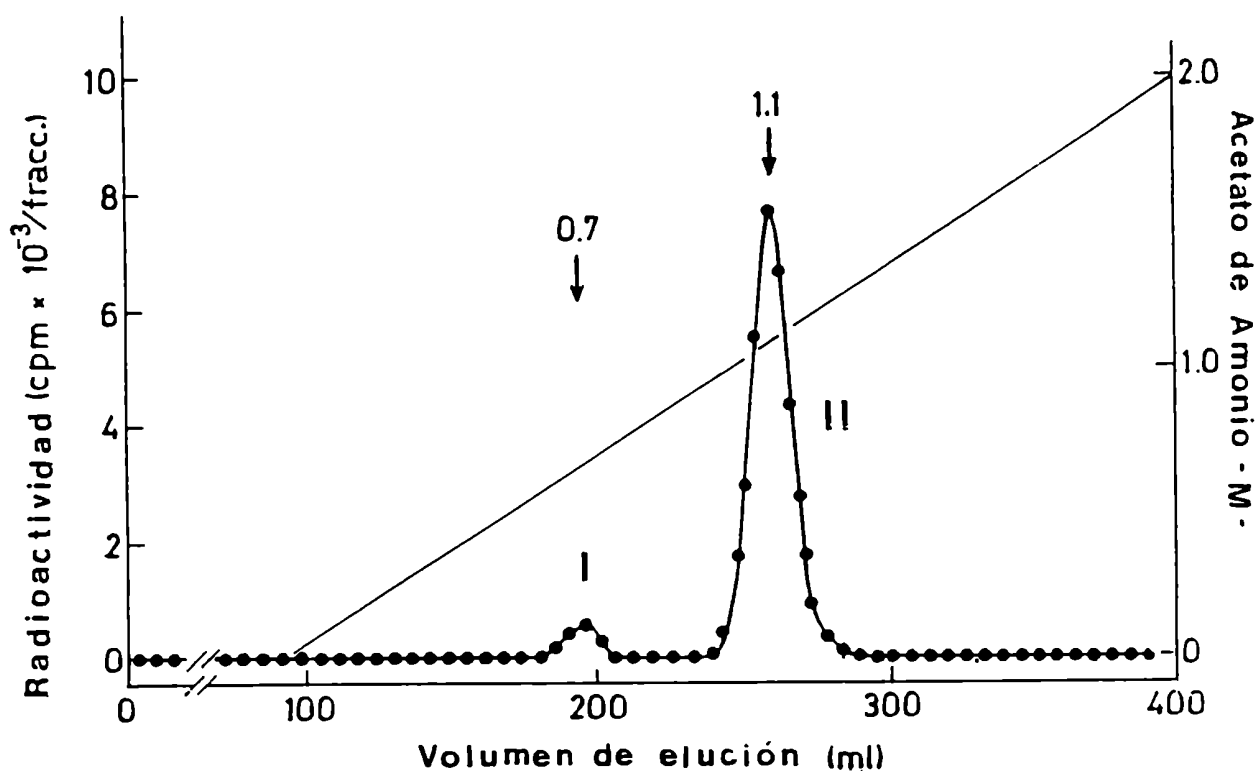


Fig.42: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa del extracto 1203 con marca en [<sup>14</sup>C]GlcA obtenido con la cepa *Acetobacter xylinum* RC Gr1. El extracto 1203 (300.000 cpm) fue preparado en incubaciones estándares por cuadruplicado. La columna se corrió como se describe en Materiales y Métodos. Los números en la parte superior de cada pico indican la concentración del buffer de elución. Compuesto I: lípido-glucurónico; Compuesto II: prenol-difosfato-heptasacárido.

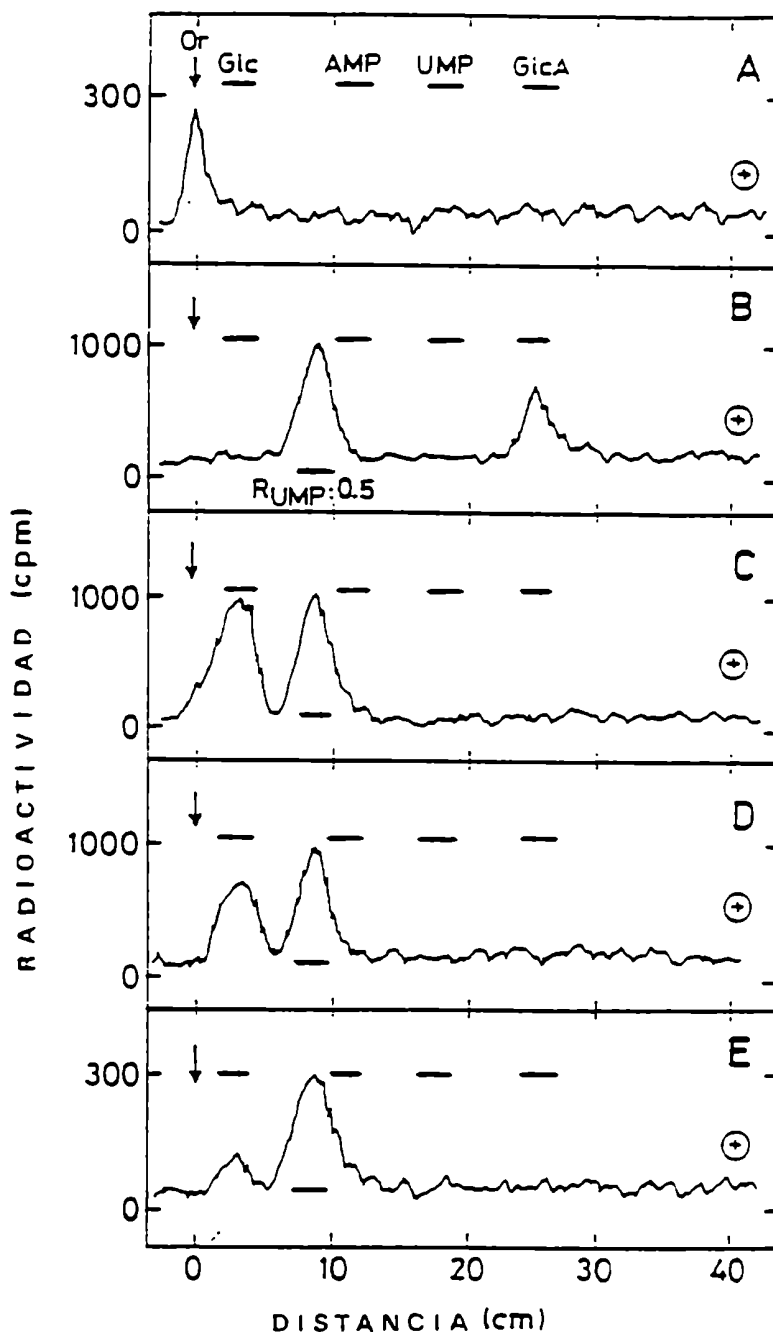
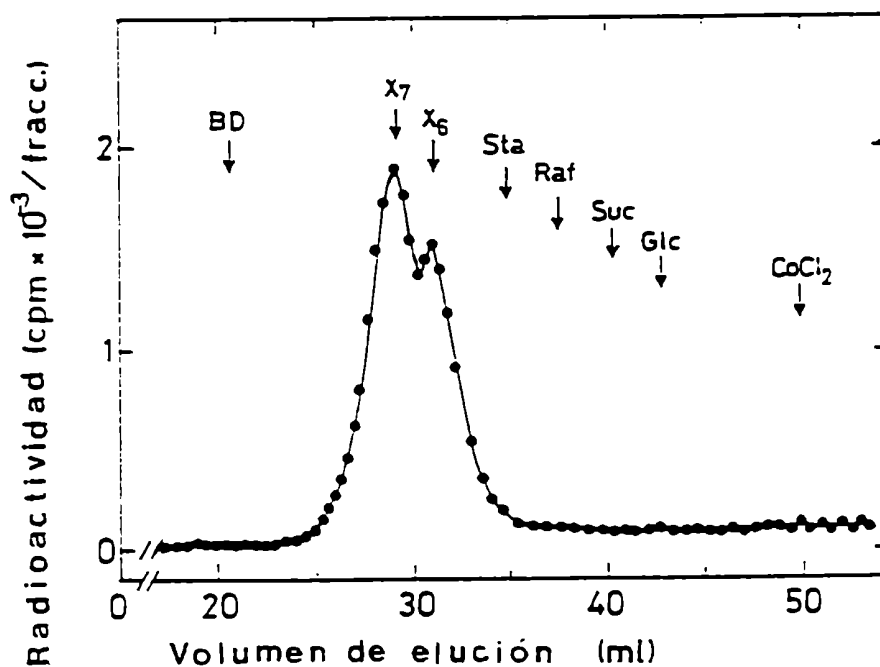


Fig.43: Análisis del extracto 1203 obtenido en incubaciones con la cepa *Acetobacter xylinum* RC Gr1.

Alícuotas de extracto 1203, obtenido en incubaciones realizadas en presencia de  $\text{UDP}[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$  a  $30^\circ\text{C}$ , fueron sometidas a electroforesis en papel con el solvente A, tanto sin tratar (5.000 cpm) (A), o luego de ser hidrolizados a pH 2 (28.000 cpm) (B). Extractos 1203 de incubaciones hechas en presencia de  $\text{UDP}[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  (50.000 cpm) (C),  $\text{GDP}[^{14}\text{C}]\text{Man}$  (35.000 cpm) (D) y  $\text{TDP}[^{14}\text{C}]\text{Ram}$  (9.500 cpm) (E), y de los demás dadores no radioactivos, fueron sometidos al mismo sistema descrito en (A) luego de una hidrólisis a pH 2, 10 min,  $100^\circ\text{C}$ . Glc, glucosa (compuesto neutro); AMP; UMP y GlcA fueron usados como estándares de movilidad. Or, origen de siembra.

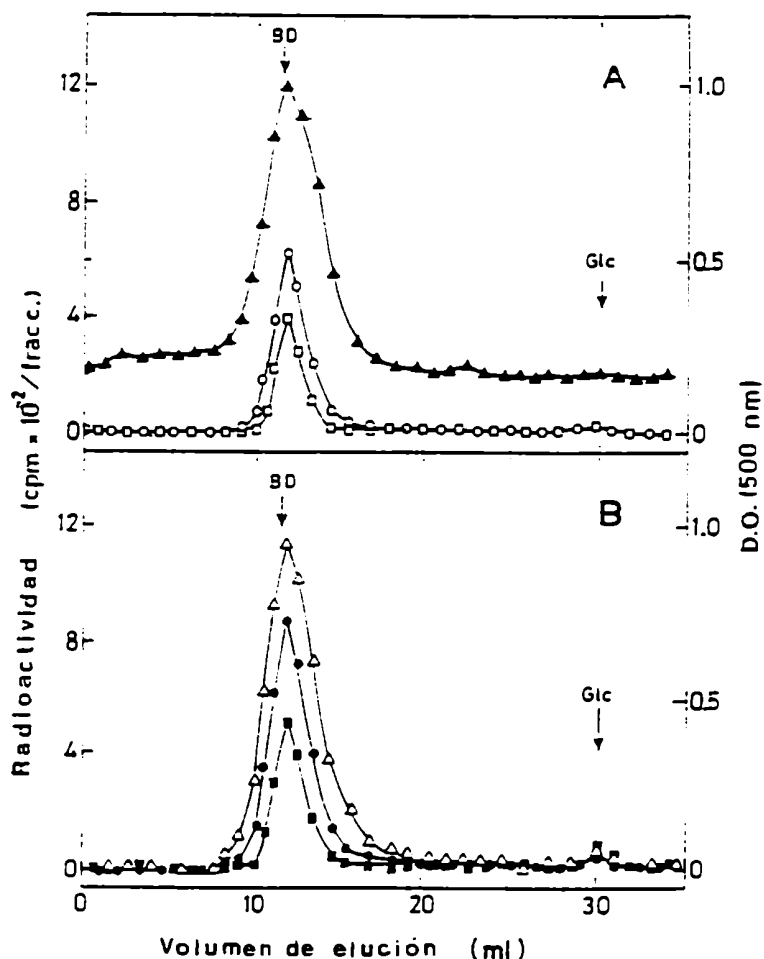
Al tratar al extracto previamente en condiciones ácidas débiles, toda la radioactividad quedó asociada a dos compuestos solubles en agua que luego de ser sometidos a electroforesis en el mismo sistema anterior dió como resultado un perfil con dos compuestos, uno de RUMP=0,5 (heptasacárido) y un segundo, de RUMP=1,1, que se caracterizó como [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA libre, como se describiera anteriormente (Couso *et al.*,1982) (Fig.43 B). La identidad del glucurónico libre se confirmó por electroforesis en papel con el solvente B. Comatografía en Bio-Gel P2 del compuesto de RUMP=0,5 mostró que además del heptasacárido se formó un hexasacárido (la unidad repetitiva sin el último resto glicosídico, ramnosa) en un 30 % (Fig.44). Resultados similares se obtuvieron al analizar los extractos 1203 provenientes de las incubaciones realizadas a las otras temperaturas (No mostrado).



**Fig.44: Filtración por Bio-Gel P2.**

El compuesto de RUMP= 0,5 de la Fig.43 b (casi 15.000 cpm), fue eluido del papel de electroforesis y filtrado a través de una columna de Bio-Gel P2 (Ver Materiales y Métodos). Las condiciones y estándares utilizados son las mismos que en la Fig.9.

Por otro lado al analizar los sobrenadantes (Fracción 1, ver Materiales y Métodos) de incubaciones realizadas a diferentes temperaturas, se observó que la mayor incorporación de radioactividad a polímero se realizó a 30°C. No obstante, se observó un poco de formación de polímero a 20°C (no mostrado). Estos resultados demuestran que usando UDP[<sup>14</sup>C]GlcA como precursor radioactivo y células electroporadas como preparado enzimático, el único polímero que se obtiene en esta fracción es el acetano (Fig.45 A).



**Fig.45:** Filtración por columna de Bio-Gel A 5m de los sobrenadantes de incubación dializados.

Con cada marca se obtuvieron las Fracciones 1 como se indica en Materiales y Métodos. Cuando la marca fue UDP[<sup>14</sup>C]GlcA, se agregó a la fracción dializada (Fracción 1) una cantidad de acetano frío como estándar interno (0,5 mg en 0,5 ml). Para cada marca se corrió una columna diferente. (A), [<sup>14</sup>C]Ram (1.200 cpm) (□); [<sup>14</sup>C]GlcA (3.600 cpm) (○) y acetano frío localizado por el método del fenol-sulfúrico (▲). (B), [<sup>14</sup>C]Man (2.500 cpm) (■); [<sup>14</sup>C]Glc (4.600 cpm) (●) y [<sup>14</sup>C]acetato (8.700 cpm) (△). Las flechas indican la posición de los volúmenes de elución de los estándares (BD), azul dextrano y Glc, glucosa.

#### IV.2.c.2. PUESTA A PUNTO DE LA TECNICA DE ELECTROPORACION

##### -PRESENCIA O NO DE NUCLEOTIDO-AZUCARES DURANTE EL TRATAMIENTO DE ELECTROPORACION

Para demostrar si la presencia de nucleótido azúcares precursores era necesaria antes del tratamiento de electroporación de las células, se diseñó un ensayo cuyos resultados se observan en la tabla XI. Como podemos ver, se obtuvo buena incorporación de radioactividad a ambas fracciones estudiadas (Frac.1, acetano; Fracc.2, extracto 1203) cuando el nucleótido azúcar UDP[<sup>14</sup>C]GlcA es agregado antes ó después del tratamiento, sin la presencia de otros precursores no marcados (UDPGlc, GDPMan y TDPRam)(Exp. 1 y 4, respectivamente). Cuando los otros precursores no marcados son agregados previamente y conjuntamente con el precursor marcado UDPGlcA, la incorporación de radioactividad a ambas fracciones se incrementa casi en un 100 % (Exp. 3 y 5, respectivamente). Si en cambio los nucleótido azúcares no marcados son agregados luego del tratamiento en presencia del dador marcado (UDPGlcA) (exp.2), la incorporación de radioactividad a ambas fracciones fue similar a la observada en los Exp. 3 y 5 respectivamente. Esto demuestra que en todos los casos las células luego del tratamiento se mantuvieron permeables a los nucleótido azúcares, y que la presencia o no de los precursores durante el tratamiento no afecta significativamente los resultados.

Por otra parte, también se estudió durante cuanto tiempo las células se mantenían permeables luego de ser tratadas, ya que en el ensayo anterior los precursores eran agregados inmediatamente después de ser tratadas.

En este caso se diseñó un ensayo que consistió en lo siguiente: luego del tratamiento de electroporación, las células se incubaron en buffer Tris-HCl y Mg<sup>2+</sup> a 10°C durante cada período (hasta 1 hora, indicado en la Fig.46), antes del agregado de la mezcla de los nucleótido azúcares marcados y no marcados (como se indica en la leyenda de la Tabla XI). Luego de esto, se incubó la mezcla a 28°C durante 1 hora, en todos los casos. Como podemos ver en la Fig.46, las células luego del tratamiento se mantuvieron permeables por más de una hora. Después de este tiempo la incorporación de radioactividad tanto al extracto 1203 como al polímero decreció sólo un 50%, comparada con el agregado de los nucleótido azúcares antes del tratamiento (Fig.46; To'). Es importante aclarar que cuando los nucleótido azúcares fueron agregados luego de un minuto del tratamiento (To), la incorporación de radioactividad a ambas fracciones fue máxima, decayendo rápidamente como se observa en la Fig.46.

Tabla XI

*Efecto de la presencia de nucleótido-azúcares antes ó después del tratamiento de electroporación utilizando células de *Acetobacter xylinum*.*

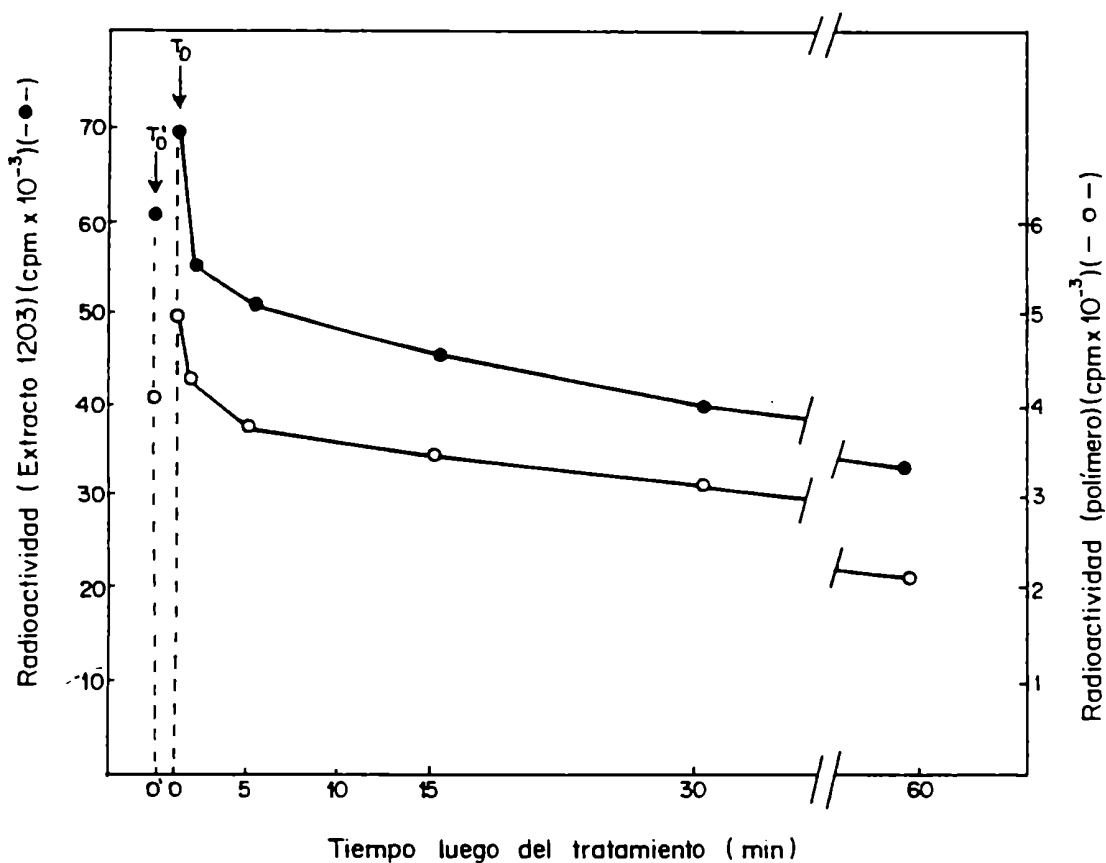
Exp.	Dador de azúcar ( antes del trat. )		C.T.& (mseg.)	Dador de azúcar ( después del trat.)		Incorporación de radioactividad* ( cpm / mg de proteína )	
	Rad.*	No rad.**		Rad.	No rad.	Fracción 1 (Acetano)	Fracción 2 (Extracto 1203)
1)	UDPGlcA		8,2			2.180	42.600
2)	UDPGlcA		8,0		+	3.800	78.500
3)	UDPGlcA	+	7,4			3.750	84.900
4)			8,6	UDPGlcA		2.600	37.360
5)			8,6	UDPGlcA	+	3.910	80.300

& Constante de tiempo obtenida a 400 ohms, 1,5 Kv y 25  $\mu$ F. expresada en microsegundos (mseg.)

# En este caso se estudió la incorporación de radioactividad a la Fracción 1 y 2 solamente.

\* Las incubaciones fueron llevadas a cabo en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]GlcA en las cantidades, por tubo de incubación, que se indican en Materiales y Métodos.

\*\* Los nucleótido-azúcares no marcados UDPGlc, GDPMan y TDPRam se agregaron (–) en las cantidades que se indican en Materiales y Métodos.



**Fig.46: Tiempo de permeabilidad de las células electroporadas. Incorporación de radioactividad a polímero y a extracto 1203 en incubaciones iniciadas por adición de UDP[<sup>14</sup>C]GlcA y los restantes nucleótido azúcares no radioactivos a diferentes tiempos luego de someter las células al tratamiento de electroporación. To' indica que se agregaron los sustratos antes del tratamiento. Las células una vez electroporadas se preincubaron a 10°C, durante los tiempos indicados (a excepción del tubo a tiempo cero, To), antes de iniciar la incubación con el agregado del sustrato radioactivo y los restantes nucleótido azúcares no radioactivos. Todas las incubaciones fueron realizadas como se describe en Materiales y Métodos, 1 hora a 30°C. Extracto 1203 (-●-●-), polímero (-○-○-); nótese las diferencias de escalas.**

### -EFECTO DEL AYUNO DE LAS CELULAS

Se obtuvieron células ayunadas resuspendiendo el precipitado de células en buffer de fosfatos 10 mM (Materiales y Métodos), durante diferentes tiempos entre 0 y 90 minutos. Luego se utilizaron estos cultivos para obtener células electroporadas y realizar incubaciones en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]GlcA y el resto de los dadores no marcados, a 28°C. Los resultados de la Tabla XII muestran que luego del ayuno de 90 min. la incorporación de radioactividad a la Fracción 2 fue aumentando hasta casi un 300% con respecto al control sin ayunar (Exp.1, 2, 3 y 4). En la fracción 1 la situación fue diferente. Se detectó un aumento de incorporación de radioactividad a polímero de más de un 300% luego de 30 min. de ayuno (Exp.1 y 2), pero luego de 1 hora de ayuno decreció y a la hora y media alcanzó un valor menor al del control sin ayunar (Exp.4)

Tal vez, luego de 30 minutos del ayuno las células repriman la síntesis de acetano en un intento de mantener disponibles las fuentes de carbono existentes.

Tabla XII

*Efecto en el ayuno de las células de Acetobacter xylinum.*

Exp.	Dador de azúcar		C.T.& (mseg.)	Tiempo de ayuno (minutos)	Incorporación de radioactividad (cpm / mg de proteína)	
	Rad.	No rad.			Fracción 1 (acetano)	Fracción 2 (extracto 1203)
1)	UDPGlcA	+*	7.8	0,0	1.000	28.600
2)		+	7.8	30,0	3.100	54.000
3)		+	7,6	60,0	1.560	68.300
4)		+	7.5	90,0	830	78.500

& Constante de tiempo expresada en milisegundos (mseg.) a 400 ohms. 1.5 Kv y 25 µF.

\* El nucleótido azúcar radioactivo UDP[<sup>14</sup>C]GlcA conjuntamente con los nucleótido azúcares no radioactivos UDPGlc. GDPMan y TDPRam se agregaron. en las cantidades indicadas en Materiales y Métodos. antes del tratamiento de electroporación.



## -EFECTO DE LA AGITACION AEROBICA Y ANAEROBICA DURANTE LA INCUBACION

Habiendo observado que una mejor aereación durante el cultivo de las células incrementa la formación de EPS *in vitro* (sección IV.2.a.viii) se estudió que efecto causa la agitación, tanto en atmósfera de aire como de N<sub>2</sub>, en los tubos de incubación *in vitro*.

Los resultados (Fig.47) muestran que el efecto del agitado del tubo de incubación (200 rpm), fue el de un incremento de la incorporación de radioactividad tanto al Acetano como al Extracto 1203 (Exp.1 y 2 comparado con el 3 y 4 respectivamente, Paneles A y B). Esto era esperable porque como hemos visto anteriormente las células se mantienen permeables durante todo el tiempo de incubación, por lo tanto, la agitación podría facilitar la accesibilidad de los precursores a una mayor proporción de las células.

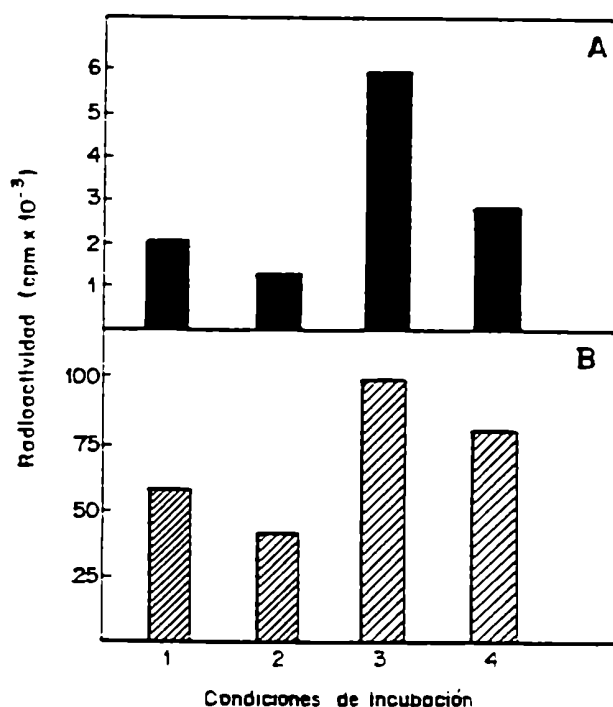


Fig.47: Efecto de la agitación aeróbica y anaeróbica durante la incubación. Las incubaciones fueron llevadas a cabo como se indica en la leyenda de la Tabla XI, exp.3. En este caso fueron utilizados 0,5 mg de proteína por vial. Los resultados se expresan en cpm incorporadas a acetano, (A) y extracto 1203, (B). Los números en las absisas indican: 1, condiciones aeróbicas estáticas; 2, condiciones anaeróbicas, en atmósfera de nitrógeno (N<sub>2</sub>), estáticas; 3, condiciones aeróbicas agitadas (200 rpm) y 4, condiciones anaeróbicas agitadas (200 rpm).

Por otra parte la incubación aeróbica agitada (Exp.3, B) fue más activa en la incorporación de radioactividad al Extracto 1203 comparado con la incubación aeróbica estática (Exp.1, B), indicando un incremento significativo (casi un 100%) y de más de un 100% comparada con las condiciones anaeróbicas estáticas (Exp.2, B).

El efecto sobre la producción de acetano fué aún mayor: en condiciones de incubación aeróbica agitada (Exp.3, A) se observó con respecto a la aeróbica estática un aumento de más de un 200 % (Exp.3 y 1, A). Muy poca producción de acetano se detectó en condiciones de incubación anaeróbica estática (Exp.2, A).

Estos resultados significarían además que durante el proceso de biosíntesis del acetano el oxígeno jugaría un papel importante, tal vez más en la etapa de polimerización que en la primera parte de la vía biosintética.

#### **-VERIFICACION DE QUE LAS INCORPORACIONES OBSERVADAS NO SE DEBEN A DEGRADACION DE LOS NUCLEOTIDO-AZUCARES UTILIZADOS COMO DADORES Y POSTERIOR METABOLIZACION DE LOS RESPECTIVOS [<sup>14</sup>C]-AZUCARES.**

Se decidió investigar si la formación de prenil-fosfo-azúcares y de acetano observadas con células electroporadas se debía simplemente a la metabolización de la glucosa y demás azúcares suministradas en forma de nucleótido azúcares.

Para ello se diseñó un ensayo que consistió en incubar en presencia de glucosa o glucosa-1P en cantidades equivalentes a las usadas con los nucleótido azúcares y en ausencia de estos últimos. Los resultados se muestran en la Tabla XIII.

Ni utilizando [<sup>14</sup>C]Glc ni [<sup>14</sup>C]Glc-1P se observó formación de acetano (Fracción 1, exp. 2 y 3). El solvente 1203 extrajo poca radioactividad, que fué caracterizada como [<sup>14</sup>C]Glc en el primer caso y como una mezcla de [<sup>14</sup>C]Glc y de [<sup>14</sup>C]Glc-1P en el segundo (Fracción 2, exp. 2 y 3). Además estas incorporaciones fueron entre 33 y 24 veces menores que las observadas en un control en el que se utilizó UDP[<sup>14</sup>C]Glc como precursor radioactivo (Fracción 2, exp.1).

También en el experimento 1 se vió que las Fracciones 3 y 4 contienen  $\beta$  1,2 glucano radioactivo, que esta cepa sintetiza (Peso molecular: aproximadamente  $5.10^5$  daltons) y la Fracción 5 contiene celulosa radioactiva que también produce dicha cepa a partir de UDPGlc, presente en la fracción insoluble en álcali (Tabla XIII, Fracción 5).

Tampoco se observó incorporación a las otras fracciones (glucanos  $\beta$ (1-2), celulosa, etc.) cuando se emplearon [<sup>14</sup>C]Glc o [<sup>14</sup>C]Glc-1P como precursores radioactivos (Fracciones 3, 4 y 5, exp. 2 y 3, respectivamente).

Tabla XIII

*Incubaciones realizadas en presencia de [ $^{14}\text{C}$ ]-glucosa y [ $^{14}\text{C}$ ]-glucosa 1-P con células electroporadas de *Acetobacter xylinum*.*

Exp.	Dador de azúcar		C.T.& (mseg)	Incorporación de radioactividad (cpm / mg de proteína)				
	Rad. #	No rad.		Fracc. 1 (acetano)	Fracc. 2 (ext.1203)	Fracc. 3 (lavado acuoso)	Fracc. 4 (álcali soluble)	Fracc. 5 (álcali insoluble)
1)	UDPGlc	+*	7,8	5.400	82.500**	50.000	32.000	11.400
						(Gluc. B 1-2)	(Gluc. B 1-2)	(Celulosa)
2)	Glc	+	8,4		2.500			
					(Glc)			
3)	Glc 1-P	+	8,6		3.400			
					(Glc + Glc 1-P)			

\* Los nucleótido azúcares no radioactivos UDPGlcA, GDPMan y TDPRam se agregaron en las cantidades descriptas en Materiales y Métodos, junto con UDP[ $^{14}\text{C}$ ]GlcA antes del tratamiento de electroporación.

\*\* Incorporación de radioactividad a Extracto 1203. Cuando se usa UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc como dador radioactivo de azúcar, en este sistema, en esta fracción se aislan los siguientes compuestos: Prenol-PP-heptasacárido (unidad repetitiva del acetano), lípido-P-galactosa y Glucano B 1-2 que esta cepa sintetiza.

# Las incubaciones se llevaron a cabo en presencia de UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc, (  $1,1 \cdot 10^6$  cpm ); [ $^{14}\text{C}$ ]-glucosa, (  $1,4 \cdot 10^6$  cpm ) ó [ $^{14}\text{C}$ ]-glucosa 1-P, (  $1,3 \cdot 10^6$  cpm ). El resto de los dadores de azúcares no radioactivos se agregaron como se indica en (\*).

& Constante de tiempo expresada en milisegundos ( mseg. ) a 400 ohms. 1,5 Kv y 25  $\mu\text{F}$ .

(-) Se detectaron < 60 cpm en esta fracción.

Esto demuestra que en este sistema enzimático los nucleótido-azúcares sólo se comportan como dadores de azúcares en la biosíntesis del acetano, como previamente se ha descrito con células tratadas con EDTA como preparaciones enzimáticas (Couso *et al.*, 1987) y además, se demuestra que si en este tipo de preparado enzimático la UDPGlc es enzimáticamente degradada a glucosa y glucosa 1P durante la incubación, ésta no será utilizada inmediatamente como azúcar dador en la vía biosintética del exopolisacárido acetano durante el tiempo de incubación, ni tampoco a la de los otros polisacáridos que se producen.

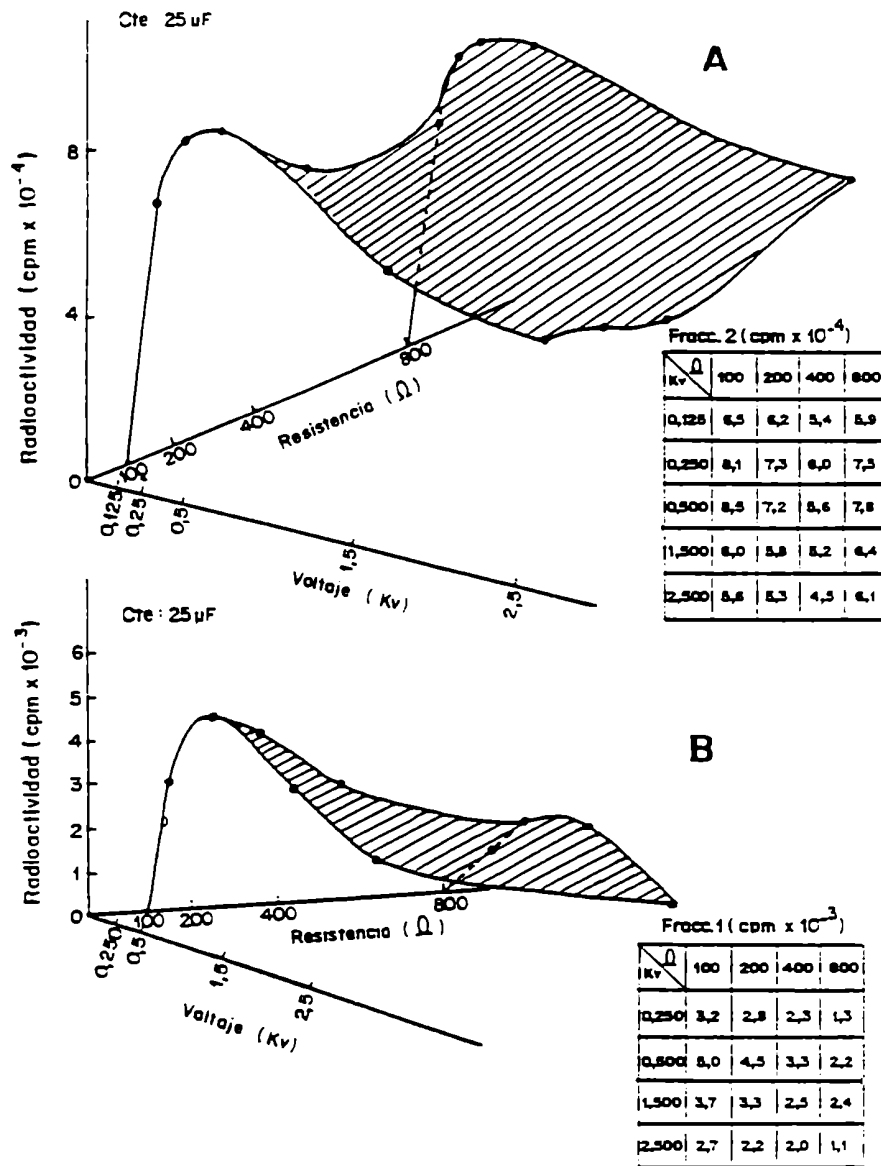
#### **-CONDICIONES DE ELECTROPORACION:**

#### **-VARIABLES FISICAS QUE AFECTAN LA INCORPORACION DE RADIOACTIVIDAD A ACETANO Y EXTRACTO 1203**

En esta sección, se estudió el efecto del voltaje (Kv, kilovolts) y de la resistencia ( $\Omega$ , ohms) en el tratamiento de electroporación. La capacitancia (FD, faradios) se ajustó a 25  $\mu$ FD en todos los casos porque se vió que el cambio de esta variable no afectaba significativamente las incorporaciones (No mostrado). Los resultados se muestran en la Fig.48. Usando una resistencia que variaba entre 100 y 800 ohms y un voltaje que variaba entre 0,125 y 2,5 kv, se detectaron máximos en la incorporación de radioactividad tanto al EPS (Panel B) como al Extracto 1203 (Panel A).

Como se puede observar, existen 2 máximos de incorporación a al extracto 1203, uno a 0,5 KV y 100 ohms y otro a 0,5 kv y 800 ohms (Fig.48 A). Por el contrario sólo se observa un máximo en la producción de EPS a 0,5 KV y 100 ohms (Fig.48 B).

Cuando el lector llegue a la siguiente sección se preguntará por que no se ha realizado el resto del trabajo en las condiciones óptimas de formación de acetano *in vitro* (0,5 KV y 100 ohms), esto podría resultar en una fuerte crítica. La respuesta es que en realidad este estudio se realizó *a posteriori* y por razones de formalidad en la escritura se colocó antes que todos los resultados que veremos a continuación. Sin embargo, la mayoría de las variables utilizadas a lo largo de todo este trabajo son, coincidentemente, las óptimas encontradas.



**Fig.48: Condiciones de electroporación. Representación tridimensional de las variables: incorporación de radioactividad a extracto 1203 y a polímero, en función de diferentes condiciones de electroporación.**

Se variaron el voltaje (Kv, kilovolts) y resistencia ( $\Omega$ , ohms) a capacitancia (FD, faradios) constante, 25  $\mu$ FD. Incorporación de radioactividad al Extracto 1203 (Panel A) y al Acetano (Panel B) en incubaciones realizadas en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]GlcA y el resto de los dadores fríos (Ver Materieles y Métodos). En el margen inferior derecho de cada figura se encuentra una tabla que indica los valores puntuales obtenidos con este sistema para cada valor de voltaje (Kv) y resistencia ( $\Omega$ ).

#### IV.2.c.3. INCORPORACION DE OTROS COMPONENTES DEL ACETANO

Para confirmar que el polímero formado fue acetano, se realizaron incubaciones semejantes a las descritas anteriormente pero usando todos los precursores de los azúcares marcados, uno por vez. Los resultados se muestran en la Tabla XIV. Los perfiles obtenidos luego de someter a electroforesis en papel los extratos 1203 previamente hidrolizados, confirman previos resultados ya descriptos con el sistema de células tratadas con EDTA.

Para cada marca [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA, [ $^{14}\text{C}$ ]Glc, [ $^{14}\text{C}$ ]Man y [ $^{14}\text{C}$ ]Ram) el compuesto mayoritario detectado fue la unidad repetitiva (heptasacárido) RUMP=0,5 (Fig.43, Paneles B, C, D y E; Tabla XIV, Fracción 2, Hepta). Por otra parte, la filtración por geles (Bio-Gel A-5m) de los sobrenadantes de incubación, mostró que tanto ácido glucurónico, manosa, ramnosa como glucosa se incorporaron a la fracción de acetano, pero en diferentes cantidades aparentes (Tabla XIV, Fracción 1; Fig.45, Paneles A y B).

Las diferencias observadas son posiblemente debidas a la presencia de diferentes cantidades de dadores y receptores en la preparación enzimática usada. En los sistemas de células tratadas con EDTA, es conocido que estas contienen dadores y receptores endógenos. Los dadores pueden ser eliminados por diálisis, pero no los receptores lipídicos, los cuales se encuentran muy asociados a la membrana celular (Ielpi *et al.*, 1993).

Con el sistema de células electroporadas la situación es similar. Para reducir, en este caso, las cantidades de dadores y receptores, las células lavadas fueron incubadas durante diferentes períodos de tiempo en buffer de fosfatos sin nutrientes y con aereación, con el objeto de que estas consumieran parte de sus reservas (células ayunadas) (Ver Materiales y Métodos y sección: "Puesta a punto de la técnica de electroporación", parte IV.2.c.2). Las células electroporadas luego de 30 minutos de ayuno presentaron un incremento en la incorporación de radioactividad a todas las fracciones (Tabla XIV).

El incremento en la incorporación en todos los casos fue debido posiblemente en parte a la disminución de los dadores endógenos que diluyen isotópicamente al dador radioactivo agregado.

Durante estos estudios, se observó que con material obtenido a partir de células no ayunadas, las dos primeras glucosas (en el extremo reductor de la unidad repetitiva) fueron muy difíciles de marcar debido a la presencia de prenoil-difosfato-azúcares receptores endógenos (No mostrado). Esta dificultad fue superada en parte cuando se usaron como preparados enzimáticos células ayunadas. Por ejemplo, con

esta preparación, la relación glucosa : sorbitol en el heptasacárido con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc luego de la hidrólisis total de la unidad repetitiva previamente tratada con borohidruro de Na fue de 6:1 (la relación teórica es de 3:1). Esto demuestra que la glucosa del extremo reductor presenta menor actividad específica que las restantes glucosas. En contraste, el material de las células no ayunadas (heptasacárido) sometido a idéntico procedimiento presentó una relación glucosa : sorbitol de 14:1, indicando una presencia de receptores endógenos, es decir el extremo reductor ya formado.

Estos resultados sugieren que las células ayunadas presentan reducida la cantidad de lípido-azúcares que actúan como receptores endógenos.

Por otra parte, estudios previos han demostrado que el acetano además contiene un 4 % (p/p) de residuos acetatos (Couso y Dankert, resultados no publicados y Jansson *et al.*,1993). Se estudió entonces la incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ]-acetato a diferentes fracciones usando [ $^{14}\text{C}$ ]acetil-CoA como dador de acetilos.

En incubaciones realizadas en ausencia de dadores de azúcares , el [ $^{14}\text{C}$ ]-acetato se detectó a nivel de acetano y esa incorporación se duplicó en incubaciones que contenían los azúcares dadores fríos (Tabla XIV, Fracc. 1 y Fig.45, Panel B).

Como era de esperar, [ $^{14}\text{C}$ ]-acetato fue detectado además a nivel del extracto 1203 (Tabla XIV, Fracc.2). Se detectó prenol-difosfato-hepta-hexasacárido marcado y otro componente de tamaño menor (Tabla XIV, Fracc.2, Otros). Esta fracción contiene dos tipos de compuestos: neutros y negativamente cargados. los compuestos neutros (27.000 cpm) analizados por Bio-Gel P2 y posterior cromatografía en papel con el solvente D, fueron caracterizados como una mezcla de celobiosa acetilada y manosilcelobiosa acetilada. De manera similar, la fracción negativamente cargada (21.600 cpm) como así también los compuestos cargados solubles en agua (6.200 cpm) (Fracc.3, Otros), se caracterizaron como una mezcla de ésteres fosfóricos cíclicos de la celobiosa acetilada y de la manosilcelobiosa acetilada anteriormente nombradas.

Resultados similares se obtuvieron con las respectivas fracciones a partir de incubaciones en donde no se usaron nucleótido-azúcares dadores (Tabla XIV). La acumulación tan grande (49.100 cpm) de lípido-azúcares en este estadio en particular no puede ser explicada por el momento, pero tal vez la entrada del acetato a nivel del disacárido detenga, en parte, la transferencia de los restantes azúcares.

Tabla XIV: Incorporación de componentes del acetano a diferentes fracciones

Incubaciones estándar se realizaron con células electroporadas (1,5 Kv, 200 ohm y 25  $\mu$ Fd) en presencia de todos los precursores uno de ellos radioactivos marcados en  $^{14}$ C] e indicados en cada caso. Los productos de incorporación fueron fraccionados como se indican en Materiales y Métodos. Las incorporaciones se expresan en cpm / mg de proteínas. Algunos de los compuestos indicados en la columna "Otros" fueron identificados como se describe abajo. Abreviaturas: Hepta, prenol-PP-hexa-heptasacárido.

Dador radioactivo	Fracción 1 (sobrenadante) Acetano	Fracción 2 (Extracto 1203)		Fracción 3		Fracción 4 (alcali soluble) Glucano	Fracción 5 Celulosa	Total (cpm)
		Hepta	Otros	Glucano				
				Neutros	Cargados			
UDP-GlcA	3.600	33.810	15.190*					52.600
GDP-Man	2.500	26.564	6.310**			4.700 £		35.374
TDP-Ram	1.100	6.910	540 £			1.200 £		13.250
TDP-Ram §§	2.750	14.380						18.614
UDP-Glc	3.330	25.600	30.400 &	18.000	6.000	11.000	1.600	96.030
UDP-Glc §§	6.130	118.000	61.800 &&	80.450	38.700	44.767	62.560	412.407
Acetil-CoA ££	4.600	8.200	46.120 #					68.420
Acetil CoA	8.710	10.100	49.100 #					74.110

\* Lípido monofosfato glucurónico ( Couso et al., 1986 ).

\*\* Prenol monofosfato-manosa ( Couso et al., 1980 ).

£ Compuesto conteniendo  $^{14}$ JRam no identificado.

££ Incubación en ausencia de los nucleótido azúcares dadores no radioactivos: UDPGlc, UDPGlcA, GDPMan y TDPRam.

& Glucano ( 8.300 cpm ) ( García et al., 1974 ), prenol monofosfato galactosa ( 16.200 cpm ) ( Romero et al., 1977a) y un producto no identificado (6.080 cpm).

&& Glucano ( 29.000 cpm ), prenol monofosfato-galactosa ( 15.800 cpm ) y un producto no identificado ( 17.000 cpm ).

# Prenol difosfato acetil celobiosa, prenol difosfato acetil manosa celobiosa y sus productos de degradación, los esteres fosfatos cíclicos de la acetil celobiosa y de la acetil manosa celobiosa ( García et al., 1974; Couso et al., 1980 y R.O. Couso y M.A. Dauterl, resultados no publicados ).

§ Esteres fosfatos cíclicos de acetil celobiosa y acetilmanosa celobiosa, como arriba.

§§ Célula ayunadas durante 30 minutos, como se describe en Materiales y Métodos.

( ) Se midieron < 60 cpm.



#### IV.2.c.4. ANALISIS POR METILACION

Los análisis por metilación del acetano con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  muestran la formación de los derivados esperados: 2,6 di-O-metilglucosa, derivada del segundo azúcar que interviene en la ramificación; 2,3,4 tri-O-metilglucosa, a partir de las dos glucosas en unión  $\beta$  1-6 y 2,3,6 tri-O-metilglucosa, a partir de la primera glucosa del extremo reductor (Fig.49 A).

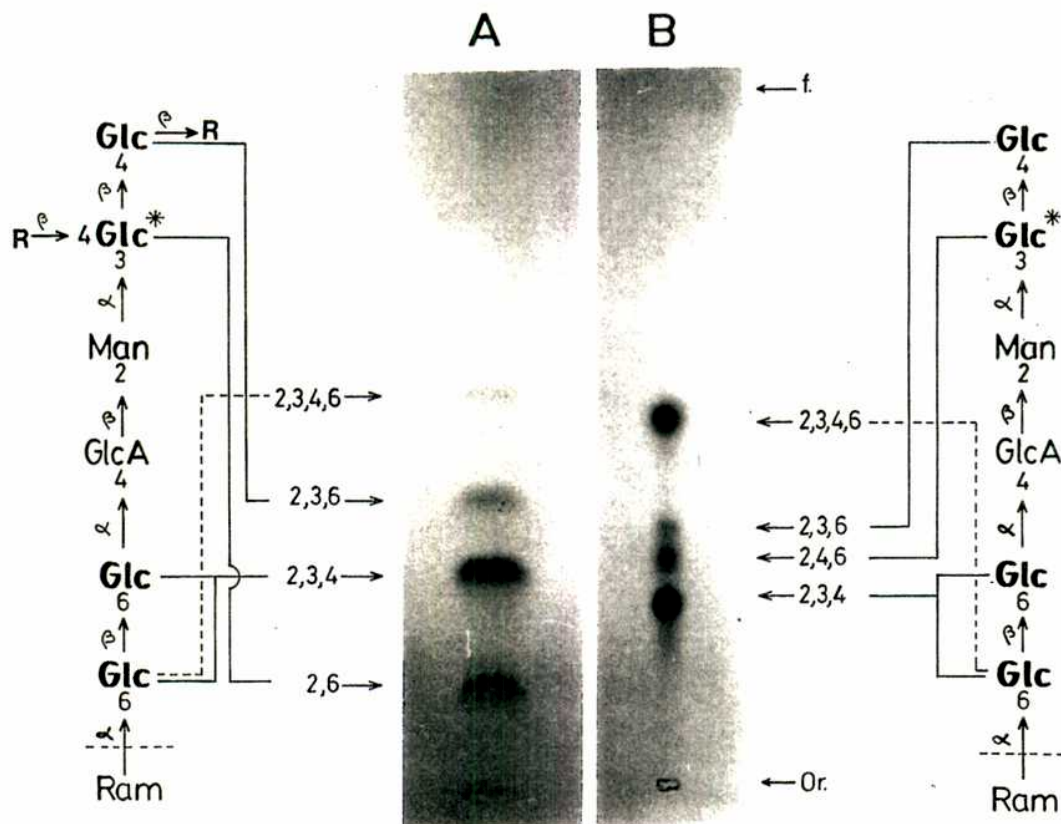


Fig.49: Análisis por TLC de los productos de permetilación del acetano y de la unidad repetitiva (hepta-hexasacárido) con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ . Muestras de acetano  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  (31.000 cpm) (A) y de unidad repetitiva con la misma marca (20.000 cpm) (B), fueron permetiladas independientemente, hidrolizadas y cromatografiadas en sendos carriles en TLC con el solvente H. Las líneas punteadas indican la glucosa terminal, (tetra-O-metil derivado), originada cuando la ramnosa no está presente y el asterisco (\*) indica la posición del azúcar que interviene en la ramificación. R, resto de la molécula de acetano; Or origen de siembra y f, frente del solvente.

Sorpresivamente fueron detectadas pequeñas cantidades de 2,3,4,6 tetra-O-metilglucosa, indicando la presencia de una glucosa terminal. Este último resultado fue interpretado como la consecuencia de la polimerización del hexasacárido que no presenta la última ramnosa (Fig.49, Panel A).

Esto fue apoyado por el hecho de que al hacer similares análisis por permethylación pero con la fracción de RUMP=0,5 (Fig.48) también marcada en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc, una cantidad considerable de 2,3,4,6 tetra-O-metilglucosa fue también detectada (Fig.49, Panel B). Esto confirma la presencia de hexasacárido en esta fracción, observado previamente por filtración en geles (Fig. 44).

Como era de esperar no se detectó la formación del derivado 2,6 di-O-metilglucosa observado con el polímero, sino el 2,4,6 tri-O-metilglucosa, significando que en este caso la unidad repetitiva es lineal.

Es interesante destacar que por esta técnica también se puede observar que la intensidad de la mancha correspondiente a la glucosa del extremo reductor, substituida en posición 4 (2,3,6 tri-O-metil glucosa), es menor que la de la siguiente glucosa, substituida en 3 (2,4,6, tri-O-metil glucosa). Como ambas se encuentran en igual proporción dentro de la unidad repetitiva, queda claro que la actividad específica de la glucosa del extremo reductor es menor que la de la siguiente, reafirmando la presencia de receptores endógenos, prenil-difosfato-glucosa, en este caso.

#### **IV.2.c.5. POLIPRENOL — DIFOSFATO — HEPTASACARIDO COMO INTERMEDIARIO EN LA BIOSINTESIS DEL ACETANO**

Para demostrar que el poliprenol-difosfato-heptasacárido soluble en el extracto 1203 actúa como intermediario en la síntesis del acetano, se realizó un ensayo de incubación en dos etapas.

En la primer etapa, se incubó en presencia de los cuatro nucleótido azúcares dadores, uno de ellos marcado alternativamente y se realizó una incubación estándar a 10° C, porque a esta temperatura el proceso de polimerización está altamente disminuido y se acumulan lípido-azúcares (1<sup>º</sup> etapa). El exceso de dadores de azúcares fue eliminado luego de 30 min. de incubación, por lavados de las células y éstas fueron entonces reincubadas, ahora a 30° C para promover la polimerización (2<sup>º</sup> etapa).

Los resultados se resumen en la tabla XV. Al usar, UDP[ $^{14}\text{C}$ ]GlcA como dador marcado, a partir del prenil-difosfato-heptasacárido acumulado en el final de la primer etapa (21.200 cpm, Fracc.2, Hepta) cerca de la mitad de este intermediario

Tabla XV: *Lípido difosfato heptasacárido como intermediario en la biosíntesis del acetano*

Incubaciones en dos etapas se realizaron con células electroporadas (1.5 Kv, 200 ohm y 25µFd) y se procesaron como se describe en Materiales y Métodos (10 Fracciones), a las temperaturas y tiempos indicados, en presencia de los cuatro donadores de azúcares, uno de ellos alternativamente marcado. Las incrustaciones se expresan en cpm / mg de proteína. Abreviaturas: Hepta, prenil difosfato hexa-heptasacárido; Hepta libre, hexa y heptasacárido libres; Sobre, sobrenadante de incubación; Radioac, radioactivo.

		2da Etapa: 30 ° C, 120 minutos													
		1ra Etapa: 10 ° C, 30 minutos													
Donador de azúcar (Radioac)	Fracc.1 (Sobre) Acetano	Fracc.2 (Extracto 1203)	Fracc.3 (lavado alcali acuoso) soluble	Fracc.4 (alcali insoluble)	Fracc.5 Total	1er. Total	Fracc.6 (Sobre)	Fracc.7 (Extracto 1203) acuoso	Fracc.8 (lavado alcali soluble) insoluble	Fracc.9 (alcali soluble) insoluble	Fracc.10 Total	2do Total			
	Hepta	Otro	Glucano	Glucano Celulosa			Acetano	Hepta	Otro	Glucano	Glucano Celulosa				
							libre								
UDP GlcA	21.200	8.430*				29.630	3.000	6.000	10.000	10.100	1.800*	30.900			
UDP Glc	18.000	21.800**	8.100	5.600	1.800	55.300	4.600	6.225	20.600£	5.160	4.700££	11.800	1.500	980	55.565
GDP Man	19.251	11.200&	1.080&&	-	-	31.531	1.700	3.100	6.500#	13.324	2.800&	27.424			

\* Lípido monofosfato glucurónico (Couso et al., 1986).

\*\* Glucano (1.800 cpm) (García et al., 1974), prenil monofosfato galactosa (20.000 cpm) (Romero et al., 1977a)

& Prenil monofosfato manosa (11.200 cpm) (Couso et al., 1980).

&& Compuesto no identificado.

§ Ácido glucurónico libre.

£ Galactosa libre (17.600 cpm) y un disacárido no identificado (3.000 cpm).

££ Prenil monofosfato galactosa (2.200 cpm), glucano (1.500 cpm) y un producto no identificado (1.000 cpm).

# Mianosa libre.

( ) Se detectaron < 60 cpm.

se observó en la misma fracción al final de la segunda etapa (10.100 cpm, Fracc.7, Hepta), pero una cantidad significativa fue polimerizada a acetano (3.000 cpm, Fracc.6, acetano). Además, se detectó hepta-hexasacárido libre en esta misma fracción acuosa (6.000 cpm, Fracc.6, Hepta). La mayor parte del lípido-glucurónico se liberó en la segunda etapa como GlcA libre a esta fase acuosa (Fracc.6, Otro).

Al usar UDP[<sup>14</sup>C]Glc como dador marcado, la distribución de la radioactividad fue más compleja, pero fácil de interpretar. Nuevamente, el prenil-difosfato-heptasacárido acumulado durante la primera etapa (18.000 cpm, Fracc.2, Hepta), siguió tres caminos: cerca de un tercio de ésta se mantuvo en la misma fracción (5.160 cpm, Fracc.7, Hepta libre); otro tercio fue polimerizado (4.600 cpm, Fracc.6, acetano) y el resto fue liberado al medio de incubación como hepta-hexasacárido libre (6.225 cpm, Fracc.6, Hepta). Una correlación similar fue observada cuando se usó el precursor de manosa marcada, GDP[<sup>14</sup>C]Man. En este caso en particular la cantidad de polímero formado fue menor.

En todos los experimentos, la cantidad total de radioactividad recuperada al final de la 1ª y 2ª etapa es razonablemente la misma (Tabla XV, primeros y segundos totales). Las diferencias negativas y positivas obtenidas se cuentan dentro del error experimental.

Finalmente, como se verá a continuación, para cada marca, los compuestos no relacionados a la síntesis del acetano fueron además detectados en las respectivas fracciones (Tabla XV).

#### IV.2.c.6. INCORPORACION DE AZUCARES A OTROS COMPUESTOS NO RELACIONADOS CON EL ACETANO

La formación *in vitro* de tres lípido-azúcares no relacionados con la biosíntesis del acetano, como el prenil-monofosfato-galactosa, prenil-monofosfato-manosa y el lípido-glucurónico han sido descritos anteriormente (Romero *et al.*, 1977a, Couso *et al.*, 1980 y Couso *et al.*, 1986).

Todos estos compuestos también han sido detectados en este estudio (Tabla XIV, Fracc.2). Electroforesis en papel del extracto 1203 marcado en [<sup>14</sup>C]GlcA, tratado a pH 2, muestra además del heptasacárido (RUMP= 0,5), ácido glucurónico libre, como se mencionara más arriba (Fig.43 B) (Couso *et al.*, 1986) y la columna de DEAE-celulosa del extracto 1203 tal cual, muestra un perfil con dos compuestos, el prenil-PP-hepta-hexasacárido (compuesto II) y el lípido-glucurónico (compuesto I) (Fig. 42).

De manera similar, el extracto 1203 con marca tanto en [ $^{14}\text{C}$ ]Man como en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc fue tratado a pH 2 y sometido a electroforesis en papel. El perfil muestra la presencia de un compuesto en la zona neutra (Fig.43, C y D). Al analizar el compuesto con marca en manosa se caracterizó como manosa libre derivada de la hidrólisis del prenoil-P-manosa (Couso *et al.*,1980), pero la composición del compuesto con marca en glucosa fue más compleja. Luego de eluirlo del papel y filtrarlo a través de una columna de Bio-Gel A-5m el perfil obtenido mostró dos componentes. Uno eluía en la posición correspondiente a un glucano de masa molecular equivalente a 500.000 Da. El segundo eluyó en la posición equivalente al volumen de inclusión y fue caracterizado como galactosa por posteriores análisis, originada por hidrólisis del prenoil-P-galactosa (Romero *et al.*,1977a) y un no identificado disacárido (Tabla XIV, Fracc.2, Otros).

El glucano no fue retenido por filtración a través de una columna de resina mixta (Amberlite MB3). Además no fue degradado por  $\alpha$  amilasa y resultó soluble en 5 % de TCA (Acido tricloroacético).

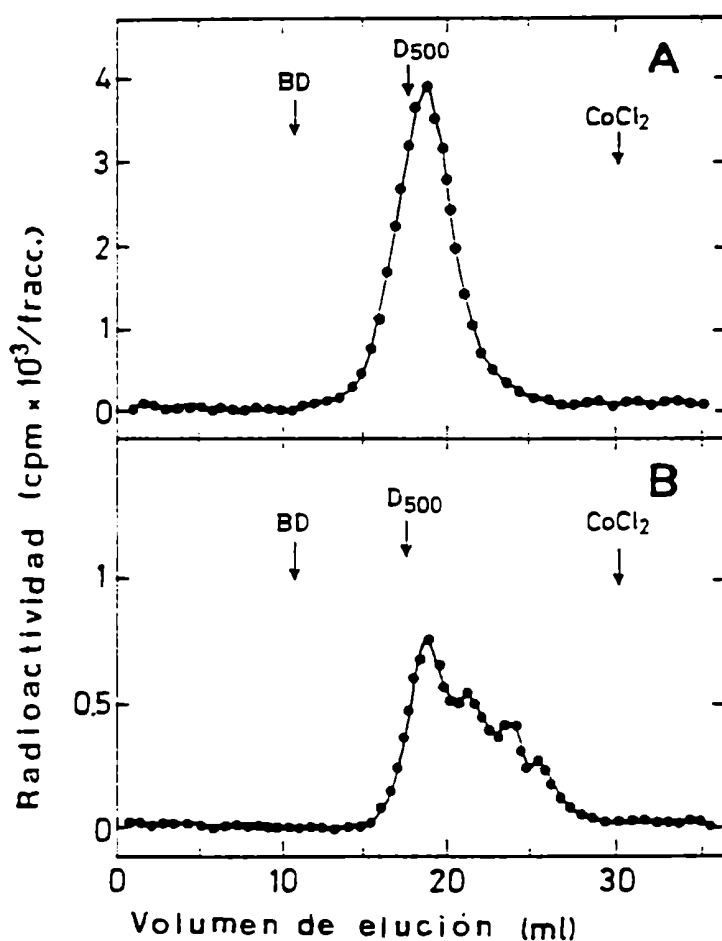
Al trabajar con UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc como precursor radioactivo, una serie de compuestos marcados fueron detectados en otras fracciones (Tabla XIV). Un glucano soluble en agua (120.000 cpm), ya observado anteriormente en previos estudios (García *et al.*,1974), fue por lejos el compuesto sintetizado más abundante. Filtrado a través de una columna de Bio-Gel A-5m produjo un perfil con un solo compuesto de tamaño idéntico al observado en la fracción 2 (500.000 Da) (Fig.50 A). Al filtrarlo por una columna de Amberlite MB3, se obtuvieron dos fracciones: una neutra que no se retiene (80.450 cpm) y otra cargada que se eluye con 0.8 M de NaCl (38.700 cpm) (Tabla XIV, Fracc.3). Este último material resultó insoluble en TCA 5 %, sugiriendo que podría estar asociado a una proteína ("Proteína intermediaria").

La fracción neutra no fue precipitable con TCA al 5 %. Ambas fueron insensibles al tratamiento con  $\alpha$  amilasa.

Por otra parte, la radioactividad asociada al precipitado celular luego de ser extraídas las células con solvente 1203 y lavadas con agua, se fraccionó en dos grupos luego de someterlas a un tratamiento alcalino (1 % NaOH, 5 min., 100°C): una fracción álcali soluble (44.767 cpm) (Tabla XIV, Fracc.4) y una fracción álcali insoluble, que se estimó se trataba de celulosa (62.560 cpm) (Tabla XIV, Fracc.5), un producto característico de estos microorganismos (García *et al.*,1974).

Filtrada por una columna de Bio-Gel A-5m, la fracción 4, produjo un perfil complejo con un compuesto de masa molecular de 500.000 dalton y una serie de compuestos de tamaño aparente menor (Fig.50 B). La fracción 4 también fue

retenida en una columna de intercambio aniónico mixto en un 80 %. Esta fracción cargada fue precipitable con TCA 5 %. La fracción 4 tampoco fue sensible al tratamiento con  $\alpha$  amilasa. Hidrólisis parcial (0,1 M HCl, 100° C, 1 hora) de todas las fracciones que contienen glucanos, produjeron glucosa y una serie de oligosacáridos de tamaño decreciente, al ser cromatografiados en papel con el solvente D. El menor de los oligosacáridos fue caracterizado como glucosil  $\beta(1-2)$  glucosa, soforosa, luego de ser reducido con borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>) y sometido a electroforesis con el buffer B (No mostrado).



**Fig.50:** Filtración por columna de Bio-Gel A 5m de las Fracciones 3 y 4 con marca en [<sup>14</sup>C]Glc, obtenida con células de *Acetobacter xylinum* electroporadas, como se indica en la Tabla XIV.

La Fracción 3 que contenía los productos solubles en agua, tanto cargados como no cargados (24.000 cpm) (A), y la Fracción 4 (11.000 cpm) (B) (Ver Tabla XIV), fueron filtradas a través de una columna de Bio-Gel A 5m. BD, azul dextrano y CoCl<sub>2</sub>, se usaron como indicadores de volumen de exclusión e inclusión total, respectivamente; D500, estándar frío de Dextrano de 500.000 de masa molecular aparente.

En los experimentos de incubación en dos etapas realizados con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc (Tabla XV), un interesante punto fue observar la transferencia de glucano radioactivo de la fracción 4 en la 1<sup>ª</sup> etapa a la fracción 8 luego de la segunda etapa y la correspondiente disminución en la fracción 9 (equivalente a la 4 en la 1<sup>ª</sup> etapa), sugiriendo una relación precursor-producto. Como en este experimento en particular los diferentes glucanos no fueron analizados en detalle, estos resultados deben tomarse como una hipótesis de trabajo.

La biosíntesis de los ciclosoforanos  $\beta$  1-2 ha sido cuidadosamente estudiada en los sistemas de *Rhizobium* y *Agrobacterium* (Zorreguieta *et al.*,1990; Zorreguieta y Ugalde, 1985). Esto sugiere que tal vez este glucano lineal (Amemura *et al.*,1985) seguiría una vía biosintética similar.

Por último, como todas estas fracciones no fueron degradadas con  $\alpha$ -amilasa, la posibilidad de estar trabajando con derivados de glucógeno quedó descartada.

#### IV.2.c.7. ESQUEMA GENERAL

La vía de biosíntesis del acetano y de otros sacáridos derivados, se presenta en la Figura 51. Las reacciones de 1 a 7 describen el ensamblado secuencial de la unidad repetitiva sobre un poliprenol-PP (Couso *et al.*,1982). La reacción 8 simplemente describe la transferencia del resto acetilo a la unidad repetitiva completa de manera general, ya que el número de grupos acetilo, las posiciones respectivas y el nivel al cual entra aún no está aclarado. La reacción 9 representa, también en forma general, el proceso de polimerización. No está claro aún si la unidad repetitiva es incorporada al extremo no reductor de la cadena de acetano creciente como tampoco de qué manera se regula su finalización, cómo es extrudada la cadena creciente y cómo se regula el tamaño de ésta que es muy regular (entre 2-4 millones de masa molecular aparente). Recientes estudios indican que la cadena de xantano crece por el extremo reductor (Ielpi *et al.*,1993), como se demostrara muchos años atrás para el antígeno-O del lipopolisacárido de *Salmonella* (Robbins *et al.*,1967). Las reacciones 10 y 11 se refieren a la formación del aceptor prenil-monofosfato, tanto por eliminación de un grupo fosfato por intermedio de una fosfatasa específica (Romero, 1977) como por fosforilación de un prenil libre por medio de una quinasa específica (ATP dependiente) (Romero *et al.*,1977b).

Las reacciones 12,13 y 14 se refieren a los derivados de galactosa, manosa y ácido glucurónicos mencionados anteriormente. La reacción 15 simplemente indica que tanto la celulosa (Ross *et al.*,1991) como los glucanos  $\beta$  (1-2) seguirían una vía de biosíntesis independiente.

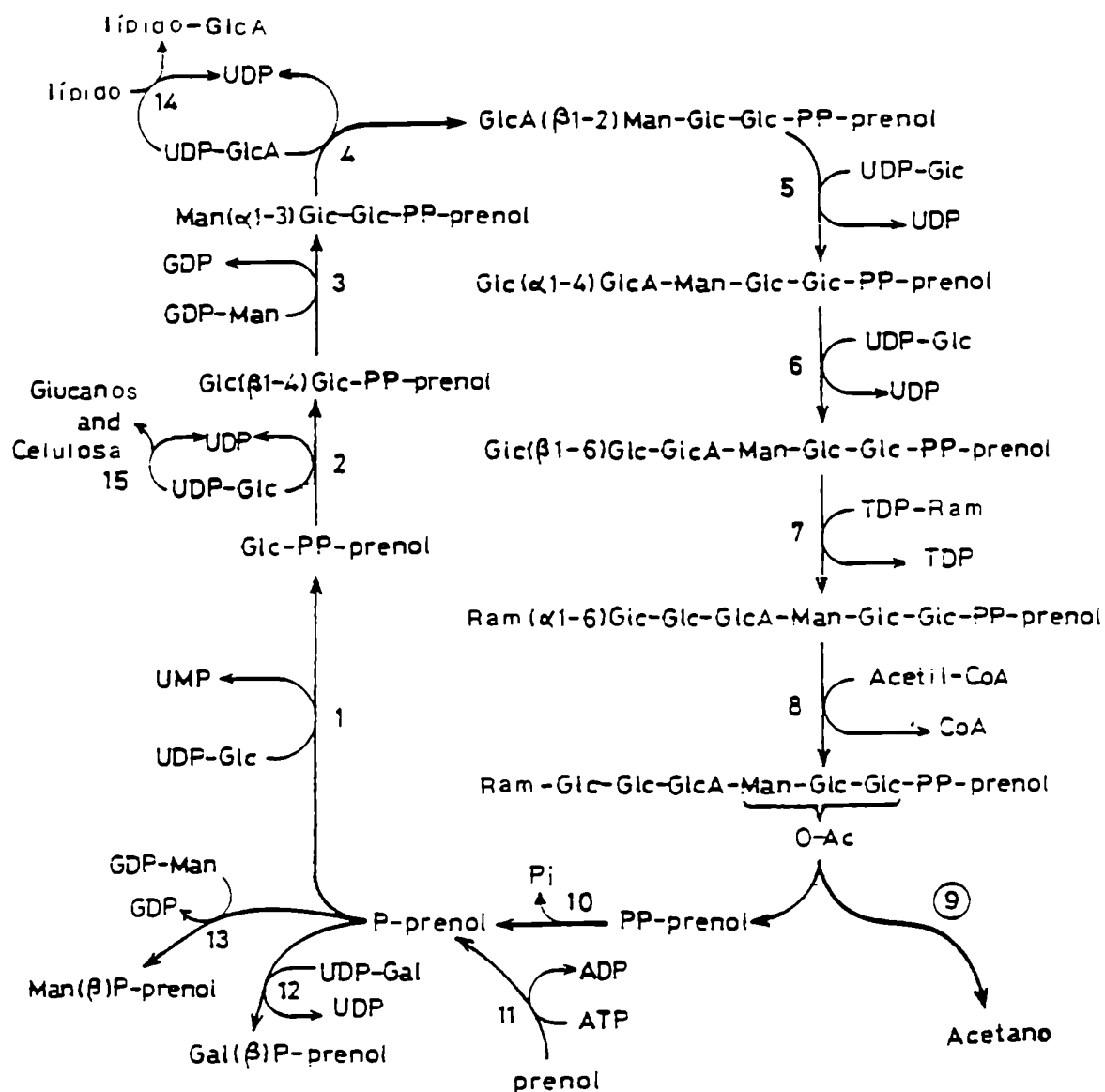


Fig.51: Esquema propuesto para las reacciones involucradas en la biosíntesis del acetano y de otros sacáridos mencionados en este trabajo.



## V. DISCUSION

Se ha descrito en trabajos anteriores que la cepa silvestre *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* 8002 (Nod<sup>+</sup>, Fix<sup>+</sup>, EPS<sup>+</sup>) produce un exopolisacárido de estructura conocida, idéntico al de la cepa emparentada *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* NA-30 también silvestre (Nod<sup>+</sup>, Fix<sup>+</sup>, EPS<sup>+</sup>) (Tabla I, Fig. 1) (Robertson *et al.*, 1981; Mc Neil *et al.*, 1986; Morris *et al.*, 1989). Dos cepas derivadas de la cepa 8002, *Rhizobium leguminosarum* 8401 (Nod<sup>-</sup>, Fix<sup>-</sup>, EPS<sup>+</sup>) y *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* 8401 pRL1JI (Nod<sup>+</sup>, Fix<sup>+</sup>, EPS<sup>+</sup>), previamente descritas, también producirían el mismo exopolisacárido que las anteriormente nombradas (Tabla I, Fig. 1) (Morris *et al.*, 1984).

De los resultados obtenidos de los estudios *in vivo*, presentados en la primera parte de este trabajo, pudimos observar que aquellas cepas con capacidad de sintetizar exopolisacáridos (EPS<sup>+</sup>) presentaban un fenotipo extremadamente mucoso (Fig.2), comprobando además que para el caso de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* la presencia o no de algún plásmido simbiote no afectaba dicha característica fenotípica, como es el caso entre la cepa silvestre *bv. phaseoli* 8002 (con el plásmido pRP2JI) y las cepas 8401 (curada del plásmido pRP2JI) o *bv. viciae* 8401 pRL1JI (con el plásmido simbiote pRL1JI) que son igualmente mucosoides, indicando que la información de la síntesis del EPS en esta especie se encuentra codificada cromosómicamente (Borthakur *et al.*, 1988). También fue posible observar el fenotipo de cepas mutantes en la síntesis del EPS como la cepa *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* RW4 y *Rhizobium meliloti* 7094, las cuales presentaron colonias muy pequeñas y secas en placa de Petri (Fig.2).

Al analizar los polisacáridos producidos por las cepas EPS<sup>+</sup> estudiadas en este trabajo, en cantidad, composición de azúcares y sustituyentes no glicosídicos (como acetatos y piruvatos), pudimos determinar que todos los exopolisacáridos presentaban la composición descrita para cada caso (Fig.1; Tabla II). Todas las cepas de *Rhizobium leguminosarum* utilizadas en este trabajo producirían el mismo EPS (Tabla II). Estos datos iniciales fueron muy útiles tanto para asegurarnos de que los polisacáridos producidos por estas cepas eran los mismos a lo previamente descrito (Robertson *et al.*, 1981; Mc Neil *et al.*, 1986; Morris *et al.*, 1989) como para tener en cuenta los posibles dadores de restos glicosídicos (UDPGlc, UDPGlcA, GDPMan, TDPRam, etc.) y no glicosídicos (acetil-CoA, PEP, etc) a utilizar en los ensayos *in vitro*.

En los estudios *in vitro* hemos utilizado a la cepa *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* NA-30 como sistema de referencia ya que parte de los estudios de biosíntesis ya habían sido realizados con anterioridad en nuestro laboratorio (J.C. Bossio, Tesis Doctoral). La experiencia con este tipo de estudios se tomó como punto de partida para realizar el estudio de la biosíntesis *in vitro* del EPS de las cuatro cepas emparentadas: *Rhizobium leguminosarum* 8401, *bv. phaseoli* 8002, *bv. phaseoli* RW4 y *bv. viciae* 8401 pRL1JI.

La idea principal de la primera parte de este trabajo fue tratar de demostrar que los mecanismos de biosíntesis del EPS y sus intermediarios eran análogos en todas estas cepas. Además y muy importante, estudiar la polimerización *in vitro* de la unidad repetitiva para dar el polisacárido final, y demostrar de manera inequívoca que los intermediarios lipídicos intervienen en forma directa en la síntesis del EPS en las cepas estudiadas. Esto último representó en su momento un verdadero desafío ya que esta etapa aún no había sido descrita para ningún *Rhizobium* ni *Agrobacterium* sp, generando entonces la posibilidad de investigar en la preparación de nuevos sistemas enzimáticos capaces de presentar actividad polimerizante.

Utilizando como preparados enzimáticos células tratadas con EDTA (sin shock frío y utilizados el mismo día de su preparación, ver Materiales y Métodos) de las cepas de *Rhizobium* nombradas, y nucleótido-azúcares radioactivos como dadores de restos glicosídicos en incubaciones *in vitro* a 10°C, fue posible obtener en todos los casos buenas incorporaciones de radioactividad al extracto 1203 (prenol-fosfoazúcares) (Tabla IV). Por análisis de esta fracción en electroforesis en papel, cromatografía en Bio-Gel P2 y cromatografía en columnas de DEAE-celulosa, se demostró que los productos incorporados eran idénticos a los anteriormente descritos con el sistema NA-30 (Bossio *et al.*, 1986; Bossio, 1989).

Inicialmente, se observó que al analizar los compuestos presentes en el extracto 1203 de las tres cepas 8002, 8401 y 8401 pRL1JI, tanto con marca en [<sup>14</sup>C]Glc como [<sup>14</sup>C]GlcA, luego de un tratamiento ácido débil, presentaron idénticos perfiles tanto al ser analizados por electroforesis en papel (Fig.4), como después de ser filtrados por columnas de Bio-Gel P2 (Fig. 5, 6, 7 y 8). Además, por cromatografía de los extractos 1203 sin ningún tratamiento previo en columnas de DEAE-celulosa, también se obtuvieron resultados análogos (Fig. 9, 10 y 11). Estos estudios iniciales, sugirieron que las tres cepas presentarían un sistema biosintético idéntico. Al analizar en mayor detalle los oligosacáridos presentes se demostró que los compuestos a1, A y A1 de las cepas 8002, 8401 y 8401 pRL1JI, respectivamente, se comportaban (por tamaño, carga específica, composición de azúcares. etc.) como

el octasacárido que representa la unidad repetitiva (Fig.1) y serían idénticos al compuesto "a" de la cepa NA-30, previamente descrito (Bossio *et al.*, 1986). El compuesto  $a_1$ , cuya estructura se estudió con mayor detalle por ensayos de permetilación confirmó este enfoque (Fig.21 y 22). Además, los compuestos  $b_1$ ,  $B$  y  $B_1$  se caracterizaron como los derivados mono-piruvilados de los octasacáridos  $a_1$ ,  $A$  y  $A_1$ , respectivamente y los compuestos  $c_1$ ,  $C$  y  $C_1$  como sus respectivos derivados dipiruvilados (Fig.5, 6, 7 y 8). Esto concuerda con la estructura propuesta para el EPS de estas cepas (Fig.1).

Otro compuesto formado durante la incubación en los tres casos fue un trisacárido, obtenido tanto con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  como en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$  (Fig.5, 6, 7 y 8). Estos trisacáridos se denominaron  $d_1$ ,  $D$  y  $D_1$  para el caso de las cepas 8002, 8401 y 8401 pRL1JI, respectivamente. Presentaron las mismas características que el trisacárido "d" de la cepa NA-30, previamente descrito (Bossio *et al.*, 1986). Al ser cromatografiado en papel se desglosó en dos componentes, los trisacáridos  $d_{1a}$ ,  $D_a$  y  $D_{1a}$  y sus derivados de mayor movilidad cromatográfica  $d_{1b}$ ,  $D_b$  y  $D_{1b}$ , respectivamente (Fig.16), con las mismas propiedades del trisacárido ( $d_1$ ) y su derivado acetilado ( $d_2$ ) de la cepa NA-30 (Bossio *et al.*, 1986), sugiriendo que los trisacáridos  $d_{1b}$ ,  $D_b$  y  $D_{1b}$  se tratarían de los derivados acetilados de los trisacáridos  $d_{1a}$ ,  $D_a$  y  $D_{1a}$ , respectivamente. También como en el caso de la cepa NA-30 al estudiar en mayor detalle la estructura del trisacárido  $d_{1a}$  de la cepa 8002, por permetilación, se concluyó que su estructura sería:  $(\text{GlcA} \rightarrow 4\text{GlcA} \rightarrow 4\text{Glc})$ . Por ensayos de reducción con  $\text{NaBH}_4$  de este compuesto con marca en  $[^{14}\text{C}]\text{glucosa}$  y posterior hidrólisis se obtuvo un solo componente,  $[^{14}\text{C}]\text{sorbitol}$ , sugiriendo que su extremo reductor es glucosa.

Además, por experimentos de degradación con glucosidasa de intestino de caracol del trisacárido acetilado  $d_{1b}$ , se llegó a obtener el disacárido  $\text{GlcA} \rightarrow 4\text{Glc}$  acetilado, indicando que el resto O-acetilo se encuentra en alguno de los dos primeros restos glicosídicos del extremo reductor (Fig.19), como lo indicaran otros autores que sugieren que el grupo O-acetilo se podría encontrar en la glucosa del extremo reductor (Kuo y Mort, 1986) o bien que estaría localizado en el primer resto de ácido glucurónico comenzando del extremo reductor (Canter Cremers *et al.*, 1991b) (Fig.1). No se intentó determinar en cual de los dos restos glicosídicos se encontraba. Además, a partir de idénticos ensayos realizados con el octasacárido  $a_1$  con marca tanto en  $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  como en  $[^{14}\text{C}]\text{GlcA}$  se pudo obtener, por degradación con glucosidasa, el mismo disacárido (no mostrado), confirmando la interrelación entre el octasacárido  $a_1$  y el trisacárido  $d_1$  de la cepa 8002.

La formación de derivados sacarídicos acetilados y piruvilados es significativo en el sentido de que esto indica que las preparaciones enzimáticas contienen los respectivos dadores fisiológicos (Acetil-CoA y PEP), previamente descritos en la cepa NA-30 y en otros sistemas como en *Xanthomonas campestris* (Ielpi *et al.*, 1981b, 1986).

Al utilizar [ $^{14}\text{C}$ ]Acetil-CoA como dador de resto O-acetilo, se vió que el acetilo se incorpora a todos los compuestos anteriormente nombrados, octasacáridos y trisacáridos (Fig.25 C), confirmando que la entrada de este resto no glicosídico sería a nivel de lípido-azúcares.

En este estudio se encontraron, en las tres cepas, otros compuestos no relacionados a la biosíntesis de los exopolisacáridos. Uno de ellos fue obtenido en el extracto 1203 sólo cuando se usaba UDP[ $^{14}\text{C}$ ]GlcA como precursor radioactivo. Al analizar esta fracción por cromatografía en columna de DEAE-celulosa, éste compuesto, eluye como un único pico a 0,3 M de acetato de amonio (Fig.9 A, 10 A y 11 A). Esta posición indicaría la presencia de dos cargas negativas, una de ellas del grupo ácido urónico. Un compuesto de similares comportamientos, caracterizado como prenol-P-GalA, se describió en el sistema de la cepa NA-30 (Russomando *et al.*, 1992), pero en este caso parecería contener ácido glucurónico, aunque no se estudió con mayor detalle.

Los otros compuestos se obtuvieron sólo cuando se marcaba a partir de UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc, y resultaron ser los glucanos neutros cíclicos  $\beta(1-2)$  sintetizados por estas cepas (Fig. 4 B, C y D y Fig.9 B, 10 B y 11 B). En todos los casos fueron detectados y en cierta forma caracterizados, pero un estudio más detallado de su estructura y de su síntesis se está llevando a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr. Luis Ielpi.

Además y muy importante, al analizar los sobrenadantes de incubación, en ensayos donde se utilizó tanto UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc como UDP[ $^{14}\text{C}$ ]GlcA como dador radioactivo, se detectó en todos los casos, por cromatografía en columnas de Bio-Gel A-5m, presencia de polímero sintetizado *in vitro*, EPS, con el mismo tamaño que el sintetizado *in vivo* (Tabla IV; Fig.23). Esta es la primera vez que se describe biosíntesis *in vitro* del producto final, EPS, en cepas de *Rhizobium leguminosarum*.

Como se obtuvo tanto con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc como en [ $^{14}\text{C}$ ]GlcA indicaría que presenta la misma composición glicosídica que el sintetizado *in vivo* (Tabla IV).

Al analizar en mayor detalle el polisacárido sintetizado *in vitro* por la cepa 8002 por análisis de permetilación, se demostró que presenta la misma estructura que la propuesta para el EPS de esta cepa (Fig.24) Todo esto indicaría que se

sintetizó *in vitro* un polisacárido de tamaño, composición y estructura glicosídica idéntica al descrito anteriormente para esta cepa (Mc Neil *et al.*, 1986) (Fig.1).

También se incorporó [ $^{14}\text{C}$ ]acetilo a la fracción de polisacárido sintetizado *in vitro* a partir de incubaciones en presencia de [ $^{14}\text{C}$ ]-acetilCoA, en las tres cepas estudiadas, indicando que éste se sintetizaría a partir de la polimerización de unidades repetitivas previamente acetiladas, como era esperable (Fig.28 B).

Se realizaron incubaciones a 0°C en presencia de nucleótido-azúcares marcados con el objeto obtener condiciones de ensayo en donde fuera posible perturbar al sistema enzimático de tal manera que permitiera obtener otros intermediarios diferentes al octasacárido y al trisacárido. Se obtuvieron buenas incorporaciones de radioactividad al extracto 1203 (Tabla V). A raíz del análisis de estos extractos, se pudo demostrar que a temperaturas mas bajas de 10°C, si bien la biosíntesis del EPS no funcionó permitió la obtención de todos los compuestos restantes, presuntos intermediarios (Fig.12 y 13), desde la 1ª glucosa hasta el octasacárido. Esto permitió aislar de manera simple todos estos compuestos entre sí (Fig. 14) y proponer un esquema con todos los probables pasos intermedios (Fig. 52).

Es importante aclarar que en ningún momento se realizó un estudio secuencial o la obtención de todos los intermediarios por adición secuencial de restos glicosídicos, sino que se "congeló" el sistema de biosíntesis al disminuir la temperatura de incubación a 0°C, resultando en la obtención de toda la gama de oligosacáridos que estaban en la "línea de montaje", sin seguir de manera dinámica el agregado de cada resto glicosídico, como se lograra anteriormente con el sistema de *Acetobacter xylinum* (Couso *et al.*, 1987), o el sistema de *Xanthomonas campestris* (Ielpi *et al.*, 1993).

Finalmente, gracias a los resultados de las incubaciones en dos etapas (Tabla VII), fue posible relacionar de manera directa e inequívoca la participación de los prenil-difosfato-azúcares en la biosíntesis del EPS de *Rhizobium leguminosarum*

Como era de esperar las tres cepas producen EPS marcado en la 1ª etapa, pero también en la 2ª etapa en ausencia de nucleótido azúcares. Se debe destacar que toda la radioactividad presente en la 2ª etapa proviene de la que se incorporó a las células en la 1ª. Parte de esta radioactividad fue transferida a polímero, pero parte se recuperó como octasacárido libre, tal vez por un proceso degradativo (Tabla VII). La liberación de unidades repetitivas libres ha sido descrita en otros sistemas y parecería ser un proceso fisiológico común, que aún permanece sin explicación. Un ejemplo de esto es la liberación del octasacárido piruvilado, acetilado y succinilado que corresponde a la unidad repetitiva del EPS (succinoglicano) de *Rhizobium*

*meliloti* (Zevenhuizen *et al.*, 1983), de *Agrobacterium* sp (Hisamatu *et al.*, 1982) y de cepas mutantes de *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10c3 (Hisamatsu *et al.*, 1978).

Con respecto a la adición de dadores de restos no glicosídicos como acetil-CoA y PEP, se pudo observar que éstos al encontrarse en exceso causan efectos a nivel de la síntesis de intermediarios lipídicos e inhiben la síntesis de polisacárido (Tabla VI). Al analizar los intermediarios de biosíntesis, se pudo ver que en el caso del acetil-CoA, en concentraciones de 350  $\mu\text{M}$ , inhibió la formación de los intermediarios de biosíntesis mayores al poliprenol-PP-trisacárido (Fig.25 y Fig.26 A y B) y sin variar su grado de acetilación con respecto al control (Fig.27 A y B). Además inhibe la síntesis de polímero (Fig.28 A). Esto indica que su regulación sería tal vez a nivel de las enzimas transglicosidasas que se encargan de la transferencia de las restantes glucosas a partir del trisacárido. No se estudió este efecto en mayor detalle (Ver mas adelante con sistema de *Acetobacter xylinum*).

Por otro lado, el PEP también inhibiría la síntesis del polisacárido *in vitro* (Tabla VI) en concentraciones de 312  $\mu\text{M}$ . Sin embargo en este caso no se observa detención de alguna etapa de biosíntesis de los intermediarios lipídicos sino que parecería haber una exagerada piruvilación del octasacárido, obteniéndose prácticamente sólo octasacárido dipiruvilado (C1, cepa 8401 pRL1JI) (Fig.26 y 29). En este caso parecería actuar a un nivel que no es sobre el proceso de piruvilación sino tal vez directamente sobre las enzimas polimerizantes o polimerasas. Todos estos datos aún están poco claros. La disminución en la cantidad de octasacárido dipiruvilado observada al incubarse con exceso de acetil-CoA (Fig.26 A y B), parecería indicar que la doble piruvilación es un requisito indispensable para poder polimerizar. Sin embargo, paradójicamente, el exceso de PEP también inhibe la formación de polímero (Tabla VI), aunque en este caso se estimula la síntesis del octasacárido dipiruvilado (Fig. 26 C).

Estos resultados confirman lo observado previamente al incubarse en exceso de acetil-CoA o PEP con el sistema de *Xanthomonas campestris*, donde también se produce inhibición de la síntesis del xantano *in vitro* (Ielpi y Dankert, resultados no publicados).

Por otra parte, se vió que a partir de células que habían sido cultivadas en condiciones de mayor aereación (relación 1:10) se obtuvieron preparados enzimáticos más eficientes en la síntesis *in vitro* del EPS (Fig.30 y 31). Esto indica que la participación del oxígeno es un factor importante a tener en cuenta en la obtención de células más eficientes en la síntesis de EPS *in vitro*.

Este fenómeno también fue observado *in vivo* al utilizar la cepa de *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* 8002, donde se pudo detectar aumentos en la síntesis del EPS hasta del 100% en cultivos donde la aereación fue mayor (No mostrado).

Se estudió además el efecto de la temperatura de incubación y se observó que temperaturas cercanas a los 20°C serían óptimas para la síntesis *in vitro* del polímero (Fig.30 y 31). Por último al estudiar el efecto de la edad de los preparados enzimáticos se observó que a lo largo del tiempo disminuye dramáticamente la capacidad de polimerización de la unidad repetitiva *in vitro* de los mismos y aumenta concomitantemente la incorporación a intermediarios lipídicos (Fig.32). Una posible respuesta es que con repetidas congeladas y descongeladas tal vez en estos sistemas se desacoplan las enzimas encargadas de la polimerización o sufren una rápida degradación por parte de proteasas.

A continuación resumiremos muy brevemente el proceso de biosíntesis del EPS en la cepa *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* 8002 y posiblemente las cepas *Rhizobium leguminosarum* 8401 y *bv. viciae* 8401 pRL1JI. El ciclo biosintético se presenta en forma de esquema (Fig.52). A raíz de los compuestos obtenidos en ensayos de incubación a 0°C con marca en [<sup>14</sup>C]glucosa (de la glucosa libre hasta el octasacárido a1, cepa 8002), podemos inferir que los pasos biosintéticos seguirían una secuencia indicada con forma de ciclo. Como podemos observar las reacciones del 1 al 3 y del 5 al 9 se refieren a la supuesta "entrada secuencial" de los diferentes restos glicosídicos a partir de UDPGlc ó UDPGlcA para formar la unidad repetitiva (octasacárido) unido al lípido intermediario por un enlace difosfato. La reacción 4, representa la entrada del resto acetilo a nivel del trisacárido; las reacciones 10 y 11, la entrada de ambos restos cetil-piruvatos al octasacárido formado. Cabe aclarar que la entrada del 1º resto cetil-piruvato podría ser a nivel del heptasacárido. La reacción 12 representa el proceso de polimerización de las unidades repetitivas para dar el producto final, exopolisacárido.

No se ha estudiado en este sistema el sentido de crecimiento del EPS, pero a raíz de los resultados obtenidos en este tipo de estudios con el sistema del xantano sintetizado por *Xanthomonas campestris*, que indican que este polisacárido crece a partir de su extremo reductor (Ielpi *et al.*, 1993), suponemos que en el sistema de *Rhizobium leguminosarum* debería ser igual.

La reacción 13, representaría la supuesta defosforilación de lípido difosfato resultante, por medio de una fosfatasa específica, para dar como producto el lípido monofosfato aceptor que regresa al ciclo. Esta etapa se supone sería idéntica a lo visto anteriormente en *Acetobacter xylinum* para la síntesis del acetano (Romero *et*

*al.*, 1977a). La reacción 14, esquematiza la síntesis de Glucanos  $\beta$  (1-2) por medio de UDPGlc como dador a través de una supuesta proteína intermediaria ( Trabajo en colaboración con el grupo del Dr. Luis Ielpi).

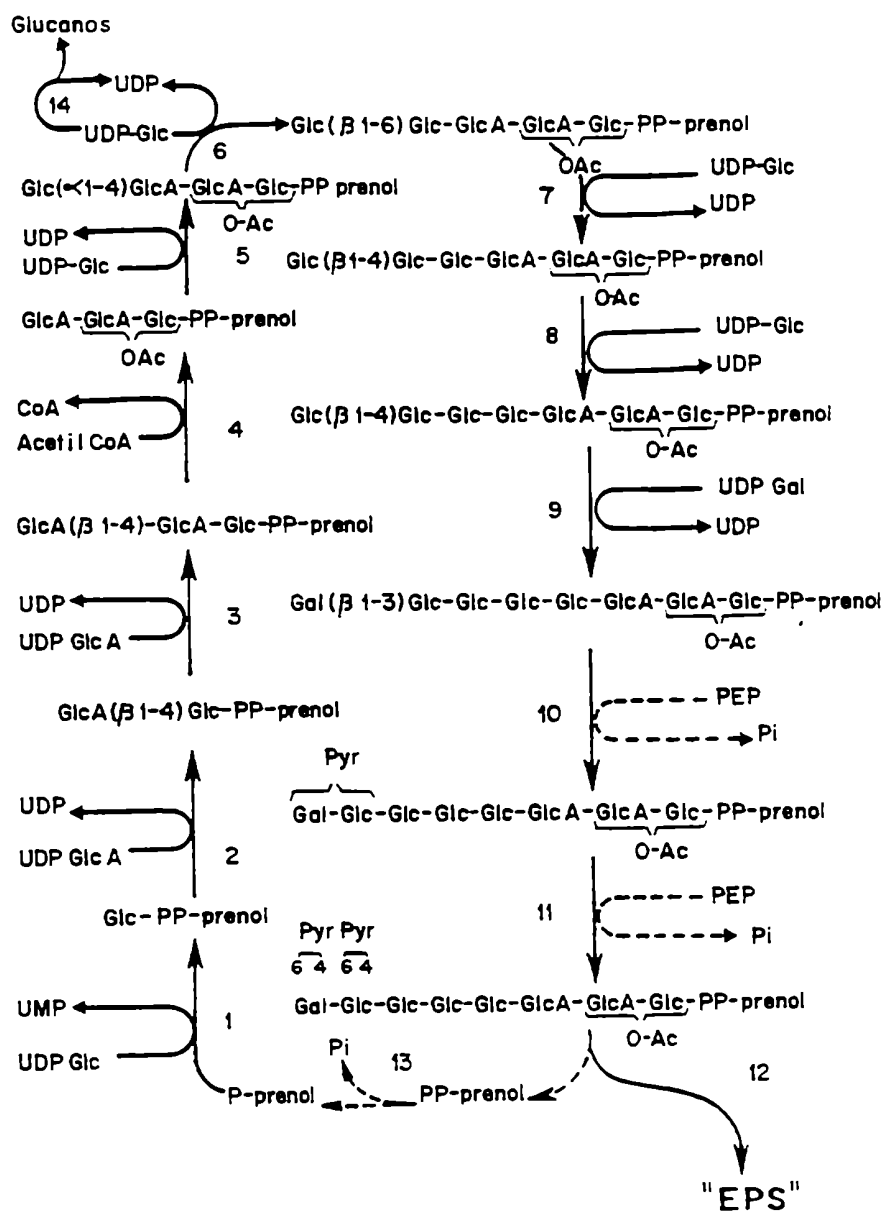


Fig. 52: Esquema propuesto para las reacciones involucradas en la biosíntesis del EPS de la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* 8002, y muy posiblemente de las cepas 8401 y 8401 pRLJI. También se hace mención de la participación del nucleótido azúcar UDPGlc en la síntesis del Glucano  $\beta$  (1-2).



En una segunda parte de esta tesis, se describe la utilización de una nueva técnica para obtener un preparado enzimático capaz de sintetizar EPS *in vitro*. La idea básica consistió en tratar de introducir a las células los nucleótido azúcares precursores de manera de dañarlas lo menos posible. La electroporación pareció una técnica adecuada, pues gran parte de las células así tratadas permanecen viables. Esta técnica es muy utilizada para introducir grandes moléculas (fragmentos de DNA) al interior celular (Potter, 1988), y parece causar menor daño a la cubierta celular que el tratamiento con EDTA, conocido ya por producir permeabilización de las células, pero también por liberar una serie de compuestos del interior de la célula, tales como polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos (Leive, 1974). Utilizando células electroporadas como preparados enzimáticos se pudo obtener síntesis *in vitro* de EPS en cantidades sustanciales en varios sistemas presentados en este trabajo de Tesis, en alguno de los cuales no fue posible obtener actividad polimerizante al utilizar células tratadas con EDTA como preparado enzimático..

El primer sistema utilizado para probar la efectividad del método fue el de *Rhizobium leguminosarum*. Se usaron dos cepas silvestres, *bv. phaseoli* 8002 y *bv. trifolii* NA-30 y además la cepa *bv. phaseoli* RW4 (EPS<sup>-</sup>, Nod<sup>+</sup>, Fix<sup>+</sup>), con la cual no se pudieron obtener buenas incorporaciones de radioactividad al usar células tratadas con EDTA como preparado enzimático. Las cepas silvestres mostraron ser muy eficientes en incorporación de radioactividad, tanto a partir de UPD[<sup>14</sup>C]Glc como de UDP[<sup>14</sup>C]GlcA, a extracto 1203 y a polímero final (Tabla VIII). La incorporación de radioactividad resultó ser extremadamente grande en comparación con lo sintetizado por estas mismas cepas al usar células tratadas con EDTA (Ver Tabla IV). Por otro lado, los compuestos presentes en el extracto 1203 en ambas cepas resultaron ser idénticos a los observados en incubaciones con células tratadas con EDTA. Esto significa que el sistema de células electroporadas es muchísimo más eficiente y que sus enzimas polimerizantes se encuentran muy activas.

Al estudiar la cepa RW4, se observó que no hubo formación de polímero, como era esperable (Tabla VIII). Además hubo una considerable incorporación de radioactividad al extracto 1203 con respecto a la cepas silvestres 8002 y NA-30 (Tabla VIII). Al analizar los compuestos presentes en este extracto se pudo ver que con ambas marcas ([<sup>14</sup>C]Glc y [<sup>14</sup>C]GlcA) se formaba un octasacárido dipiruvilado (en poca cantidad), un heptasacárido monopiruvilado y un trisacárido (todos a nivel de prenoil-fosfo-azúcar) (Fig.33). Los glucanos cíclicos  $\beta(1-2)$  sólo se observaron como era de esperar con marca en [<sup>14</sup>C]Glc. Estos resultados fueron muy interesantes en el sentido de que indicarían que en esta mutante se sintetizan los

intermediarios de biosíntesis completos pero por alguna razón en mucha menor cantidad con respecto a la cepa silvestre 8002. Estos resultados sugieren que tal vez no se llegue a formar polímero o que se sintetiza tan poco que se hace imposible detectarlo. Se debe recordar que la mutante RW4 se obtuvo por mutagénesis de la cepa 8002 con el transposón Tn5 en el sitio pss, ubicado cromosomalmente (del inglés: polysaccharide synthesis), con lo cual estaría indicando que el producto de ese gen podría intervenir en la activación de la polimerasa o en una regulación positiva que aumentaba la actividad de síntesis de intermediarios lípido-azúcar, vía activación transcripcional de las enzimas intervinientes o activación post-traducciona l de las mismas.

En la Introducción, se mencionó que habitualmente se consideran equivalentes a las funciones de los productos de los genes pssA en *R. l. bv. phaseoli* y exo Y en *R. meliloti*. Ambos parecen regular la síntesis del polímero. Sin embargo, un trabajo reciente del grupo de Walker (Reuber y Walker, 1993) ha demostrado que el producto del gen exo Y, juntamente con el del exo F, participa en la transferencia de Gal-1-P al preno l-P intermediador, en tanto que en esta tesis se demostró que en la cepa *R. l. bv. phaseoli* RW4, una mutante pssA<sup>-</sup>, parece estar bloqueada en su capacidad polimerizante, pero continúa siendo capaz de formar a nivel de lípido-intermediario la unidad repetitiva (octasacárido dipiruvilado), aunque en menor cantidad comparada con la cepa silvestre 8002. Esto podría significar que en las dos especies la regulación se hace a distinto nivel o que en realidad es más compleja e interviene más de un mecanismo.

El sistema de *Rhizobium meliloti* fue el segundo en ser utilizado con este sistema de células electroporadas. Inicialmente se trabajó con la cepa silvestre Rm 1021. Se vió que en incubaciones realizadas en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]Glc, tanto con células tratadas con EDTA como con células electroporadas, se obtuvieron buenas incorporaciones de radioactividad a extracto 1203 (Tabla IX). Al analizar los compuestos presentes por TLC, los productos obtenidos en ambos casos eran idénticos (Fig.34, 1 y 2; Fig.35). En ambos casos se observó un sistema de biosíntesis de derivados lipídicos igualmente funcional aunque demostró ser cuantitativamente más eficiente el sistema de células electroporadas (Tabla IX, exp 1 y 2). En ambos casos se sintetizó un octasacárido, Octa, posiblemente la unidad repetitiva, y su derivado acilado Octa.A, como así otros compuestos no bien caracterizados. Sin embargo, al analizar los sobrenadantes de incubación, sólo en el caso de las células electroporadas se observó formación de polímero *in vitro* (Tabla IX, exp.1 y 2; Fig.36 A).

Al estudiar la estructura del Octa y la del polímero por ensayos de permethylación, se observó que este último contenía la estructura del primero a excepción de una nueva banda con la movilidad del 2,3 di-O-metil glucosa (Fig. 37 A). Se confirmó que el segundo se sintetizaba por la polimerización del octasacárido a través de la formación de un enlace glicosídico entre el carbono 1 de la galactosa del extremo reductor de la unidad repetitiva y el carbono 4 del cuarto resto glicosídico, glucosa, de acuerdo a la estructura propuesta para este EPS (Fig.1 B) (Fig.37 A y B).

Este resultado ha sido muy interesante por que se trata de la primera vez que se describió formación de polímero (succinoglicano) *in vitro* en *Rhizobium meliloti*.

Una confirmación de este enfoque se obtuvo al complementar *in vitro* la cepa mutante exo B de *Rhizobium meliloti* Rm 7094 (que carece de la enzima UDP-Gal 4 epimerasa). Si UDP[<sup>14</sup>C]Glc se agrega *in vitro*, en presencia de UDP-Gal, usando células tratadas con EDTA, la mutante es complementada *in vitro* ya que se forman los intermediarios de biosíntesis extraíbles con el solvente 1203 (Uttaro *et al.*, 1993). Lo mismo es observado al utilizar células electroporadas pero sólo en este caso se obtuvo polimerización de la unidad repetitiva (OctaA), para dar el polisacárido final (succinoglicano) (Tabla IX; Fig.36 B).

Un aspecto interesante es que en este último caso la cantidad de polímero formado fue mucho mayor con respecto al obtenido al utilizar en estas mismas condiciones a la cepa silvestre Rm 1021 (Tabla IX; Fig.36 A y B), indicando que los aceptores endógenos (lípidos intermediarios) se encontraban vacíos, ya que el sistema de biosíntesis se encuentra bloqueado en la entrada del 1º resto glicosídico, galactosa. Esto concuerda con lo informado recientemente por el grupo de Walker al utilizar esta mutante exo B en ensayos *in vitro* semejantes, pero con células tratadas con EDTA, en donde sólo detectó incorporación de radioactividad a nivel de lípidos intermediarios (Reuber y Walker, 1993).

Dos controles importantes fueron realizados con el objeto de confirmar que la mutante Rm 7094, era realmente mutante exo B (UDP-Gal 4 epimerasa<sup>-</sup>). En el primer control, se incubó sólo en presencia de UDP[<sup>14</sup>C]Glc y no se observó formación de ningún intermediario de biosíntesis del succinoglicano (Tabla IX, exp.3; Fig.38). pero se pudieron observar otros compuestos. En primer lugar, gran cantidad de productos con mayor movilidad que la glucosa en cromatografía por TLC, que no fueron caracterizados (Fig.38 B). En segundo lugar, se obtuvieron compuestos de poca movilidad cromatográfica que fueron caracterizados como glucanos  $\beta(1-2)$  también extraíbles con el solvente 1203 (Fig.38 B).

En el segundo control, incubando en presencia únicamente de UDP[<sup>14</sup>C]Gal, se obtuvieron resultados muy interesantes. Por un lado se detectó formación de polímero con marca en [<sup>14</sup>C]Gal (Tabla IX. exp.5). También se obtuvo incorporación de radioactividad a extracto 1203 y el análisis de dicho material por TLC indicó que se habían formado el compuesto Octa.A. y otros compuestos de menor movilidad cromatográfica (Fig.38 A). Estos últimos compuestos al ser cromatografiados por columnas de Bio-Gel P4, mostraron un volumen de elución correspondiente a polímeros de 3 y 4 unidades de octasacárido (OctaA), llamados Octa3 y Octa4, respectivamente (Fig.39 A y B). Estos compuestos presentan carga asociada, ya que quedan retenidos al ser cromatografiados a través de una columna de resina mixta (Amberlite MB 3) (no mostrado), eluyendo posteriormente con sales (0.5 M NaCl), lo que significa que deben tener sustituyentes no glicosídicos que les confieren carga, como por ejemplo, restos cetil-piruvatos. Estos compuestos fueron descritos anteriormente *in vivo* al ser purificados de los sobrenadantes de cultivo (Battisti *et al.*, 1992). Se sabe que son fisiológicamente liberados por las bacterias y fueron llamados LMW (del inglés: low molecular weight polysaccharides) y además el compuesto formado por cuatro unidades repetitivas, succinilado y piruvilado (Octa4), cumple una función muy importante semejante a la del succinoglicano durante el proceso de infección de *Rhizobium meliloti* a su planta hospedadora, alfalfa (Battisti *et al.*, 1992). Se detectaron inicialmente en bacterias de *Rhizobium meliloti* mutantes en la síntesis del succinoglicano pero que sin embargo tenían capacidad de nodular y fijar nitrógeno en alfalfa (Nod<sup>+</sup>, Fix<sup>+</sup>), lo que sugirió que de alguna manera son requeridos y además pueden suplir la falta del succinoglicano en el proceso de nodulación. Al agregar el Octa4 en inoculaciones *in vivo* conjuntamente con una cepa mutante en la síntesis del succinoglicano que naturalmente no puede nodular (EPS<sup>-</sup> y Nod<sup>-</sup>), éste compuesto le da capacidad de nodular a esta bacteria mutante (EPS<sup>-</sup> y Nod<sup>+</sup>), con una frecuencia semejante a la de una bacteria silvestre (Battisti *et al.*, 1992).

Al analizar los sobrenadantes de incubación también se encontraron Octa3 y Octa4 (Fig.40) y presentarían idénticas características a lo observado a nivel de lípido-azúcar. Esto significa entonces, que los compuestos Octa3 y Octa4 serían sintetizados vía prenil-difosfato-azúcares y liberados al exterior durante la incubación por algún mecanismo desconocido tal vez semejante al que da como resultado el succinoglicano, en donde, según el caso, se polimerizan 3, 4 ó ≈2.000 unidades repetitivas que dan como resultado los compuestos "LMW" o el succinoglicano, respectivamente (Fig.53). Otra posibilidad es que existan dos tipos de

polimerasas que trabajen en paralelo, una que sintetiza los LMW y la segunda el succinoglicano a partir del mismo sustrato (poliprenol-PP-OctaA). Finalmente una tercera posibilidad es también dada por la presencia de endoglucanasas (endo- $\beta$ -1,3-1,4-glucanasas), previamente descritas (Becker *et al.*, 1993), que degraden parcialmente un producto de mayor masa molecular.

También se encontró este tipo de compuestos en la cepa silvestre Rm 1021 (Datos no mostrados).

No se pudieron realizar con plantas de alfalfa ensayos *in vitro* de la actividad biológica de estos compuestos Octa3 y Octa4 obtenidos *in vitro*, ya que las cantidades obtenidas (del orden de los picomoles) fueron muchísimo menores a las requeridas (del orden de los micromoles) (Battisti *et al.*, 1992).

Por último, se realizaron ensayos de incubaciones en dos etapas con la cepa Rm 7094 (exo B<sup>-</sup>) que demostraron claramente que los prenil-difosfato-OctaA. intervendrían como intermediarios en la síntesis del succinoglicano final y además del OctaA, Octa3 y Octa4 libres (Tabla X; Fig.41). Esto se dedujo al observar que la cantidad de compuestos extraíbles por el solvente 1203 en la 1<sup>a</sup> etapa fue superior que en la 2<sup>a</sup>, demostrando que los intermediarios lipídicos acumulados durante la 1<sup>a</sup> etapa fueron utilizados en parte en la 2<sup>a</sup> etapa, para producir el polímero, por una actividad de polimerización del octasacárido a nivel de prenil-difosfato-OctaA. No obstante, la diferencia de radioactividad entre los extractos 1203 de la 1<sup>a</sup> y la 2<sup>a</sup> etapa no fue sólo justificable con la formación de polímero (Tabla X, Fracción 6, 2.750 cpm), hubo otros componentes que fueron originados o estaban presentes en el extracto de la 1<sup>a</sup> etapa y no necesariamente fueron transformados en polímero (Tabla X, Fracción 6, 20.700 cpm). Dichos compuestos fueron encontrados en la fracción 6 conjuntamente con el polisacárido y son los siguientes: trisacárido acetilado, OctaA, Octa3 y Octa4 libres y parte de un compuesto no relacionado a la síntesis del succinoglicano, el glucano  $\beta$ (1-2). Esto crea una situación semejante a la vista anteriormente en el ensayo de complementación *in vitro* con la cepa Rm 7094 (Tabla IX, exp. 6 y Fig.40). Es un resultado más a favor de que a excepción del glucano todos estos compuestos liberados al medio también se sintetizan via lípido-azúcares intermediarios al igual que el succinoglicano. Aunque una contribución via endoglucanasas no se descarta.

En la Fig. 53 se presenta el conjunto de los pasos de la síntesis del succinoglicano de *Rhizobium meliloti*. Las reacciones que involucran la síntesis del prenil-PP-octasacárido (de la 1<sup>a</sup> a la 11<sup>a</sup>) fueron descritas en trabajos anteriores, como es el caso específico de la entrada del primer grupo glicosídico entrante

(galactosa) a partir de UDPGal que se transfiere como Gal-1-P a un lípido-monofosfato en la membrana, liberando UMP y formando el primer intermediario de biosíntesis del succinoglicano, el lípido-difosfato-Gal (Fig.53, reacción 1); la entrada de los restantes restos glicosídicos (glucosa) a partir de UDPGlc para formar el trisacárido: Glc--4Glc--3Gal (Fig.53, reacciones de 2 y 3 continuas) y la entrada de los restos glicosídicos siguientes (glucosa) para completar hasta el octasacárido a partir de UDPGlc (Fig.53, reacciones de 4 a 11 continuas) (Tolmasky *et al.*, 1980; Tolmasky *et al.*, 1982).

En un espectacular trabajo reciente realizado por el grupo de Walker, en donde se pudieran obtener todas las mutantes de los genes involucrados en la síntesis del succinoglicano, fue posible describir desde el punto de vista tanto genético como bioquímico todos los pasos de síntesis de la unidad repetitiva a nivel de lípido-azúcar producida por *Rhizobium meliloti*, desde la reacción 1 a la 11 en forma secuencial (Reuber y Walker, 1993; Glucksmann *et al.*, 1993a).

Sin embargo el grupo de Walker no logró obtener polimerización *in vitro* y no tubo mas remedio que referirse a resultados *in vivo* sobre ciertos genes que estarían involucrados en la polimerización de la unidad repetitiva y transporte del producto final al exterior celular (Reuber y Walker, 1993; Glucksmann *et al.*, 1993b).

En este trabajo nos hemos dedicado al estudio de los productos involucrados en las últimas reacciones que no habían podido ser detectadas anteriormente por ningún grupo de trabajo. Estas comprenden en general el paso 12, donde dependiendo del grado de polimerización de la unidad repetitiva (n) se obtendrá: el octasacárido libre (n=1), los polímeros de bajo peso molecular Octa3 y Octa4 (n=3 y n=4, respectivamente) o el producto de polimerización de muchas unidades repetitivas (n≈2000), succinoglicano (Fig.53). No se estudió el sentido de elongación.

La reacción 13, postula la intervención de una fosfatasa específica que sacaría un grupo fosfato semejante a lo observado anteriormente en el sistema de *Acetobacter xylinum* (Romero, 1977).

Por último, la reacción 14, indica que los glucanos  $\beta(1-2)$  presentan una vía biosintética independiente, previamente descrita en el caso de *Rhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* (Zorreguieta *et al.*, 1990; Zorreguieta y Ugalde, 1985).

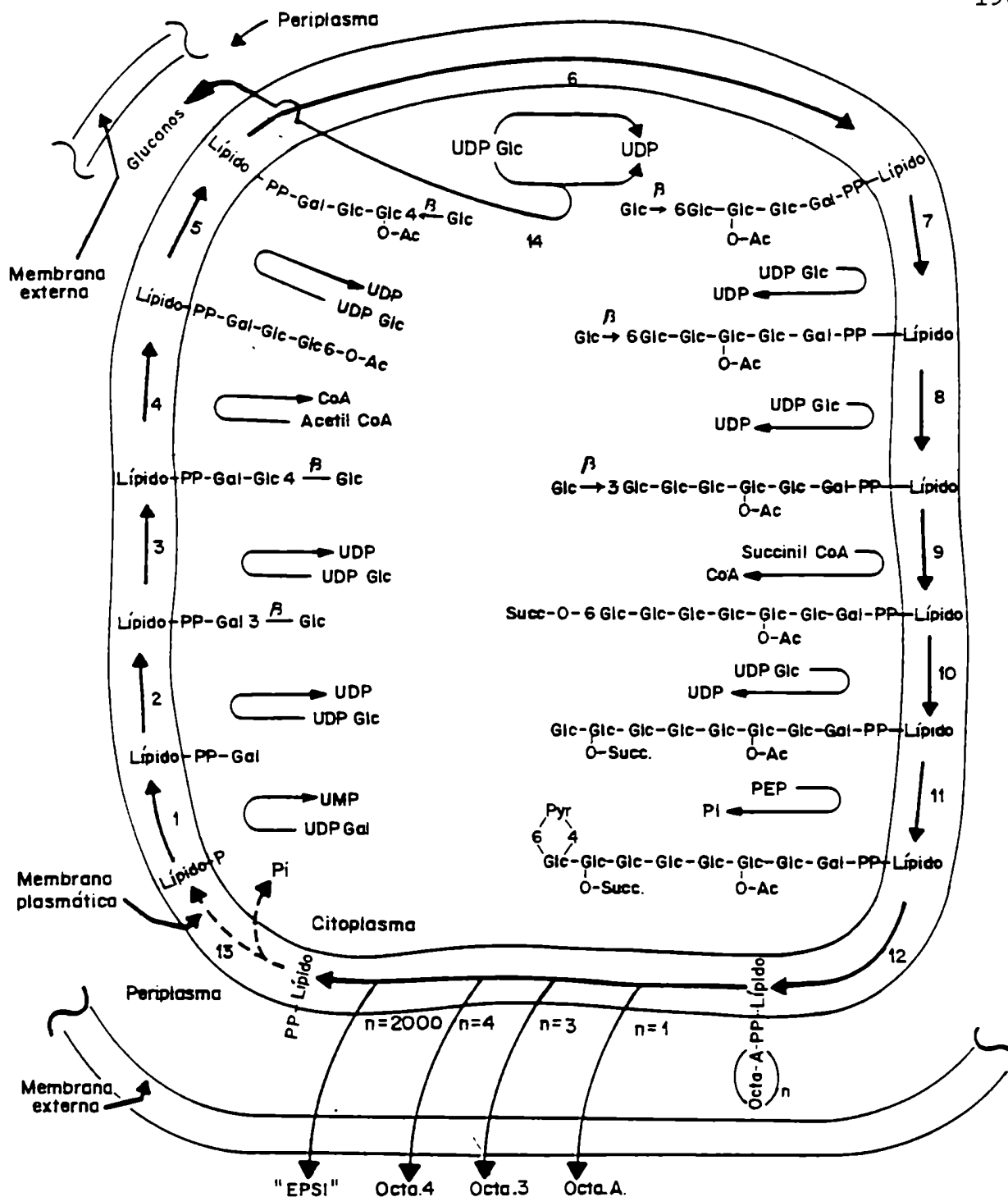


Fig.53: Esquema propuesto para las reacciones involucradas en la biosíntesis del succinoglucano de *Rhizobium meliloti*. Las reacciones de 1 a 11 fueron descritas previamente en trabajos anteriores realizados por otros grupos, en forma parcial (Tolmasky *et al.*, 1980; Tolmasky *et al.*, 1982) y últimamente en forma detallada (Reuber y Walker, 1993; Glucksmann *et al.*, 1993a; Glucksmann *et al.*, 1993b). La orientación del resto sacarídico creciente de la unidad repetitiva del succinoglucano (en el espacio citoplasmático) como la orientación de la unidad repetitiva final a ser polimerizada (en el espacio periplásmico) está tomado de Reuber y Walker (1993). Las reacciones que siguen a la reacción 12 de polimerización de la unidad repetitiva son licencia del autor.

Por último se describe la utilización de células electroporadas en el sistema de *Acetobacter xylinum*. En realidad la técnica se puso a punto estudiando este sistema. La síntesis *in vitro* secuencial de la unidad repetitiva a nivel de poliprenol-difosfato-heptasacárido, usando células tratadas con EDTA, fue demostrada en estudios previos realizados en nuestro laboratorio (García *et al.*, 1974; Couso *et al.*, 1980; 1982). Sin embargo la detección de polímero como producto final en esta serie de estudios fue muy dificultosa (Ielpi y Dankert, resultados no publicados). Sólo se obtuvo una prueba indirecta de relación precursor-producto que sugería la participación de los prenil-fosfo-azúcares como intermediarios (Iñon de Iannino *et al.*, 1988). La utilización de células electroporadas como preparado enzimático nos permitió detectar cantidades sustanciales de polímero, acetano, sintetizado *in vitro*. La identificación del polímero como acetano no fue efectuada sólo por su tamaño, sino por la incorporación a este compuesto de cada uno de sus azúcares constituyentes marcados alternativamente, glucosa, ácido glucurónico, manosa y ramnosa (Tabla XIV, Fig.45), y en los análisis de permetilación (Fig.49 A). En este último caso también fue posible detectar en el polímero (acetano) el residuo portador de la ramificación, en el heptasacárido precursor (Fig.49 B). Al igual que lo visto anteriormente en este trabajo para el caso de *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* 8002 y *Rhizobium meliloti*, y para el caso del xantano (Ielpi *et al.*, 1981a; 1993), parte de la unidad lineal se transforma en una ramificación, como consecuencia del proceso de polimerización.

Al analizar los resultados de la Tabla XIV, podemos observar que se logró obtener síntesis tanto de polímero como de intermediarios de biosíntesis (prenol-difosfato-heptasacárido) a partir de todos los dadores de restos glicosídicos radioactivos (UDPGlc, UDPGlcA, GDPMan y TDPRam) y no glicosídicos como acetyl-CoA, demostrando que los compuestos radioactivos obtenidos pertenecen tanto a intermediarios en la síntesis del acetano como al producto final (polisacárido).

Con este sistema fue posible detectar además otros compuestos no relacionados con la biosíntesis del acetano y previamente descritos con el sistema de células tratadas con EDTA. prenil-monofosfato- $\beta$ galactosa (Romero *et al.*, 1977a); prenil-monofosfato- $\beta$ -manosa (Couso *et al.*, 1977a) y lípido-GlcA (Couso *et al.*, 1986). También se estudió en parte la síntesis de glucano, mencionada en trabajos previos (García *et al.*, 1974). Su presencia y estructura fue confirmada por otros autores (Sandermmann y Dekker, 1979; Amemura *et al.*, 1985). El glucano se fraccionó en tres grupos: (a) un glucano neutro con un tamaño aparente de 500.000



Da, parcialmente extraído en el extracto 1203 (Tabla XIV, Fracción 2, Otros) y en agua (Tabla XIV, Fracción 3, Neutros y Fig. 50 A), (b) un glucano supuestamente asociado a una proteína (cargado y TCA insoluble), también con un tamaño aparente de 500.000 Da (Tabla XIV, Fracción 3, Cargados y Fig. 50 A); y (c) una serie de glucanos de masa molecular decreciente parcialmente asociados a proteínas (Tabla XIV, Fracción 4, glucano "álcali soluble" y Fig. 50 B). En incubaciones en dos etapas se observó que posiblemente la fracción soluble en álcali que contenía estos glucanos crecientes (Tabla XV, Fracción 9) pueda ser precursora de la Fracción 8 (Tabla XV). Ninguna de estas fracciones fue degradada por tratamientos con  $\alpha$ -amilasa, quedando fuera la posibilidad de que se tratasen de intermediarios en la síntesis del glucógeno.

Esto demuestra que el sistema de células electroporadas reproduce el esquema de síntesis de compuestos vistos anteriormente en estas condiciones de incubación al usar células tratadas con EDTA.

Finalmente en las incubaciones en dos etapas, en donde parte de los preol-PP-heptasacáridos se transformaron en polímero, se demostró el papel de intermediarios originalmente asignado a estos compuestos (Tabla XV) (Couso *et al.*, 1982). Nuevamente un punto que no está aún muy claro es la presencia de unidades repetitivas libres en el sobrenadante de incubación de estos experimentos (Tabla XV, Fracción 6, Hepta libre). Estos resultados sugerirían una liberación fisiológica (Amemura *et al.*, 1983) o tal vez indican que las enzimas que se encargan del sistema de transporte no son específicas o que hay algún daño en el sistema polimerizante.

Pero nuevamente no se puede descartar la presencia de una endoglucanasa (aunque no descripta) que degrade parcialmente el acetano formado.

Los análisis de los productos de permetilación del acetano con marca en [ $^{14}\text{C}$ ]Glc muestran la formación de pequeñas cantidades de 2,3,4,6 tetra-O-metilglucosa (Fig.49 A), originado en una glucosa terminal. Esta presencia puede ser explicada asumiendo que en el polímero, algunas de las unidades repetitivas (20%) no tienen la ramnosa terminal. La cantidad relativa de este tetra-metil derivado es mayor en la unidad repetitiva intermediaria (30-35%) (Fig.44 y Fig.49 B), sugiriendo que el mecanismo de polimerización selecciona preferentemente unidades repetitivas completas, heptasacárido. Se ha descripto el aislamiento de una mutante en la síntesis de celulosa de *Acetobacter xylinum*, llamada CR 1/4, que produce un polímero de acetano "truncado", con una unidad repetitiva de sólo 4 azúcares (Mac Cormick *et al.*, 1993). Es interesante, además, comentar que la producción de este acetano truncado es muy baja comparada con su contraparte silvestre, sugiriendo

que el sistema polimerizante trabajaría mejor con el prenil-PP-heptasacárido, como se ha observado en este estudio.

El acetano se encuentra acetilado en algún lugar por el momento desconocido (Fig.1). En este trabajo se observó que utilizando [ $^{14}\text{C}$ ]acetil-CoA como dador de restos O-acetilos, cantidades relativamente grandes de radioactividad se incorporaban tanto al acetano como a los intermediarios de biosíntesis (Tabla XIV, Fracción 2, Otros y Fracción 3, Otros). Estos fueron identificados como una mezcla de lípido-azúcares y di y trisacáridos acetilados (celobiosa acetilada y manosilcelobiosa acetilada) y sus correspondientes ésteres fosfóricos cíclicos. No está claro porqué se acumula tanta cantidad de intermediarios de 2 y 3 azúcares; una posibilidad sería que una vez que el lípido-azúcar se ha acetilado a nivel del disacárido, la entrada de los restantes restos glicosídicos se ve impedida o dificultada. En contraste, estos resultados muestran además que las primeras 2 ó 3 hexosas del extremo reductor, pueden estar aciladas con 1 ó 2 restos O-acetilos.

Por último, en la Fig.51, se representa toda la serie de reacciones involucradas en la síntesis del acetano y de los demás compuestos mencionados.

Como se dijo mas arriba con este sistema se puso a punto la técnica de electroporación. Por ejemplo se hicieron una serie de controles para demostrar que no se estaba trabajando en condiciones *in vivo*. Con este objeto se utilizaron [ $^{14}\text{C}$ ]Glc y [ $^{14}\text{C}$ ]Glc-1-P, como sustituyentes del nucleótido-azúcar UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc, pero las incorporaciones a extractos 1203 fueron muy bajas em ambos casos (menos del 3% del total obtenido con UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc) y no se observó formación de [ $^{14}\text{C}$ ]acetano (Tabla XIII). Otro aspecto que se estudió fue el tiempo que las células permanecen permeables luego del tratamiento de electroporación. Se observó que continúan permeables por más de una hora (Fig.46), pero la mayor eficiencia de incorporación se logró cuando los nucleótido azúcares fueron agregados inmediatamente después del tratamiento de electroporación (Fig.46, menos de 1 minuto).

También se logró mejorar la incorporación de radioactividad a todas las fracciones al utilizar células ayunadas, especialmente cuando se utilizó UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc como dador de azúcar (Tabla XIV). Este estímulo posiblemente se deba a la caída tanto de dadores como de receptores endógenos, es decir, nucleótido y prenil difosfato-azúcar. Esta interpretación justifica las diferentes incorporaciones aparentes observadas en las distintas posiciones de la unidad repetitiva. En todos los casos el azúcar del extremo reductor apareció menos radioactivo que el del extremo no reductor, el último en incorporarse. Este efecto fue especialmente visible en los

estudios de permetilación (Fig.49) donde se observaron todos los derivados permetilados de la glucosa sólo al utilizar material obtenido con células ayunadas.

Los resultados indican que utilizando células ayunadas hasta 30 minutos, la incorporación de radioactividad a diferentes fracciones se incrementó (Extracto 1203 y Polímero) (Tabla XI). Sin embargo también se pudo observar que a tiempos mayores de 60 o 90 minutos la síntesis de polímero era menor a lo observado con células sin ayunar (Tabla XI). Esto podría deberse a que a tiempos de ayuno mayores de los 30 minutos la célula por algún mecanismo aún no conocido, reprimirían la síntesis del acetano en un intento de retener en el interior celular las fuentes de carbono disponibles. Se observó también que si las incubaciones se realizaban en condiciones aeróbicas y con agitación (200 rpm), su incorporación de radioactividad tanto a polímero como a extracto 1203 era máxima con respecto a aquellas incubaciones realizadas en condiciones anaeróbicas y estáticas. El efecto del oxígeno se hizo aún mas notable para el caso de la síntesis del polímero, acetano, que para la primera parte de la vía biosintética (Fig.47).

Las condiciones de electroporación con las células de *Acetobacter xylinum*, resultaron ser óptimas para este sistema entre 0,125, 0,500 Kv, 100  $\Omega$  y 25  $\mu$ Fd, tanto para la incorporación de radioactividad a polímero como a los intermediarios de biosíntesis (extracto 1203) (Fig.48). Sin embargo si bien se obtuvo un máximo en el caso del polímero (Fig.48 B; 0,500 Kv, 100  $\Omega$ , 25  $\mu$ Fd), para los intermediarios de biosíntesis a nivel de lípido-azúcar se observaron dos máximos (Fig.48 A; 0,500 Kv, 100  $\Omega$ , 25  $\mu$ Fd y 0,500 Kv, 800  $\Omega$ , 25  $\mu$ Fd). De alguna manera interpretamos los datos como una consecuencia del estado en que se encuentra el sistema enzimático luego del tratamiento. Esto concuerda con la idea de que en el sistema de síntesis de intermediarios, a mayor resistencia (800  $\Omega$ ) con seguridad las membranas de las bacterias han sufrido mayor daño que a resistencias menores (100  $\Omega$ ). Son igualmente funcionales en la incorporación de azúcares para la formación de intermediarios lipídicos, pero el sistema de polimerización quedaría parcialmente desacoplado, con la consiguiente acumulación de intermediarios.

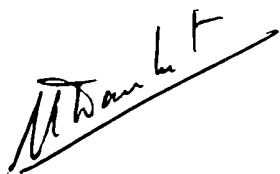
Por último, todo hace creer que este sistema de células electroporadas ofrece grandes posibilidades de aplicación a otros sistemas: (1) en nuestro laboratorio se ha aplicado ya en estudios de síntesis del exopolisacárido de *Agrobacterium radiobacter*, con muy buenos resultados (D. Bassi, Tesis Doctoral, en preparación); (2) para el estudio de la iniciación de la síntesis del glucógeno en *Acetobacter xylinum*, con interesantes resultados (colaboración con el laboratorio de la Dra. Clara Krisman, trabajo en preparación) y (3) en el estudio de la biosíntesis *in vitro* de los factores de

nodulación (factores Nod) en *Rhizobium meliloti* (Nod Rm-1) (Semino y Dankert, trabajo en preparación).

Pero con toda seguridad esta técnica se puede extender a otros campos, alejados de la síntesis de polisacáridos, en los que resulta útil introducir en la célula, tanto procarionte como eucarionte, compuestos para los cuales la cubierta celular es impermeable

**-RESULTADOS PUBLICADOS:**

Parte de los resultados de este trabajo de Tesis Doctoral se encuentran ya publicados (Semino y Dankert, 1993a, 1993b).

Handwritten signature of M. Dankert, written in black ink and underlined.

≈ FIN ≈

Handwritten signature of J. Semino, written in black ink and underlined.

**VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- Abe, M.; Amemura, A. y Higashi, S. (1982). *Plant and Soil* **64**, 315.
- Albersheim, P. y Anderson-Prouty, A.J. (1975). *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **26**, 31.
- Aman, P.; Mc Neil, M.; Franzen, L.E.; Darvill, A.G. y Albersheim, P. (1981). *Carbohydrate Research* **95**, 263.
- Amemura, A. y Cabrera-Crespo, J. (1986). *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2443.
- Amemura, A.; Hisamatsu, M.; Koizumi, K. y Utamura, T. (1985). *J. Gen. Microbiol.* **131**, 301.
- Amemura, A.; Hisamatsu, M.; Mitani, H. y Harada, T. (1983). *Carbohydrate Research*, **114**, 277.
- Araki, Y., Shirai, A., Shimana, A., Ishimono, N. e Ito, E. (1966). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 466.
- Bachmann, B.J. (1990). *Microbiol. Rev.* **54**, 130.
- Barengo, R. y Krisman, C.R. (1978). *Biochem. Biophys. Acta.* **540**, 190.
- Barb, K. y Rick, P.D. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**, 7142.
- Barrere, G.C.; Barber, C.E. y Daniels, M.J. (1986). *Int. J. Biol. Macromol.* **8**, 372.
- Barry, G.T. y Goebel, W.F. (1957). *Nature (London)* **179**, 206.
- Bastin, D.A., Stevenson, G., Brown, P.K., Haase, A. y Reeves, P.R. (1993). *Mol. Microbiol.* **7**, 725.
- Batchelor, R.A., Alifano, P., Biffali, E., Hull, S.I. y Hull, R.A. (1992). *J. Bacteriol.* **174**, 5228.
- Batchelor, R.A., Haraguchi, G.E., Hull, R.A. y Hull, S.I. (1991). *J. Bacteriol.* **173**, 5699.
- Batley, M., Redmond, J.W., Djordjevic, S.P. y Rolfe, B.G. (1987). *Biochim. Biophys. Acta.* **901**, 119.
- Battisti, L.; Lara, J.C. y Leight, J.A. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5625.
- Bayer, M.E. y Thurow, H. (1977). *J. Bacteriol.* **130**, 911.
- Becker, A., Kleickmann, A., Arnol, W. y Puhler, A. (1993). *Mol. Gen. Genet.* **238**, 145.
- Behrens, N.H., Parodi, A.J. y Leloir, L.F. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**, 2857.
- Behrens, N. y Tábora, E. (1978). *Methods in Enzymology* **50**, 402.
- Bennett, R.A. y Billing, E. (1980). *J. Gen. Microbiol.* **116**, 341.

- Beringer, J.E. (1974). *J. Gen. Microbiol.* **84**, 188.
- Bhattachargee, A.K.; Jennings, H.J.; Kenny, C.P.; Martin, A. y Smith, I.C.P. (1975). *J. Biol. Chem.* **250**, 1926.
- Bhattachargee, A.K.; Jennings, H.J.; Kenny, C.P.; Martin, A. y Smith, I.C.P. (1976). *Can. J. Biochem.* **54**, 1.
- Blumberg, P.M. y Strominger, J.L. (1974). *Bacteriol. Rev.* **38**, 291.
- Blumenfeld, M.L. y Krisman, C.R. (1986). *Eur. J. Biochem.* **156**, 163.
- Borthakur, D.; Barbur, R.F.; Lamb, J.W.; Daniels, M.J.; Downie, J.A. y Johnston, A.W.B. (1986). *Mol. Gen. Genet.* **203**, 320.
- Borthakur, D.; Barbur, R.F.; Latchford, J.W.; Rossen, L. y Johnston, A.W.B. (1991). *Mol. Microbiol.* **5**, 2107.
- Borthakur, D.; Barbur, R.F.; Latchford, J.W.; Rossen, L. y Johnston, A.W.B. (1988). *Mol. Gen. Genet.* **213**, 155.
- Borthakur, D.; Downie, J.A.; Johnston, A.W.B. y Lamb, L.W. (1985). *Mol. Gen. Genet.* **200**, 278.
- Borthakur, D. y Johnston, A.W.B. (1987). *Mol. Gen. Genet.* **207**, 149.
- Bossio, J.C. (1989). Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- Bossio, J.C.; Iñon de Iannino, N. y Dankert, M.A. (1986). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **134**, 205.
- Boulnois, G.L. y Jann, K. (1989). *Mol. Microbiol.* **3**, 1819.
- Bourne, E.J.; Hutson, D.H. y Weigel, H. (1961). *J. Chem. Soc.* **Part 1**, 35.
- Bray, G.A. (1960). *Analytical Biochemistry* **1**, 279.
- Breedveld, M.W., Zevenhuizen, L.P.T.M. y Zehnder, A.J.B. (1991). *Arch. Microbiol.* **156**, 501.
- Breedveld, M.W., Zevenhuizen, L.P.T.M. y Zehnder, A.J.B. (1992). *J. Bacteriol.* **174**, 6336.
- Bukhari, A.I. y Zipser, D. (1973). *Nature New Biol.* **243**, 238.
- Burman, L.G. y Park, J.T. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1844.
- Burman, L.G.; Reichler, J. y Park, J.T. (1983a). *J. Bacteriol.* **155**, 983.
- Burman, L.G.; Reichler, J. y Park, J.T. (1983b). *J. Bacteriol.* **156**, 386.
- Burrows, S.; Grylls, F.S.M. y Harrison, J.S. (1952). *Nature (London)* **170**, 800.

- Cadioux, J.E.; Kuzio, J.; Milazzo, F.H. y Kropinski, A.M. (1983). *J. Bacteriol.* **155**, 817.
- Caetano-Anollés, G., Cris-Estes, D.K. y Bauer, W.D. (1988). *J. Bacteriol.* **170**, 3164.
- Cangelosi, G.; Martinetti, D.; Leigh, J.A.; Lee, C.C.; Theines, C. y Nester, E.W. (1989). *J. Bacteriol.* **171**, 1609.
- Canter Cremers, H.C.J.; Batley, M.; Redmond, J.W.; Stevens, K.; Breedveld, M.W.; Zevenhuizen, L.P.T.M.; Lugtemberg, B.J.J. y Wijffelman, C.A. (1991a) *Carbohydr. Res.* **218**, 185.
- Canter Cremers, H.C.J., Batley, M., Redmond, J.W., Wijffes, A.H.M., Lugtenberg, B.J.J. y Wijffelman, C.A. (1991b). *J. Biol. Chem.* **266**, 9556.
- Cannon, W., Charlton, W, y Buck, M. (1991). *J. Mol. Biol.* **220**, 915.
- Cannon, W.V., Kreutzer, R., Kent, H.M., Morett, E. y Buck, M. (1990). *Nucleic Acids Res.* **18**, 1693.
- Carlson, R.W., Kalembasa, S., Turowski, D., Pachori, P. y Noel, K.D. (1987). *J. Bacteriol.* **158**, 1012.
- Castro, O., Zorreguieta, A., Bravo, M., Raimondi, A., Semino, C. y Ielpi, L. (1992). Biosíntesis de Glucanos  $\beta$  (1-2) en *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, bv. *phaseoli* y bv. *viciae*. Congreso de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas.
- Cervantes, E.; Sharma, S.B.; Maillet, F.; Vasse, J.; Truchet, G. y Rosenberg, C. (1989). *Mol. Microbiol.* **3**, 745.
- Chacravarty, A.K., Zurkowsky, W., Shine, J. y Rolfe, B.G. (1982). *Mol. Appl. Genet.* **1**, 585.
- Chapman, A.; Li, E. y Kornfeld, S. (1979). *J. Biol. Chem.* **254**, 10243.
- Chen, H., Batley, M., Redmon, J.M. y Rolfe, B.G. (1985). *J. Plant. Physiol.* **120**, 331.
- Coira, J.A.; Cavaignac, S. y Ugalde, R. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**, 10601.
- Cooper, S. (1991). *Microbiol. Rev.* **55**, 649.
- Coplin, D.L. y Cook, D. (1990). *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **3**, 271.
- Costa, J.B. (1991). Tesis Doctoral. The Ohio State University Columbus, Ohio.
- Costerton, J.W.; Cheng, K.J.; Geesey, G.G.; Ladd, T.I.; Nickel, J.C.; Dasgupta, M. y Marrie, T.J. (1987). *Ann. Rev. Microbiol.* vol. **41**, 435.
- Couso, R.O.; Ielpi, L. y Dankert, M.A. (1987). *Journal of General Microbiology* **133**, 2123.
- Couso, R.O.; Ielpi, L.; Garcia, R.C. y Dankert, M.A. (1980). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **204**, 434.

- Couso, R.O.; Ielpi, L.; García, R.C. y Dankert, M.A. (1982). *European Journal of Biochemistry* **123**, 617.
- Couso, R.O.; Iñon de Iannino, N. y Dankert, M.A. (1986). *Anales de la Asociación Química Argentina* **74**, 783.
- Delmer, D.D. (1983). *Adv. Carb. Chem. Biochem.* **41**, 105.
- Dankert, M.A. y Behrens, N.H. (1971). *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, número especial 145.
- Dankert, M.A. y Ielpi, L. (1989). *An. Asoc. Quim. Argen.* **77** (2), 197.
- Dankert, M.A.; Wright, A.; Kelley, W.S. y Robbins, P.W. (1966). *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 425.
- Davidson, I.W.; Sutherland, I.W. y Lawson, C.J. (1977). *J. Gen. Microbiol.* **98**, 603.
- Dazzo, F.B., Napoli, C.H. y Hubbell, D.H. (1976). *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 166.
- Dazzo, F.B., Truchet, G.L., Sherwood, J.E., Hrabak, E.M., Abe, M. y Pankratz, S.H. (1984). *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 1140.
- Dean, D.R. y Jacobson, M.R. (1992). *Biological Nitrogen Fixation* (Stacey, G. et al, ed.) Chapman & Hall, New York, 763-834.
- de Pedro, M.A. y Schwarz, V. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 5856.
- De Stevens, G. (1955). *Methods in Enzymology vol. I*, 173.
- Debellé, F. y Sharma, S.B. (1986). *Nucleic. Acids Res.* **14**, 7453.
- Dedonder, R. y Hassid, W.Z. (1964). *Biochimica et Biophysica Acta* **90**, 239.
- Dedonder, R. (1972). *Biochemistry of the Glycosidic Linkage* (Piras, R. y Pontis, H.G., eds.). Academic Press, New York, London. 21-78.
- Deinema, M.H. y Zevenhuizen, L.P.T.M. (1971). *Arch. Mikrobiol.* **78**, 42.
- Dénarié, J. y Roche, P. (1992). *Molecular Signals in Plant-Microbe Communication*. Boca Raton: CRC Press, 295.
- Dénarié, J.; Debellé, F. y Rosenberg, C. (1992). *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 497.
- Deretic, V.; Mohr, C.D. y Martin, D.W. (1991). *Mol. Microbiol.* **5**, 1577.
- Djordjevic, M.A., Redmond, J.W., Batley, M. y Rolfe, B.G. (1987). *EMBO J.* **6**, 1173.
- Doherty, D.; Leigh, J.A.; Glazebrook, J. Walker, G.C. (1988). *J. Bacteriol.* **170**, 4249.
- Downie, J.A.; Hombrecher, G.; Ma, Q.S.; Knight, C.D.; Wells, B. y Johnston, A.W.B. (1983). *Mol. Gen. Genet.* **190**, 359.



- Dusha, I., Bakos, A., Kondorosi, A., de Bruijn, F.J. y Schell, J. (1989). *Mol. Gen. Genet.* **219**, 89.
- Dylan, T. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4403.
- Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinski, D.R. y Ditta, G. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**, 4403.
- Economou, A., Hamilton, W.D.O., Johnston, A.W.B. y Downie, J.A. (1990). *EMBO J.* **9**, 349.
- Egan, W.; Liu, T.Y.; Dorow, D.; Cohen, J.S.; Robbins, J.D.; Gotshlich, E.C. y Robbins, J.B. (1977). *Biochemistry* **16**, 3687.
- Eklund, C.; Pope, L.M. y Wyss, O. (1966). *J. Bacteriol.* **92**, 1828.
- Elbein, A.D.; Barker, G.A. y Hassid, W.Z. (1966). *Methods in Enzymology* **8**, 416.
- Evans, I.J. y Downie, J.A. (1986) *Gene* **43**, 95.
- Fett, W.F.; Osman, S.F. y Dunn, M.F. (1989). *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 579.
- Fett, W.F.; Osman, S.F.; Fishman, M.L. y Siebles, T.S. (1986). *Appl. Env. Microbiol.* **52**, 466.
- Finam, T.M.; Kunkel, B.; De Vos, G.F. y Singer, E.R. (1986). *J. Bacteriol.* **167**, 66.
- Finke, A., Bronner, D., Nikolaev, A.V., Jann, B. y Jann, K. (1991). *J. Bacteriol.* **173**, 4088.
- Firmin, J.L., Wilson, K.E., Rossen, L. y Johnston, A.W.B. (1986). *Nature (London)*. **324**, 90.
- Fisher, R.F. y Long, S.R. (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 5492.
- Fisher, R.F. y Long, S.R. (1992). *Nature (London)*. **357**, 655.
- Fisher, W. (1988). *Adv. Microb. Physiol.* **29**, 233.
- Formanek, H.; Shleifer, K.H.; Siedel, H.P.; Lindeman, R. y Zundel, G. (1976). *FEBS Lett.* **70**, 150.
- Freer, J.H. y Salton, M.R.J. (1971). "The anatomy and chemistry of gram negative cell envelopes", 67-122. Academic Press, New York and London.
- García, R.C.; Recondo, E. y Dankert, M.A. (1974). *European Journal of Biochemistry* **43**, 93.
- Geremía, R.A.; Cavaignac, S.; Zorreguieta, A.; Toro, N.; Olivares, J. y Ugalde, R. (1987). *J. Bacteriol.* **169**, 880.
- Ghai, S.K.; Hisamatsu, M.; Amemura, A. y Harada, T. (1981). *J. Gen. Microbiol.* **122**, 33.

- Gibson, A.H. (1963). *Austral. J. Biol. Sci.* **16**, 28.
- Gilles-Gonzales, M.A., Ditta, G.S. y Helinski, D.R. (1991). *Nature (London)*. **350**, 170.
- Glaser, L. (1958). *J. Biol. Chem.* **232**, 627.
- Glazebrook, J. y Walker, G.C. (1989). *Cell* **56**, 661.
- Glazebrook, J.; Reed, J.W.; Reuber, T.L. y Walker, G.C. (1990). *Int. J. Biol. Macromol.* **12**, 67.
- Glode, M.P.; Robbins, J.B.; Liu, T.Y.; Gotschlich, E.C.; Orskov, I. y Orskov, F. (1977). *J. Infect. Dis.* **135**, 94.
- Glucksmann, M.A.; Reuber, T.L. y Walker, G.C. (1993a). *J. Bacteriol.* **175**, 7033.
- Glucksmann, M.A.; Reuber, T.L. y Walker, G.C. (1993b). *J. Bacteriol.* **175**, 7045.
- Gmeiner, J. Essig, P. y Martin, H.H. (1982). *FEBS Lett.* **138**, 109.
- Goethals, K., Gao, M., Tomekpe, K., Van Montagu, M. y Holsters, M. (1989). *Mol. Gen. Genet.* **219**, 289.
- Gorin, J.A.P. y Spencer, T.F. (1961). *Can. J. Chem.* **39**, 2282.
- Gorin, J.A.P., Spencer, T.F. y Westlake, D.W.S. (1961). *Canad. J. Chem.* **39**, 1067.
- Gottesman, S. (1989). *Annu. Rev. Genet.* **23**, 163.
- Gottesman, S. y Stout, V. (1991). *Mol. Microbiol.* **5**, 1599.
- Göttfert, M., Hitz, S. y Hennecke, H. (1990a) *Mol. Plant-Microbe Intercat.* **3**, 308.
- Göttfert, M., Grob, P. y Hennecke, H. (1990b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 2680.
- Grant, W.D.; Sutherland, I.W. y Wilkinson, J.F. (1969). *J. Bacteriol.* **100**, 1187.
- Gray, J.X.; Djordjevic, M.A. y Rolfe, B.G. (1990). *J. Bacteriol.* **172**, 193.
- Gray, J.X.; Zhan, H.; Levery, S.B.; Battisti, L.; Rolfe, B.G. y Leigh, J.A. (1991). *J. Bacteriol.* **173**, 3066.
- Hakomori, S. (1964). *J. Biochem.* **55**, 205.
- Halverson, L.J. y Stacey, G. (1986). *Microbiol. Rev.* **50**, 193.
- Handelsman, J.; Ugalde, R.A. y Brill, W. (1984). *J. Bacteriol.* **157**, 703.
- Harada, T.; Misaki, A. y Saito, H. (1968). *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 292.
- Harding, N.E., Cleary, J.M., Cabañas, D.K., Rosen, I.G. y Kang, K.S. (1987). *J. Bacteriol.* **169**, 2854.

- Harding, N.E., Raffo, S., Raimondi, A., Cleary, J.M. y Ielpi, L. (1993). *J. Gen. Microbiol.* **139**, 447.
- Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M. y Wallace, J.C. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 6602.
- Hennecke, H. et al. (1988). *Nitrogen Fixation: Hundred Years After* (Bothe, H. et al. eds.) Gustav Fisher, Stuttgart, New York, 339-344.
- Her, G.R., Glazebrook, J. Walker, G.C. y Reinhold, V.N. (1990) *Carbohydr. Res.* **198**, 305.
- Hestrin, S. (1949). *J. Biol. Chem.* **180**, 249.
- Hestrin, S.; Aschner, M; y Mager, S.; (1974). *Nature (London)* **159**, 64.
- Hestrin, S. y Schramm, M. (1954). *Bioch. Jour.* **58**, 345.
- Hisamatsu, M.; Abe, J.; Amemura, A. y Harada, T. (1978). *Carbohydr. Res.* **66**, 289.
- Hisamatsu, M.; Abe, J.; Amemura, A. y Harada, T. (1980) *Agricultural and Biological Chemistry* **44**, 1049.
- Hisamatsu, M.; Amemura, A.; Matsuo, T.; Matsuda, H. y Harada, T. (1982). *Journal of General Microbiology* **128**, 1873.
- Hisamatsu, M., Yamada, T., Higashiura, T. y Ikeda, M. (1987). *Carbohydr. Res.* **163**, 115.
- Hisamatsu, M. (1992). *Carbohydr. Res.* **231**, 137.
- Hizaki, K. Matsushashi, M. y Stromingen, J.L. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **55**, 656.
- Hoffman, J.; Lindberg, B.; Glowacka, M.; Deryo, M. y Lorkiewicz, Z. (1980). *Eur. J. Biochem.* **105**, 105.
- Horvath, B., Kondorosi, E., John, M., Schmidt, J., Török, I., Györgypal, I.B., Wieneke, V., Schell, J. y Kondorosi, A. (1986) *Cell* **46**, 335.
- Hötte, B., Rath-Arnol, I., Puhler, A. y Simon, R. (1990). *J. Bacteriol.* **172**, 2804.
- Huang, S., Lee, H.C. y Mayer, R.M. (1979). *Carbohydr. Res.* **74**, 287.
- Hrabak, E.M.; Urbano, M.R. y Dazzo, F.B. (1981). *J. Bacteriol.* **148**, 697.
- Ielpi, L., Dylan, T., Ditta, G.S., Helinski, D.R. y Stanfield, S.W. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 2843.
- Ielpi, L.; Couso, R.O. y Dankert, M.A. (1981a). *FEBS Lett.* **130**, 253.
- Ielpi, L.; Couso, R.O. y Dankert, M.A. (1981b). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102**, 1400.

- Ielpi, L.; Couso, R.O. y Dankert, M.A. (1983). *Biochem. Internat.* **6**, 623.
- Ielpi, L.; Couso, R.O. y Dankert, M.A. (1993). *J. Bacteriol.* **175**, 2490.
- Iglesias, A.A. y Preiss, J. (1992). *Biochemical Education* **20** (4), 196.
- Intire, F.C.; Peterson, W.H. y Riker, A.G. (1942). *J. Biol. Chem.* **143**, 491.
- Iñon de Iannino, N.; Couso, R.O. y Dankert, M.A. (1988). *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1731.
- Iñon de Iannino, N. y Ugalde, R. (1989). *J. Bacteriol.* **171**, 2842.
- Iñon de Iannino, N. y Ugalde, R. (1993). *Arch. Microbiol.* **159**, 30.
- Ishino, F.; Tamaki, S.; Spratt, B.G. y Matsushashi, M. (1982). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **109**, 689.
- Ishizuka, I. y Yamakawa, T. (1985). *New Comprehensive Biochemistry*, vol. 10, "Glycolipids" (Wiegand, H. editors). Elsevier, Amsterdam 101-197.
- Jacobs, D.M. (1986). *Microbiology*. American Society of Microbiology, Washington D.C.
- Jacobs, T.W., Egelhoff, T.T. y Long, S.R. (1985). *J. Bacteriol.* **162**, 469.
- Jann, K.; Kanegasaki, S.; Goldemann, G. y Mäkelä, P.H. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **86**, 1185.
- Jann, K. y Jann, B. (1984). *Structure and biosynthesis of O-antigens* (T. Rietschel ed.) *The handbook of endotoxin*. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam. 138-186.
- Jansson, P.E.; Kenne, L. y Lindberg, B. (1975). *Carbohydrate Research* **45**, 275.
- Jansson, P.E.; Lindberg, L.; Swarna Wimilasiri, K.M. y Dankert, M.A. (1993). *Carbohydrate Research* **245**, 303.
- Jeanes, A.; Wise, C.S. y Dimler, R.J. (1951). *Anal. Chem.* **23**, 415.
- Jensen, H.L. (1942). *Proc. Linn. Soc. N.S.W.* **65**, 93.
- Jiang, X.M.; Neal, B.; Santiago, F.; Lee, S.J.; Romana, L.K. y Reeves, P.R. (1991). *Mol. Microbiol.* **5**, 695.
- Johnston, A.W.B.; Hombrecher, G.; Brewin, N.J. y Cooper, M.C. (1982). *J. Gen. Microbiol.* **128**, 85.
- Kates, M. (1990). *Handbook of Lipid Research*, vol. 6, "Glycolipids, Phosphoglycolipids and sulfoglycolipids". Plenum Press, New York 235-320.
- Kedzierska, B.; (1978). *Eur. J. Biochem.* **91**, 545.
- Kenne, L.; Lindberg, B.; Petersson, K.; Katzenellenbogen, E. y Romanowska, E. (1977). *Eur. J. Biochem.* **76**, 381.

- Kennedy, E.P. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1092.
- Klena, J.D.; Ashford, R.S. y Schnaitman, C.A. (1992). *J. Bacteriol.* **174**, 7297.
- Koeris, B. y Kontrohr, T. (1984). *J. Biol. Chem.* **259**, 11858.
- Kondorosi, A. (1991). *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interaction*. Dordrecht: Kluwer Academic, 111-118.
- Kondorosi, E., Pierre, M., Crem, M., Haumann, U., Buiré, M., Hoffmann, B., Shell, J. y Kondorosi, A. (1991). *J. Mol. Biol.* **222**, 885.
- Kondorosi, E. y Kondorosi, A. (1986). *TIBS II*, 296.
- Kornfeld, S.; Gregory, W. y Chapman, A. (1979). *J. Biol. Chem.* **254**, 11649.
- Köplin, R., Arnold, W., Hötte, B., Simon, R., Wang, G. y Puhler, A. (1992). *J. Bacteriol.* **174**, 191.
- Kreutzer, R. et al. (1991) *Nitrogen Fixation* (Polsinelli et al. eds.) Kluwer, Dordrecht, 25-36.
- Krisman, C.R. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 1206.
- Kuhn, H.M.; Neter, E. y Mayer, H. (1983). *Infect. Immun.* **40**, 696.
- Kuo, M.S. y Mort, A.J. (1986). *Carbohydr. Res.* **145**, 247.
- Lagares, A., Caetano-Anollés, G., Niehaust, K., Lorenzen, J., Ljunggren, H.D., Puhler, A. y Favelukes, G. (1992). *J. Bacteriol.* **174**, 5941.
- Lamb, L.W.; Hombrecher, G. y Johnston, A.W.B. (1982). *Mol. Gen. Genet.* **186**, 449.
- Latchford, J.W.; Borthakur, D. y Johnson, A.W.B. (1991). *Mol. Microbiol.* **5**, 2107.
- Leigh, J.A. y Coplin, D.L. (1992). *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 307.
- Leigh, J.A. y Lee, C.C. (1988). *J. Bacteriol.* **170**, 3327.
- Leigh, J.A.; Signer, E.R. y Walker, G.C. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6231.
- Leire, L. (1974). *Annals of the New York Academy of Sciences* **235**, 109.
- Leloir, L.F. (1970). *Science* **172**, 1299.
- Lindberg, A.A. (1977). *Surface Carbohydrates of the Procariotic Cell* (ed. Sutherland, I.W.), London, Academic 286-356.
- Liu, T.Y.; Gotschlich, E.C.; Dunne, F.T. y Jonssen, E.K. (1971). *J. Biol. Chem.* **246**, 4703.
- Long, S.R. (1989). *Cell* **56**, 203.

- Long, S.R., Reed, J.W.; Himawan, J. y Walker, G.C. (1988). *J. Bacteriol.* **170**, 4239.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
- Luderitz, O. (1971). *Angewandte Chemie* **9**, 649.
- Mac Cormick, C.A.; Harris, J.E.; Gunning, A.P. y Morris, V.J. (1993). *Journal of Applied Bacteriology* **74**, 196.
- Mäkelä, P.H. y Mayor, H. (1976). *Bacteriol. Rev.* **40**, 591.
- Mäkelä, P.H. y Stocker, A.P. (1984). *Genetics of Lipopolysaccharide*, pp 54-137. E.T. Riechel (ed.). *Handbook of endotoxin*, vol. 1. *Chemistry of endotoxin*. Elsevier Biochemical Press. Amsterdam.
- Markovitz, A. (1977). *Surface Carbohydrates of the Prokaryotic cell*. Sutherland, I. ed. London. Academic Press Inc. (London), Ltda.
- Martinez, E., Romero, D. y Palacios, R. (1990) *Crit. Rev. Plant. Sci.* **9**, 59.
- Masson, L. y Holheim, B.E. (1985). *J. Bacteriol.* **161**, 861.
- Matsushashi, M.; Ishino, F.; Nakagawa, J.; Mitsui, K.; Nakajima-Lijima, S. y Tamaki, S. (1981).  *$\beta$ -Lactam Antibiotics: Mode of Action New Developments and Future Prospects* (ed. Salter, M.R.J.) Academic Press, New York 297-310.
- Maxwell, C.A., Hartwing, U.A., Joseph, C.M. y Phillips, D.A. (1989). *Plant Physiol.* **91**, 842.
- Mayer, H. y Schmidt, G. (1979). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **85**, 99.
- Mc Connell, M. y Wright, A. (1974). *J. Bacteriol.* **137**, 746.
- Mc Neil, M.; Darvill, J.; Darvill, A.G.; Albersheim, P.; Van Veen, R.; Hooykaas, P.; Schilperoort, R. y Dell, A. (1986). *Carbohydr. Res.* **146**, 300.
- Meadow, M.P. (1971). "Structure and Synthesis of Bacterial Cell Walls". Department of Biochemistry, University College, London.
- Meijer, E.G.M. y Droughton, W.J. (1982) *Molecular Biology of Plants Tumors* (editado por Kahl, G. y Schell, J.) Academic Press, New York-London, 107-129.
- Melton, L.D., Mindt, L., Rees, D.A. y Sanderson, G.R. (1976). *Carbohydr. Res.* **46**, 245.
- Merrick, M.J. (1992). *Biological Nitrogen Fixation* (Stacey, G. et al. eds.) Chapman & Hall, New York, 835-876.
- Merrick, M.J. (1993). *New Horizons in Nitrogen Fixation* (Palacios, R., Mora, J. y Newton, W.E., eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 43-54.

- Miller, K.J., Reinhold, V.N., Weissborn, A.C. y Kennedy, E.P. (1987). *Biochim. Biophys. Acta.* **901**, 112.
- Mirelman, D. (1979). *Bacterial Outer Membranes* (Inouge, M. ed). Wiley, New York 116-166.
- Morris, V.J.; Brownsey, G.J.; Harris, J.E.; Gunning, A.P.; Stevens, B.J.H. y Johnston, A.W. (1989). *Carbohydrate Research* **191**, 315.
- Mulford, C.A. y Osborn, M.J. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1159.
- Murray, R.K. y Narasimhan, R. (1990). *Handbook of Lipid Research*, vol. 6, "Glycolipids, Phospholipids and Sulphoglycolipids". Plenum Press, New York 321-362.
- Nap, J.P. y Bisseling, T. (1990) *Science* **250**, 948.
- Nnalue, N.a., Newton, S. y Stocker, B.A.D. (1990). *Microb. Pathogen.* **8**, 393.
- Nowotny, A. (1984). "Chemistry of Endotoxin", vol. 1, 308. Elsevier Amsterdam, New York, Oxford.
- Orgambide, G.G.; Hollingsworth, R.I. y Dazzo, F.B. (1992). *Carbohydr. Res.* **233**, 151.
- Paa, A.S., Leps, W.T. y Brill, W.J. (1981). *Science.* **213**, 1513.
- Pawlowski, K., Klosse, U. y de Bruijn, F.J. (1991). *Mol. Gen. Genet.* **231**, 124.
- Peters, H.; Jurs, M.; Jann, K.; Timmis, K.N. y Bitter-Suermann, D. (1985). *Infect. Immun.* **50**, 459.
- Peters, N.K., Frost, J.W. y Long, S.R. (1986). *Science* **233**, 977.
- Peters, N.K. y Long, S.R. (1988). *Plant. Physiol.* **88**, 396.
- Philip-Hollingsworth, S.; Hollingsworth, R.I. y Dazzo, F.B. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**, 1461.
- Phillips, D.A., Joseph, C.M. y Maxwell, C.A. (1992). *Plant Physiol.* **99**, 1526.
- Potter, H. (1988). *Analytical Biochemistry* **174**, 361.
- Preiss, J. (1984). *Annu. Rev. Microbiol.* **38**, 419.
- Preiss, J. (1989). "Bacteria in Nature" (editado por Poindexter, J.S. y Leadbetter, E.R.), vol. 3, 189-258, Plenum, N.Y.
- Preiss, J. y Romero, T. (1989). "Advances in Microbial Physiology" (editado por Rose, A. H. y Tempest, D.W.) vol.30, 183-238, Academic Press, New York.
- Preiss, J. y Walsh, D.A. (1981). "Biology of Carbohydrates" (editado por Ginsburg, V.), Capítulo 5, pp. 199-313, J. Wiley and Sons, New York.

Price, N.P.J., Relic, B., Talmont, F., Lewin, A., Promé, D., Peuppke, S.G., Maillet, F., Dénarié, J., Promé, J.C. y Broughton, W.J. (1992). *Mol. Microbiol.* **6**, 3575.

Priefer, U.B. (1989). *J. Bacteriol.* **171**, 6161.

Putman, E.W.; Potter, A.L.; Hodgson, R. y Hassid, W.Z. (1950). *Journal of American Chemical Society* **72**, 5024.

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

Ramia, S.; Neter, E. Y Brenner, D.J. (1982). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**, 395.

Reed, J.W.; Capage, M. y Walker, G.C. (1991). *J. Bacteriol.* **173**, 3776.

Reinhold, B.; Chan, S.Y.; Reuber, T.L.; Marra, A.; Walker, G.W. y Reinhold, V. Resultados no publicados.

Reuber, T.L. y Walker, G.C. (1993). *Cell* vol. **74**, 269.

Reuber, T.L.; Long, S. y Walker, G.C. (1991). *J. Bacteriol.* **173**, 426.

Rick, P.D.; Mayer, H.; Neumeier, B.A.; Wolski, S. y Bitter-Suermann, D. (1985). *J. Bacteriol.* **162**, 494.

Rietschel, E.T. (1984). *Chemistry of Endotoxin*. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. Vol. I.

Robbins, P.W.; Wright, A. y Bellows, J.L. (1964). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **52**, 1302.

Robbins, P.W.; Keller, J.W. y Wright, A. (1965). *J. Biol. Chem.* **240**, 384.

Robbins, P.W.; Bray, D.; Dankert, M. y Wright, A. (1967). *Science* **158**, 1536.

Robbins, A. y Freeman, P. (1988). *Sci. Am.* **259**, 90.

Robertsen, B.K.; Aman, P.; Davill, A.G.; Mc Neil, M. y Albersheim, P. (1981). *Plant Physiol.* **67**, 384.

Robyt, J.F. (1975). *Carbohydrate Research.* **40**, 373.

Roche, P., Debellé, F., Maillet, F., Lerouge, P., Fauchet, C., Truchet, G., Dénarié, J. y Promé, J.C. (1991). *Cell* **67**, 1131.

Rohr, T.E. y Troy, F.A. (1980). *J. Biol. Chem.* **255**, 2332.

Rolfe, B.G. y Gresshoff, F.M. (1988) *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **39**, 297.

Romero, P.A. (1977). Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.

Romero, P.A.; García, R.C. y Dankert, M.A. (1977a). *Molecular and Cellular Biochemistry* **16**, 205.



- Romero, P.A; García, R.C. y Dankert, M.A. (1977b). *Acta Fisiológica Latinoamericana* **26**, 434.
- Ross, P.; Mayer, P. y Benziman, M. (1991). *Microbiol. Rev.* **55**, 35.
- Ross, P.; Weinhouse, H.; Aloni, Y.; Michaeli, D.; Weinberger-Ohana, P.; Mayer, R.; Braun, S.; de Vroom, E.; van der Marel, G.A.; van Broom, J.H. y Benziman, M. (1987). *Nature (London)* **325**, 279.
- Rovira, A.D. (1969). *Bot. rev.* **35**, 35.
- Russomado, G. y Dankert, M.A. (1992). *An. Asoc. Quim. Argent.* **80**, 175.
- Ryan, J.M. y Conrad, H.E. (1974). *Arch. Biochem. Biophys.* **162**, 530.
- Sanderman, H. Jr. y Detker, R.F.H. (1979). *FEBS Letters* **107**, 237.
- Sanderson, K.E. y Roth, J.R. (1988). *Microb. Rev.* **52**, 485.
- Sandford, P.A., Pittsley, J.E., Knutson, C.A., Watson, P.R., Cadmus, M.C. y Jeanes, A. (1977). *Carbohydr. Res.* **4**, 192.
- Sandford, P.A. (1979). *Adv. Carb. Chem. Biochem.* **36**, 266.
- Sandford, P.A. y Conrad, H.E. (1972). *Biochemistry*, **5**, 1508.
- Sastry, P.S. (1974). *Adv. Lipid. Res.* **12**, 251.
- Scheu, A.K., Economou, A., Hong, G.F., Ghelani, S. Johnston, A.W. y Downie, J.A. (1992). *Mol. Microbiol.* **6**, 231.
- Schleifer, K.H. y Kandler, O. (1972). *Bacteriol. Rev.* **36**, 402.
- Schindler, M.; Mirelman, D. y Schwarz, V. (1976). *Eur. J. Biochem.* **71**, 131.
- Schnaitman, C.A. y Klena, J.D. (1993). *Microbiol. Rev.* **57**, 655.
- Schneider, J.E.; Reinhold, V.; Rumley, M.K. y Kennedy, E.P. (1979). *J. Biol. Chem.* **254**, 10135.
- Schulmann, H. y Kennedy, E.P. (1979). *J. Bacteriol.* **137**, 686.
- Schramm, M. y Hestrin, S. (1954). *J. Gen. Microbiol.* **11**, 123.
- Schwarz, V.; Ryter, A.; Rambach, A.; Hellio, R. y Hirota, Y. (1975). *J. Mol. Biol.* **98**, 749.
- Schwedock, J. y Long, S.R. (1989). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2**, 181.
- Semino, C.E. y Dankert, M.A. (1993a). *Journal of General Microbiology* **139**, 2745.
- Semino, C.E. y Dankert, M.A. (1993b). *An. Asoc. Quim. Argent.* **81** (4,5) 289.

- Sgaek-Braek, G.; Grasdalen, H. Larsen, L. (1986). *Carbohydr. Res.* **154**, 239.
- Shearman, C.A., Rossen, L., Johnston, A.W.B. y Downie, J.A. (1986). *EMBO J.* **5**, 647.
- Shoekman, D.V. y Barrett, J.F. (1983). *Ann. Rev. Microbiol.* **37**, 501.
- Sirisena, D.M., Brozek, K.A., MacLachlan, P.R., Sanderson, K. y Raetz, C.R.H. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 18874.
- Slomiany, B.L.; Murty, V.L.N.; Liau, Y.H. y Slomiany, A. (1987). *Prog. Lipid. Res.* **26**, 29.
- Slonecker, J.H. y Jeanes, A. (1962). *Can. J. Chem.* **40**, 2066.
- Smit, G., Swart, S., Lugtenberg, B.J.J. y Kijne, J.W. (1992). *Mol. Microbiol.* **6**, 2897.
- Smith, A.R.W.; Rastall, R.A.; Rees, N.H. y Hignett, R.C. (1990). *Acta. Hort.* **273**, 211.
- Smith, F. y Montgomery, R. (1956). *Methods of Biochemical Analysis* (Gick, D. ed.) vol. **III**, Interscience, N.Y., London, pp 154-157.
- Spaink, H.P., Weinman, J., Djordjevic, M.A., Wijffelman, C.A., Okker, R.J.H. y Lugtenberg, B.J.J. (1989). *EMBO J.* **8**, 2811.
- Spaink, H.P. (1992) *Plant. Mol. Biol.* **20**, 977.
- Stacey, G., Paau, A.S. y Brill, W.J. (1980). *Plant Physiol.* **66**, 609.
- Staneloni, R.J.; Tolmasky, M.E. y Leloir, L.F. (1984). *J. Gen. Microbiol.* **130**, 869.
- Stanfield, S.W.; Ielpi, L.; O'Brochta, D.; Helisnki, D.R. y Ditta, G.S. (1988). *J. Bacteriol.* **170**, 3523.
- Stevenson, G.; Lee, S.J.; Romana, L.K. y Reeves, P.R. (1991). *Mol. Gen. Genet.* **227**, 173.
- Stitt, M. (1990). "Plant Physiology and Molecular Biology" (editado por Dennis, D.T. y Turpin, D.H.), 309-326, John Wiley, New York.
- Surin, B.P. y Downie, J.A. (1988). *Mol. Microbiol.* **2**, 173.
- Sutherland, I. y Mackenzie, C.L. (1977). *J. Bacteriol.* **129**, 599.
- Sutherland, I. y Smith, M. (1973). *J. Gen. Microbiol.* **74**, 259.
- Sutherland, I.W. (1969). *Biochemical Journal* **115**, 935.
- Sutherland, I.W. (1977). *Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell* (Sutherland, I.W. ed.) Academic Press, budren, N.Y. San Francisco, 27-96.
- Sutherland, I.W. (1982). *Adv. Microbiol. Physiol.* **39**, 80

- Sutherland, I.W. (1985). *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 243.
- Sutherland, I.W. (1988). *International Review of Cytology* vol. **113**, pp 187-231. Academic Press, Inc.
- Tahara, Y. y Wilkinson, S.G. (1983). *Eur. J. Biochem.* **134**, 299.
- Thorne, L., Tansey, L. y Pollock, T.J. (1987). *J. Bacteriol.* **169**, 3593.
- Tipper, D.J. y Strominger, J.L. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **54**, 1133.
- Tipper, D.J. y Wright, A. (1979). *The bacteria*, vol. **III**, 291.
- Tolmasky, M.E.; Staneloni, R.J. y Leloir, L.F. (1982). *Journal of Biological Chemistry* **257**, 6751.
- Tolmasky, M.E.; Staneloni, R.J.; Ugalde, R.A. y Leloir, L.F. (1980). *Arch. Biochem. Biophys.* **203**, 358.
- Tomasiewicz, H.G. y Mc Henry, C.S. (1987). *J. Bacteriol.* **169**, 5735.
- Tomiska, S.; Ishino, F.; Tamaki, S. y Matsushashi, M. (1982). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **106**, 1175.
- Trevelyan, W.E.; Procter, D.P. y Harrison, J.S. (1950). *Nature (London)* **166**, 444.
- Trisler, P. y Gottesman, S. (1984). *J. Bacteriol.* **160**, 184.
- Troy, F.A. (1979). *Ann. Rev. Microbiol.* **33**, 519.
- Troy, F.A.; Freman, F.E. y Heath, E.C. (1971). *J. Biol. Chem.* **246**, 118.
- Tsiem, H.C. y Schmidt, E.L. (1977). *Can. J. Microbiol.* **23**, 1274.
- Tung, K.K. y Nordin, J.H. (1968). *Biochem. Biophys. Acta* **158**, 154.
- Umbreit, T.H. y Pate, J.L. (1978). *Arch. Microbiol.* **118**, 157.
- Uttaro, A.D.; Ielpi, L. y Ugalde, R.A. (1993). *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1055.
- van Brussel, A.A.N, Zaat, S.A.J., Canter-Cremers, H.C.J., Wijffelman, C.A., Pees, E., Tak, T. y Lugtenberg, B.J.J. (1986) *J. Bacteriol.* **165**, 517.
- van Golde, L.M.; Shulman, H. y Kennedy, E.P. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 1368.
- Vann, W.F., Liu, T.Y. y Robbins, J.B. (1978). *J. Bacteriol.* **133**, 1300.
- Verheul, A.F.M.; Snippe, H. y Poolman, J.T. (1993). *Microbiol. Rev.* **57**, 34.
- Vijn, I., das Neves, L., van Kammen, A., Franssen, H. y Bisseling, T. (1993) *Science* **260**, 1764.

- Vincent, J.M. (1970). A manual for the practical study of Root-Nodule Bacteria. Blackwell Scientific Publications, England.
- Ward, J.B. (1981). *Microbiol. Rev.* **45**, 211.
- Wasserman, D. y Strominger, J. (1983). *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 825.
- Weidel, W. y Pelzer, H. (1964). *Adv. in Enzymology* **26**, 193.
- Whitfield, C. y Troy, F.A. (1984). *J. Biol. Chem.* **259**, 12776.
- Whitfield, C.; Adams, D.A y Troy, F.A. (1984). *J. Biol. Chem.* **259**, 12764.
- Wise, E.M. y Park, J.T. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **54**, 75.
- Wright, A.; Dankert, M.A. y Robbins, P.W. (1965). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **54**, 235.
- Wright, A.; Dankert, M.A.; Fennessey, P. y Robbins, P.W. (1967). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**, 1798.
- York, W.S.; Mc Neil, M.; Darwill, G. y Albersheim, P (1980). *Journal of Bacteriology* **142**, 243.
- Yung, J.P.W. y Johnston, A.W.B. (1989). *Trends. Ecol. Evol.* **4**, 331.
- Zevenhuizen, L.P.T.M. (1981). *Antonie van Leeuwenhoek. J.Microbiol.Serol.*, **47**, 481.
- Zevenhuizen, L.P.T.M. (1984). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 393.
- Zevenhuizen, L.P.T.M. y Neerven, A.R.W. (1983). *Carbohydrate Research* **124**, 166.
- Zevenhuizen, L.P.T.M. y Scholten-Koerselman, H.J. (1979). *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* **45**, 165.
- Zevenhuizen, L.P.T.M. y Van Neerven, A.R.W. (1983). *Carbohydrate Research* **118**, 127.
- Zhan, H.; Levery, S.B.; Lee, C.C. y Leigh, J.A. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 33055.
- Zorreguieta, A. y Ugalde, R.A. (1986). *J. Bacteriol.* **167**, 947.
- Zorreguieta, A.; Cavaignac, S.; Geremia, R.A. y Ugalde, R.A. (1990). *Journal of Bacteriology* **174**, 4701.
- Zorreguieta, A.; Tolmasky, M.E. y Staneloni, R.J. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* **238**, 368.
- Zorreguieta, A.; Ugalde, R.A.; y Leloir, L.F. (1985). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 352.

≈ O ≈