Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis de Posgrado

Caracterización del proceso de translocación de poliprenol azúcares a través de membranas biológicas

Feldman, Mario F.

2000

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

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

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

Cita tipo APA:
Feldman, Mario F.. (2000). Caracterización del proceso de translocación de poliprenol azúcares a través de membranas biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3261_Feldman.pdf

Cita tipo Chicago:
Feldman, Mario F.. "Caracterización del proceso de translocación de poliprenol azúcares a través de membranas biológicas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3261_Feldman.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"Caracterización del proceso de translocación de poliprenol azúcares a través de membranas biológicas"

AUTOR: Mario F. Feldman

DIRECTOR: Dr. Armando J. Parodi

LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
-2000-

A mis padres, Marta y Bernardo.

A Diana.

Agradecimientos

Al Dr. Armando J. Parodi por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme realizar este trabajo de Tesis, aún cuando esto significó alejarse un poco de su tema de investigación. Trabajar con él logró alejarme (al menos momentáneamente) de la idea de instalar un maxi-kiosco.

Al Dr. Miguel Valvano, mi psicólogo virtual, por permitirme meter la cabeza en la microbiología, y por su estímulo y confianza.

Al Dr. Eduardo Ceccarelli y al Dr. Néstor Carrillo por darme un modelo a seguir cuando parecía que se venía la noche.

A Ceci, Juan y Vero por ser mucho más que compañeros de laboratorio. No sólo por alguna solución que me dio fiaca preparar, sino también por el afecto y pilas!!!... No los elegí...pero lo hubiera hecho!!!

A Fabiana por su ayuda en los momentos difíciles del comienzo y esos taxis compartidos de becarios bacanes.

A Cristina por la ayuda y paciencia en Canadá.

A mis compañeros de laboratorio Olga, Marcelo, Carlitos, Sandra y Verónica P. por los momentos que compartimos y esas charlas de viernes por la tarde...

A mis compañeros del Instituto: Fabio Fraga, Fernán, Marta, Pablo Cerdán, los vecinos del 212 (Amaicha, Fede, Nara y Fernanda), las chicas de Stane, los Wolosiuks, Fede Katzen, Ale Petroni y Cristian Oddo.

A Julio.

A mis amigos porteños: Gus, Isa, Umbra, Dani, Eugenia, Gus y Karin por estar siempre ahi y hacer más "llevadera" la supervivencia de un rosarino en Buenos Aires.

A Ale V. por el tiempo y esfuerzo monoclonal.

A Huguito, Laura, Eva y Margarita.

A Guillermo, Lilia, Nico, Virgy, Emilia y Gastón.

Al que inventó el e-mail.

A la comisión directiva de la Fundación Campomar por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto.

Al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas, a la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica y a la Universidad de Buenos Aires.

ABREVIATURAS

Abe	abecuosa
Amp	ampicilina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
Cm	cloramfenicol
dNTPs	desoxirribonucleótidos
Dol-P	dolicol-fosfato
Dol-P-Glc	dolicol-fosfato-glucosa
ECA	antígeno común a enterobacterias
Etn	etanolamina
IPTG	isopropil-β-tiogalactósido
Kb	kilobase
KDO	ácido cetodesoxioctanoico
Km	kanamicina
LB	medio Luria-Bertani
LD-Hep	L-glicero-D-manoheptosa
LPS	lipopolisacárido
m-DAP	*meso*-diaminopimelato
MurNAc	ácido N-acetil murámico
NBT	cloruro de 4-nitroblue tetrazolio
Nx	ácido nalidíxico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVDF	polivinilidendivinilfluoruro
RE	retículo endoplásmico
Rha	ramnosa
Sp	spectinomicina
TA	temperatura ambiente
Tet	tetraciclina
VioNAc	N-acetil-viosamina

ABREVIATURAS 1

RESUMEN 4

INTRODUCCION 6

1.1 Estructura del LPS 7
1.2 Biosíntesis de LPS 11
1.3 Biosíntesis de antígeno O 13
1.3.1 Reacciones de iniciación 13
1.2.2 Polimerización de las subunidades O y ligación al core 13
1.4 Estructura de los operones de biosíntesis de antígeno O 16
1.5 La enzima Wzx actúa posiblemente como una translocasa 19
1.6 Translocasas que intervienen en la biosíntesis de exopolisacáridos 23
1.7 Translocasas en la síntesis de peptidoglicano 25
1.8 Translocasas que translocan dolicol-azúcares a través de la membrana del retículo endoplásmico 28

2.-OBJETIVOS 30

3.-MATERIALES Y METODOS 31

3.1 Células y medios de cultivo 31
3.2 Procedimientos con DNA 31
3.3 Reacciones de PCR 33
3.4 Construcción y caracterización de la cepa de *E. coli* CLM20 33
3.5 Obtención de una mutante en el gen *glf* de *E. coli* K12 W3110 36
3.6 Southern-Blot 39
3.7 Construcción del plásmido pMF19 40
3.8 Clonado y expresión de las diferentes putativas translocasas 40
3.9 Purificación de LPS (minipreparaciones) 41
3.10 Purificación de LPS (maxipreparaciones) 42
3.11 Análisis de LPS 43
3.12 Aglutinación por la lectina WGA 44
3.13 Cuantificación de LPS 44
3.14 Reacciones de RT-PCR 44

4.- RESULTADOS 46

4.1 Obtención y caracterización de una mutante glf- 46
4.2 Una subunidad O16 formada por tres azúcares se puede translocar y unir al core 50
4.3 Análisis estructural del LPS de las cepas MFF1y MFF1(pMF19) 52
4.4 Undecaprenol-P-GlcNAc es la mínima unidad requerida para translocarse y unirse al core 56
4.5 Caracterización de una mutante wzx en *E coli* O7 60
4.6 Especifidad de la translocación de antígeno O 63

5.-DISCUSION 67

5.1 Subunidades O incompletas pueden translocarse a través de la membrana interna y ligarse al core 67
5.2 La GlcNAc terminal en el core de *E. coli* K12 proviene de la vía de síntesis de antígeno O 69
5.3 Las proteínas Wzx codificadas por operones de síntesis de antígeno O son intercambiables 70
5.4- Un proceso similar de translocación independiente de la estructura glicosídica podría ocurrir en eucariotas 72

REFERENCIAS 75

RESUMEN

La biogénesis de estructuras complejas que contienen hidratos de carbono como el lipopolisacárido (LPS), los exopolisacáridos, el peptidoglicano y los ácidos teicoicos en procariotas y las glicoproteínas en eucariotas se realiza generalmente a partir de precursores nucleótido-azúcares que transfieren sus restos de azúcares a poliprenoles como el undecaprenol y el dolicol (Dol). Los nucleótido azúcares se encuentran normalmente disponibles en el citoplasma, mientras que los poliprenoles están asociados con una bicapa lipídica. Una vez ensamblados, los azúcares unidos al poliprenol deben atravesar membranas para su posterior procesamiento (polimerización como en el caso del LPS o transferencia a proteínas como ocurre en la formación de glicoproteínas). Este proceso no ocurre espontaneamente y parece estar mediado por proteínas, aunque sólo para el pasaje a través de la membrana interna procariótica de las subunidades de antígeno O (el componente más variable del LPS) se ha identificado una proteína, denominada Wzx con actividad translocasa o "flipasa".

Las diferentes translocasas Wzx poseen una muy baja homología de secuencias tanto a nivel de DNA como de proteínas. Los intentos para sobreexpresar Wzx han sido infructuosos, lo que no ha permitido la realización de experimentos tendientes a caracterizar estructural y mecanísticamente a las translocasas.

En este trabajo se investigó si es necesario que las subunidades O se sinteticen completamente para poder ser translocadas. Se obtuvo una mutante en el gen *glf*, responsable de la síntesis de galactofuranosa, el último de los cuatro azúcares que componen la subunidad O16 en *Escherichia coli*. Se observó que esta mutante es capaz de translocar una subunidad incompleta conteniendo sólo tres azúcares a través de la membrana. Experimentos utilizando la lectina del germen de trigo (WGA) permitieron establecer que también es posible translocar una subunidad truncada

conteniendo sólo uno o dos residuos e incorporar estos azúcares al core del LPS.

Experimentos de complementación realizados en una mutante de *E. coli* O7 en el gen *wzx* con translocasas de *Salmonella enterica* y *E. coli* O16 demostraron que la translocación de subunidades de antígeno O es independiente de la naturaleza química de la porción glicosídica de la subunidad O. Por el contrario las putativas translocasas involucradas en la síntesis de exopolisacáridos no fueron capaces de complementar la mutación en *wzx*.

Los resultados presentados en esta Tesis indican que no se requiere que la subunidad O esté completa para que sea reconocida por la maquinaria de translocación y se produzca su pasaje a través de la membrana, pudiendo translocarse subunidades truncadas o completamente diferentes a las que normalmente se producen en una determinada cepa. Los resultados obtenidos sugieren además un modelo de biosíntesis de antígeno O que involucra el reconocimiento del prenol-oligosacárido por un hipotético complejo compuesto por la putativa translocasa Wzx y otras proteínas que participan en la síntesis de antígeno O.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis han sido publicados en:

-" Feldman M. F., Marolda C. L., Monteiro M. A., Perry M. B., Parodi A. J. y Valvano M. A. (1999). The activity of a putative translocase (Wzx) involved in *Escherichia coli* O-antigen assembly is independent of the chemical structure of the O repeat". *J. Biol. Chem* **274**, 35129-35138.

-" Marolda C. L., Feldman M. F.y Valvano M. A. (1999). Genetic organization of the O7-specific lipopolysaccharide biosynthesis cluster of *Escherichia coli* VW187 (O7:K1)". *Microbiology* **145**, 2485-2495.

INTRODUCCION

Todos los organismos vivientes exhiben en la superficie de sus células un conjunto de carbohidratos complejos, cuyas estructuras son características de una especie, un tejido o un tipo celular específico. Además de su rol como moléculas de reconocimiento, los hidratos de carbono proveen en algunos casos funciones protectivas a las células que los producen[1]. La presencia en la envoltura o en el exterior celular de macromoléculas hidrofílicas sintetizadas en el citoplasma sugiere la existencia de mecanismos de transporte que permitan exportar los intermediarios biosintéticos o los productos finales a través de la membrana plasmática[2].

De acuerdo a los modelos propuestos, para la biosíntesis de algunos de estos compuestos debe producirse el movimiento a través de la membrana plasmática de los glicolípidos intermediarios. Este pasaje transmembrana es necesario para la síntesis de polisacáridos bacterianos entre los que se incluyen el lipopolisacárido (LPS), embebido en la membrana externa de las bacterias Gram negativos; los ácidos teicoicos, que se encuentran asociados con las membranas de bacterias Gram positivos y los polisacáridos capsulares y exopolisacáridos sintetizados por bacterias de ambas clases. La translocación de glicolípidos también es requerida para la síntesis de mureína, el componente principal de la pared celular bacteriana. Además, el movimiento transmembrana de glicolípidos es una de las etapas necesarias para la síntesis de glicoproteínas en eucariotas, aunque en este caso la membrana involucrada es la membrana del retículo endoplásmico (RE).

La biogénesis de estructuras complejas que contienen hidratos de carbono, tanto en eucariotas como en procariotas, se realiza generalmente a partir de precursores nucleótido azúcares y poliprenoles fosfato, como el undecaprenol-P y el dolicol-P (Dol-P). Los nucleótido azúcares se encuentran normalmente disponibles en el citoplasma, mientras que los poliprenoles están asociados con la membrana. Una vez ensamblados, los azúcares

unidos al poliprenol deben atravesar la bicapa para su posterior procesamiento que incluye la polimerización en el caso del LPS o la transferencia a proteínas que ocurre durante la formación de glicoproteínas.

En las secciones siguientes se describe lo que se conoce hasta el presente de la estructura y la biosíntesis de LPS, molécula que se ha utilizado en esta tesis como modelo de estudio de la translocación de glicolípidos a través de membranas.

1.1 Estructura del LPS

El LPS es un componente fundamental de la membrana externa de las bacterias Gram negativos. El principal interés en el estudio de las moléculas de LPS se basa en su compleja interacción con el sistema inmunitario del huésped y su contribución a la virulencia de bacterias patogénicas.

El LPS (figura 1) está formado por tres regiones o dominios unidos covalentemente[3] : el lípido A, el core y el antígeno O.

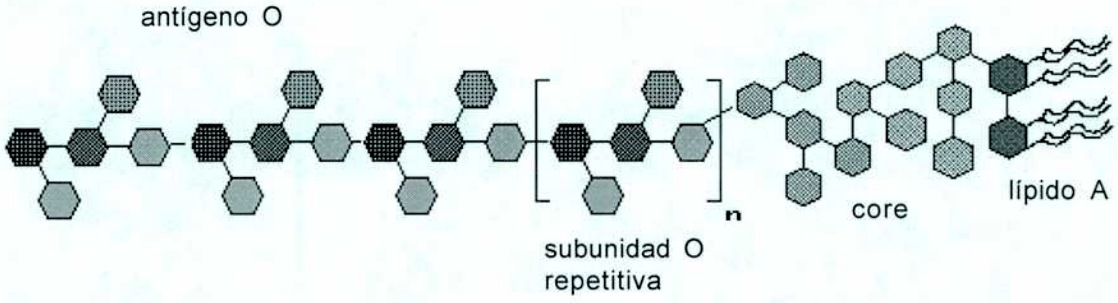


Figura 1

Estructura del LPS

El lípido A (endotoxina), (figura 2), funciona como el ancla hidrofóbica del LPS en la membrana externa y es el componente bioactivo responsable de

la toxicidad asociada con las infecciones severas provocadas por bacterias Gram negativas. La estructura del lípido A se encuentra relativamente conservada entre las diferentes especies de bacterias entéricas.

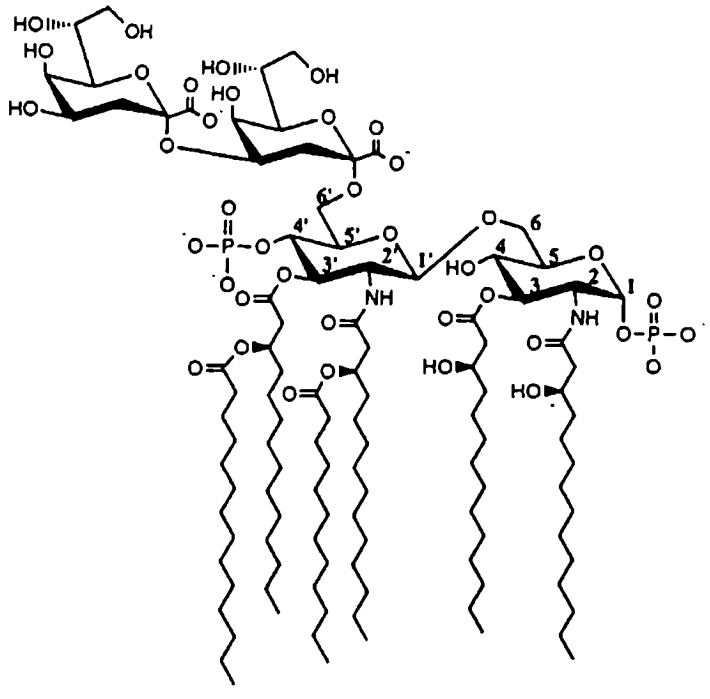


Figura 2

Estructura del lípido A. En la figura se representa la estructura del lípido A unido a dos moléculas de ácido cetodesoxioctanoico (KDO), que es la estructura mínima necesaria para el crecimiento de *E. coli* y otras bacterias Gram negativas. Los carbonos del disacárido de GlcNAc se encuentran numerados.

El core, un oligosacárido no repetitivo fosforilado que funciona como barrera de permeabilidad contra antibióticos. Se han detectado diferencias estructurales en el core dentro de una misma y entre diferentes especies[4]. En la figura 3 se describe la estructura del core de *Escherichia coli* K12.

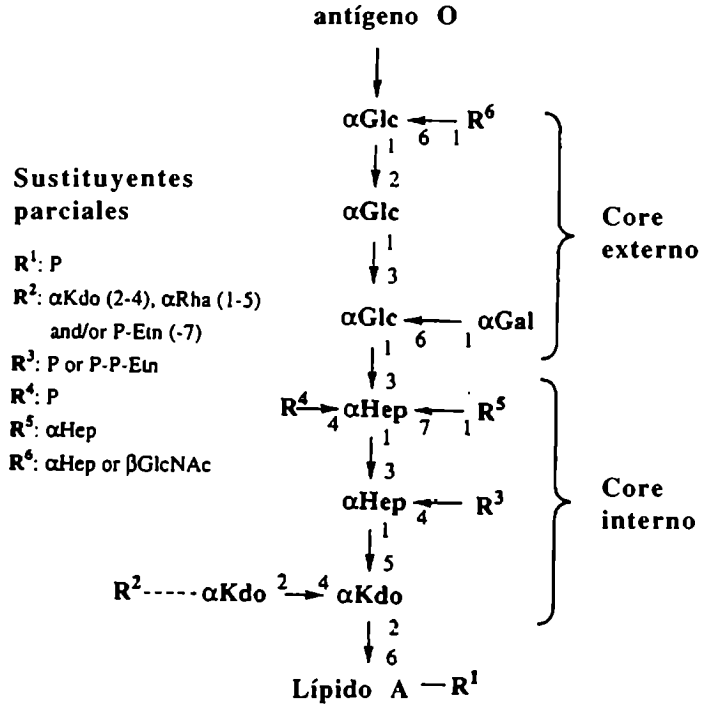


Figura 3

Estructura del core de *E. coli* K12. Se indican todas las uniones y configuraciones anoméricas. Etn, etanolamina.

El antígeno O es un polisacárido formado por entre 1 y 40 subunidades repetitivas (subunidades O) que varía enormemente de cepa en cepa y que es habitualmente el antígeno de superficie inmunodominante. La presencia de antígeno O en la superficie celular se ha relacionado con el aumento de la virulencia y el incremento de la resistencia de las células bacterianas a la lisis mediada por complemento[5].

Más de 170 estructuras diferentes de antígenos O se han identificado solamente en *E. coli* y aproximadamente 50 serogrupos en *Salmonella enterica*[3]. Las diferencias estructurales encontradas se hallan en la composición de azúcares, en las uniones entre estos azúcares y en las uniones entre las subunidades. Estas variaciones determinan las especificidades serológicas del anígeno O[6]. En la figura 4 se observa la composición de algunas subunidades repetitivas de diferentes bacterias.

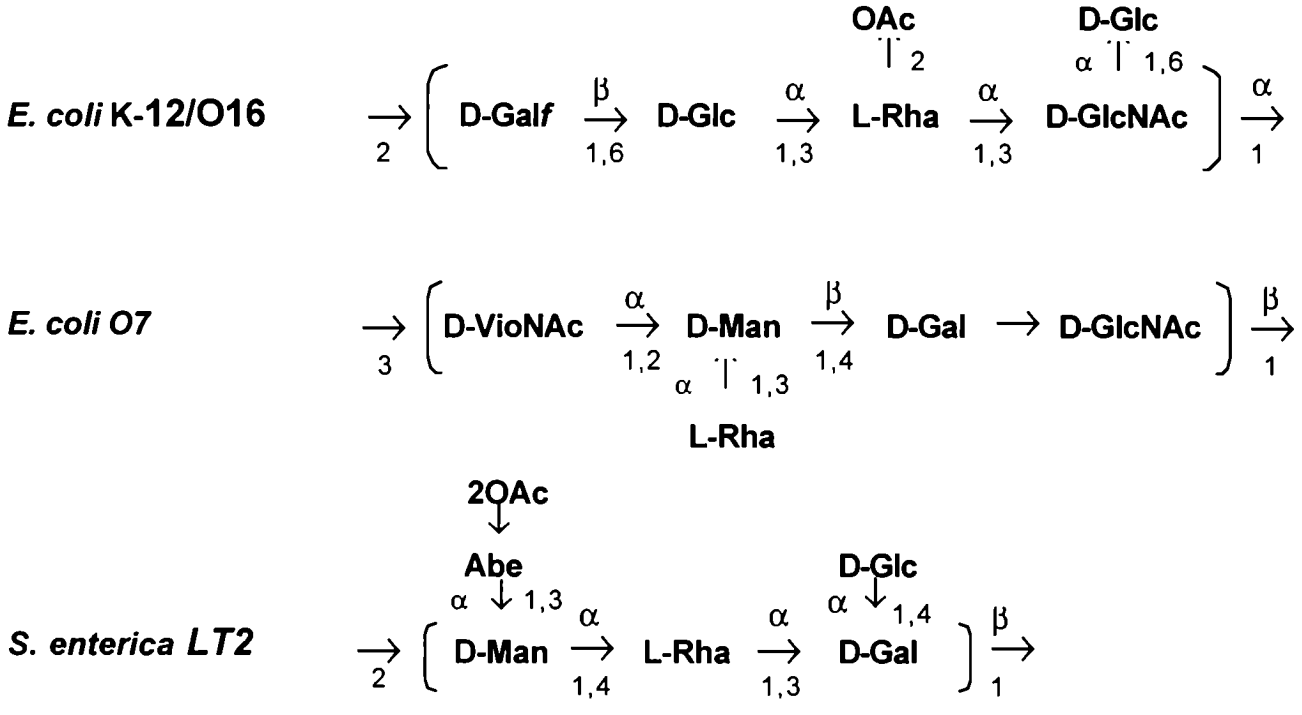


Figura 4

Estructura de las subunidades repetitivas de antígeno O de *E. coli* K12/O16, *E. coli* O7 y *S. enterica* LT2.

1.2 Biosíntesis de LPS

La elucidación del mecanismo detallado de la biosíntesis y secreción de LPS constituye uno de los grandes desafíos de la bioquímica de los procariotas. Debido a su gran tamaño, composición anfifílica y microheterogeneidad es dificultoso determinar las estructuras covalentes completas y las conformaciones de los LPS. Esta complejidad también se observa desde el punto de vista genético, ya que se ha determinado que al menos 50 genes son requeridos para la biogénesis y el ensamblado del LPS.

La mayoría de los estudios sobre la biosíntesis de antígeno O se han realizado en *Salmonella*, mientras que es muy poco lo que se ha investigado en *E. coli* K12, dado que su capacidad de sintetizar antígeno O no fue reconocida hasta hace unos pocos años [7].

La biosíntesis de las subunidades de antígeno O, que es independiente de la de lípido A-core[8, 9], comienza con el ensamblado de las subunidades O por medio de la transferencia secuencial de azúcares sobre un lípido transportador, el undecaprenol-fosfato o bactoprenol-fosfato (figura 5). Estas reacciones se llevan a cabo en el lado citoplasmático de la membrana interna.

Luego las subunidades son transportadas hacia el lado periplásmico y son polimerizadas desde el extremo reductor por una polimerasa. Por último el antígeno O completo debe ser transportado hacia la membrana externa, en un proceso que ha sido muy poco estudiado (figura 5). En las secciones siguientes nos centraremos en la descripción de los procesos biosintéticos que conducen a la formación de antígeno O.

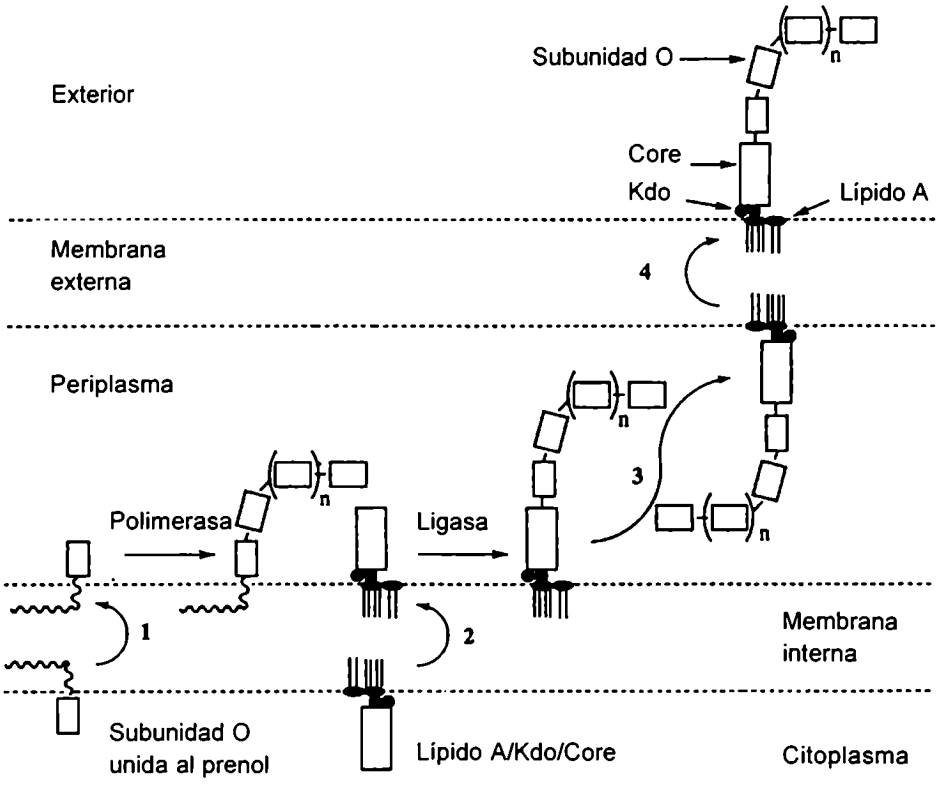


Figura 5

Representación esquemática de la biosíntesis de LPS. Los pasos 1 a 4 indican los eventos de translocación que requieren la intervención proteica o el suministro de energía metabólica.

1.3 Biosíntesis de antígeno O

1.3.1 Reacciones de iniciación

El primer azúcar-fosfato que se transfiere al undecaprenol-P es generalmente N-acetilglucosamina-1-P (GlcNAc-1-P) o galactosa-1-P (Gal-1-P) a partir del nucléotido azúcar correspondiente. En *Salmonella typhimurium* LT2 y todas la demás cepas que que comienzan con Gal, esta reacción reversible es catalizada por una proteína de membrana codificada por el gen *wbaP* (*rfbP*). La otra única enzima inciadora conocida es WecA (Rfe), una GlcNAc-1-P transferasa. Esta enzima cataliza en varios serotipos de *E. coli* , *Shigella*, *Yersinia, Serratia y Klebsiella* la transferencia de GlcNAc-1-P al undecaprenol-P (figura 6). La actividad de esta proteína, también ubicada en la membrana interna, es necesaria además para la síntesis de otros polisacáridos como el ácido colánico y el antígeno común a enterobacterias (ECA) y, curiosamente, también inicia la formación de antígenos O homopoliméricos en *E. coli* O8 y O9 y en *Klebsiella pneumoniae*, aunque las subunidades O de esos homopolisacáridos no contienen GlcNAc y sus mecanismos de polimerización difieren del descripto para heteropolisacáridos[10].

El producto, undecaprenol-pirofosfato-hexosa sirve como aceptor para las reacciones de glicosilación posteriores que, como se ha mencionado anteriormente, proceden secuencialmente permitiendo la formación de subunidades que poseen entre 3 y 6 azúcares. Las enzimas responsables de estas transferencias se encuentran en el citoplasma. En la primera reacción se transfiere un azúcar-fosfato, mientras que en las reacciones subsiguientes sólo se transfiere el azúcar a partir del nucleótido azúcar correspondiente.

1.2.2 Polimerización de las subunidades O y ligación al core

Se han descripto dos mecanismos diferentes mediante los cuales las subunidades se polimerizan. En el caso de polisacáridos homopoliméricos, como los de *E. coli* O8 y *E. coli* O9 y algunos polisacáridos capsulares, la polimerización se lleva a cabo en la cara citoplasmática de la membrana interna por la acción secuencial de las diferentes glicosiltransferasas que *elongan* el polisacárido por el extremo no reductor[11]. El polisacárido naciente es transportado a través de la membrana citoplasmática por un transportador del tipo ABC (por "ATP-binding casette", transportadores que poseen un sitio de unión a ATP) y subsecuentemente ligado al lípido A-core[12]. Este mecanismo es conocido como Wzy(polimerasa)-independiente, ya que no interviene la polimerasa codificada por el gen *wzy*[13].

El segundo mecanismo requiere la translocación o "flipping" de la subunidad O a través de la membrana interna hacia el lado periplásmico, donde se produce la polimerización por acción de la proteína Wzy. Esta polimerasa actúa mediante un mecanismo por el cual se transfiere el polímero en crecimiento desde un undecaprenol-pirofosfato a una única subunidad unida a otra molécula de undecaprenol. La reacción ocurre de manera tal que el extremo reductor del polímero reacciona con el extremo no reductor de la subunidad O, la cual permanece unida al undecaprenol por su extremo reductor. El polímero unido al undecaprenol se liga luego "en bloc" al lípido A-core por una reacción catalizada por una ligasa en la cara periplasmática de la membrana. Este mecanismo, referido como *wzy* (polimerasa)-dependiente es el que se utiliza en la síntesis de la mayoría de los antígeno O, especialmente en aquellos formados por subunidades compuestas por diferentes azúcares (antígenos O heteropoliméricos).

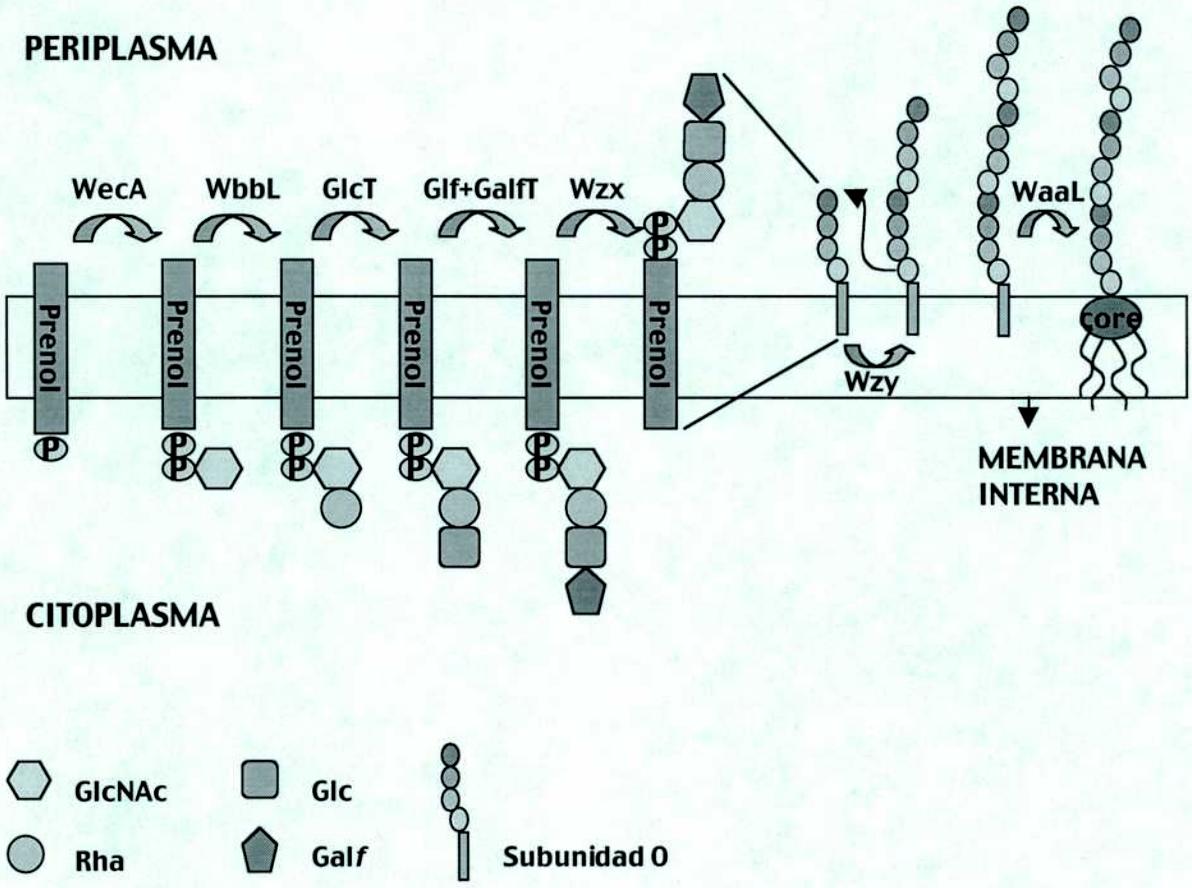


Figura 6

Biosíntesis de antígeno O en *E. coli* K12/O16. Sobre las flechas se indican las proteínas responsables de cada etapa.

Para este mecanismo no se ha identificado ningún transportador del tipo ABC, por lo que se desconoce de dónde proviene la energía para la translocación de las subunidades. En la figura 6 se representa esquemáticamente la biosíntesis de antígeno O16 en *E. coli* K12/O16, que opera por este mecanismo.

Una característica interesante de los sistemas dependientes de *polim*erasa es que la longitud de las cadenas de antígeno O está rigurosamente controlada. El proceso involucra a una enzima denominada Wzz (antes conocida como *rol* por "regulator of O-chain lenght" o *cld*). La longitud de los polisacáridos O tiene una distribución bimodal, observándose que cadenas de una sola subunidad son muy abundantes, pero moléculas conteniendo más unidades son progresivamente menos abundantes. Sin embargo esta tendencia se revierte al llegar a un número mayor de subunidades de antígeno O, siendo cada vez más abundantes moléculas con entre 25 y 35 subunidades[14]. La existencia de este mecanismo ha sido confirmada por la observación de que la mutagénesis del gen *wzz* elimina la distribución bimodal y produce una distribución de las longitudes de antígeno O que es la que se predice por una ligación y polimerización al azar[15,16]

1.4 Estructura de los operones de biosíntesis de antígeno O

Los genes involucrados en la biosíntesis de polisacáridos generalmente se agrupan en operones o "clusters". *E. coli* posee varios de estos operones, entre los que se encuentran los necesarios para la síntesis del core, del antígeno O y de exopolisacáridos como el ácido colánico, el ECA y las cápsulas K. Estos operones están formados en general por 3 clases de genes: a) aquellos requeridos para las enzimas involucradas en caminos biosintéticos de nucleótido azúcares (u otros componentes), necesarios para la síntesis de polisacáridos y que, por no ser requeridos en otra vías metabólicas, no se encuentran codificadas en otra región del cromosoma; b)

los genes para las glicosiltransferasas, y c) los genes para el procesamiento de oligo o polisacáridos. El número de genes varía dependiendo de la complejidad del polisacárido.

Para la síntesis de antígeno O ya se han identificado 26 genes diferentes considerando solamente *Salmonella* y un número bastante mayor en *E. coli*. Recientemente[17], y debido a la enorme cantidad de genes involucrados en la síntesis de los diferentes antígenos O, se ha adoptado una nueva nomenclatura. El operón para la síntesis de antígeno O, antes nombrado *rfb*, ha recibido la denominación *wb*.

Analizaremos los operones para la síntesis de antígeno O de dos cepas de *E. coli*: *E. coli* K12/O16 y *E. coli* O7 y de *S. enterica* LT2, que serán utilizados como modelo de estudio en esta Tesis.

El antígeno O de *E. coli* K12/O16, la cepa de uso más frecuente en los laboratorios de biología molecular, contiene GlcNAc, ramnosa (Rha), glucosa (Glc) y galactofuranosa (Gal*f*) (figura 4). La organización del operon *wb* de *E. coli* K12/O16 ha sido descripta por los grupos de P. Reeves y M. Valvano [7, 58] Dentro de este operón (figura 7A) se encuentran los genes necesarios para la síntesis de Rha y Gal*f*. Para la síntesis de Rha se requieren 4 genes, que son los cuatro primeros del operón y que permiten la síntesis de TDP-Rha a partir de Glc-1P [3]. Para la síntesis de Gal*f* sólo se requiere un gen, denominado *glf*, que codifica para la UDP-galactopiranosa mutasa, responsable de la conversión de UDP-galactopiranosa (UDP-Gal*p*) en UDP-Gal*f*[18]. También existen genes que codifican las transferasas de Glc y Gal*f* que transfieren estos azúcares en las posiciones tercera y cuarta de la subunidad O respectivamente. Para la síntesis de la subunidad O es necesaria también una ramnosil transferasa que transfiera la Rha en la segunda posición del esqueleto O16, luego de la GlcNAc y una acetil transferasa, que transfiere un grupo acetilo al carbono 2 de la Rha. Además existen genes para la polimerasa (*wzy*) y la putativa translocasa (*wzx*) (ver siguiente sección) (figuras 4 y 6). Las cepas de *E. coli* K12 del linaje W3110 usualmente no producen antígeno O debido a que poseen una inserción del tipo IS*5*

interrumpiendo el gen *wbbL*, que codifica para la ramnosiltransferasa[7,19]. La introducción del gen *wbbL* en trans es capaz de restablecer la capacidad de sintetizar antígeno O.

E coli VW187 (O7:K1) es la cepa responsable de algunas infecciones intraintestinales y meningitis en neonatos e infecciones en el tracto urinario en adultos[20]. El antígeno O7 contiene cinco azúcares: GlcNAc, Gal*p*, manosa (Man), Rha y N-acetilviosamina (N-VioNAc) (figura 2). La organización del operón *wb* de esta cepa (figura 7B) ha sido descripta por el grupo de M. Valvano[16, 21]. Dentro de este operón se encuentran cuatro genes implicados en la biosíntesis de TDP-Rha, dos para la síntesis de GDP-Man, dos para la síntesis de TDP-VioNAc, cuatro transferasas de azúcares, el gen de la translocasa (*wzx*) y el gen de la polimerasa (*wzy*). El gen *wzz*, regulador de la longitud de la cadena de antígeno O se halla fuera del operón.

El antígeno O de *S. enterica* LT2 (serovar typhimurium, grupo B) contiene Gal*p*, Rha, Man y abecuosa (Abe) (figura 2). En el operón (figura 7C) se encuentran cuatro genes para la síntesis de TDP-Rha, cinco para la síntesis de CDP-Abe y dos para la síntesis de GDP-Man, el gen para la translocasa Wzx y los genes que codifican para la cuatro transferasas que transfieren los azúcares desde los nucleótido-azúcares a la subunidad O en formación. El UDP-Gal*p* tiene otras funciones adicionales en *S. enterica* y por lo tanto su biosíntesis no está controlada por el operón *wba*. El gen *wbaP*, a diferencia de su homólogo *wecA* en *E. coli*, está contenido dentro del operón.

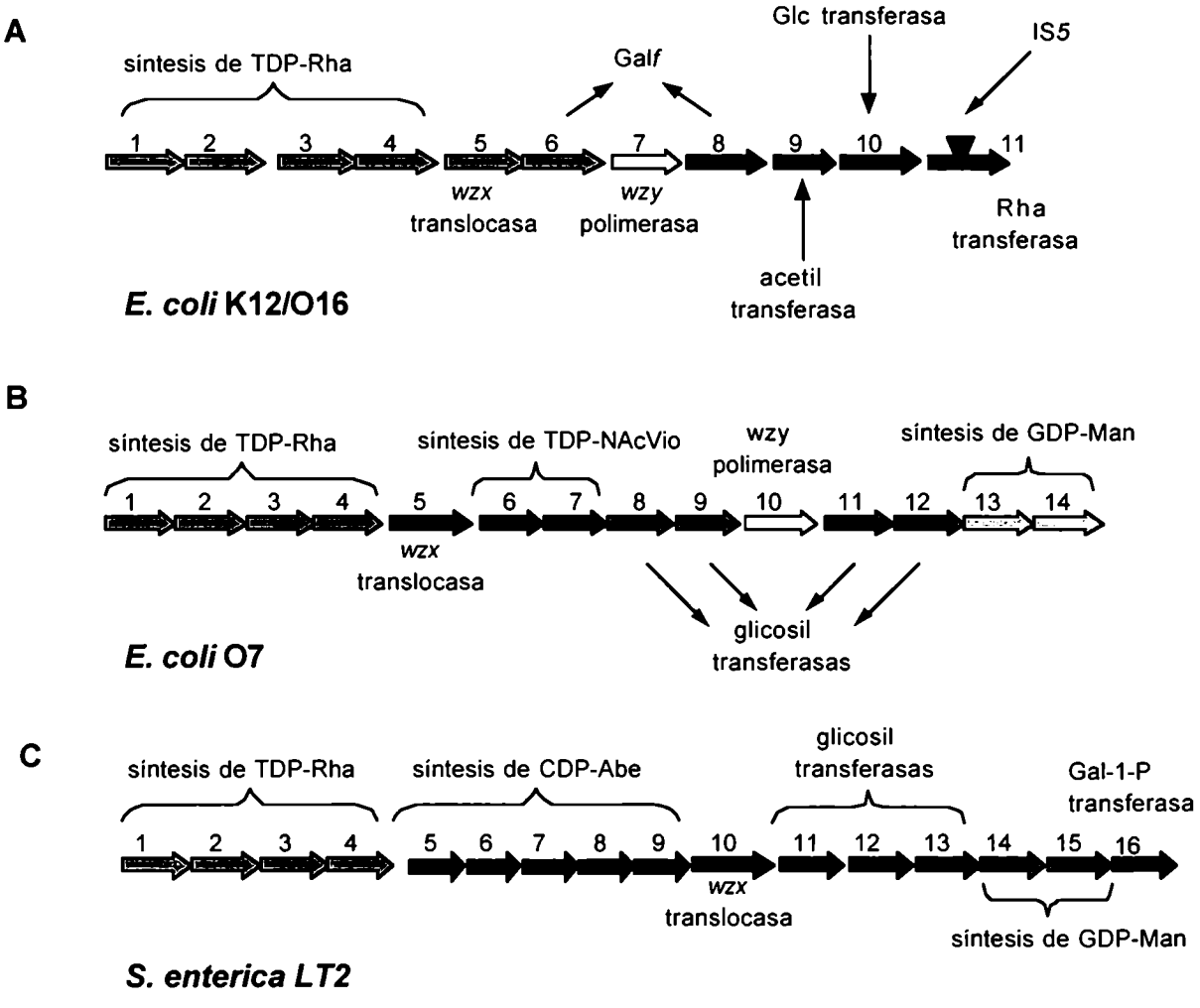


Figura 7
Organización genética de los operones *wb* de las cepas *E. coli* K12/O16 (A), *E. coli* O7 (B) y *S. enterica* LT2 (C).

1.5 La enzima Wzx actúa posiblemente como una translocasa

Todos los operones de antígeno O que operan por el mecanismo dependiente de polimerasa contienen un gen que codifica para una proteína que posee 12 potenciales regiones transmembrana[2, 22], designada como Wzx (previamente RfbX). Esta proteína ha sido postulada como la "flipasa" o "translocasa" encargada de translocar la subunidad O a través de la membrana interna[19].

Las diferentes translocasas (Wzx) poseen una muy baja homología de secuencias tanto a nivel de DNA como de proteínas. Esta particularidad ha sido explotada para utilizar los diferentes genes *wzx* como marcadores genéticos y poder distinguir entre diferentes serotipos, aún dentro de una misma especie[16, 23]. En la figura 8 se observa el alineamiento de secuencias de las translocasas de antígeno O de diferentes cepas de *E. coli, Salmonella. Pseudomonas* y *Shigella.* Aunque la homología a nivel estructura primaria es muy baja, si se analizan los diagramas de hidropatía de las diferentes translocasas puede predecirse que todas las proteínas Wzx secuenciadas hasta el momento poseen 12 hélices transmembrana, siendo los diagramas resultantes muy similares.

Los intentos por sobreexpresar Wzx han sido infructuosas[22], lo que ha imposibilitado los estudios estructurales y mecanísticos de las putativas translocasas. Anteriormente se han descripto casos en los cuales la sobreexpresión de una proteína de membrana resultaba letal, especulándose que se vería comprometida la integridad o el funcionamiento de la membrana[24]. Hasta hace muy poco tiempo tampoco había sido posible obtener mutantes en el gen *wzx* cromosomal[19], y se asumía que la acumulación de las subunidades O resultaba deletérea para la célula. Una explicación para este fenómeno es que la acumulación de subunidades O consumiría una gran cantidad de undecaprenol. Al no disponer la célula de tal cantidad, la síntesis de mureína se vería alterada, lo que podría resultar letal. Sin embargo, sí ha sido posible realizar estudios en una cepa transformada con un plásmido codificando un operón completo de antígeno O que posee un

transposón insertado en el gen *wzx*. Este trabajo, es, hasta el momento, el único en el que se estudió la actividad "flipasa" o translocasa de Wzx. En los experimentos de Liu y colaboradores[25], se demostró que una mutación en el gen *wzx* de *Shigella dysenteriae* provoca la acumulación de subunidades O. Además los autores postularon que esta acumulación se produce en el lado citoplásmatico de la membrana interna, aunque las evidencias basadas en experimentos con vesículas invertidas y esferoplastos no fueron del todo concluyentes.

Recientemente se obtuvo en *Pseudomonas aeruginosa* O5, una mutante cromosomal.en el gen *wzx*[26] En esta mutante no hay producción de antígeno O y, curiosamente se ve afectada también la síntesis de un homopolímero de Rha. Esta última característica se revierte si se aumentan los niveles del gen homólogo a *wecA*.

Por todo esto, la asignación de Wzx como una translocasa es sólo tentativa y se requieren experimentos adicionales para la elucidación del mecanismo bioquímico involucrado en la presunta actividad de translocasa.

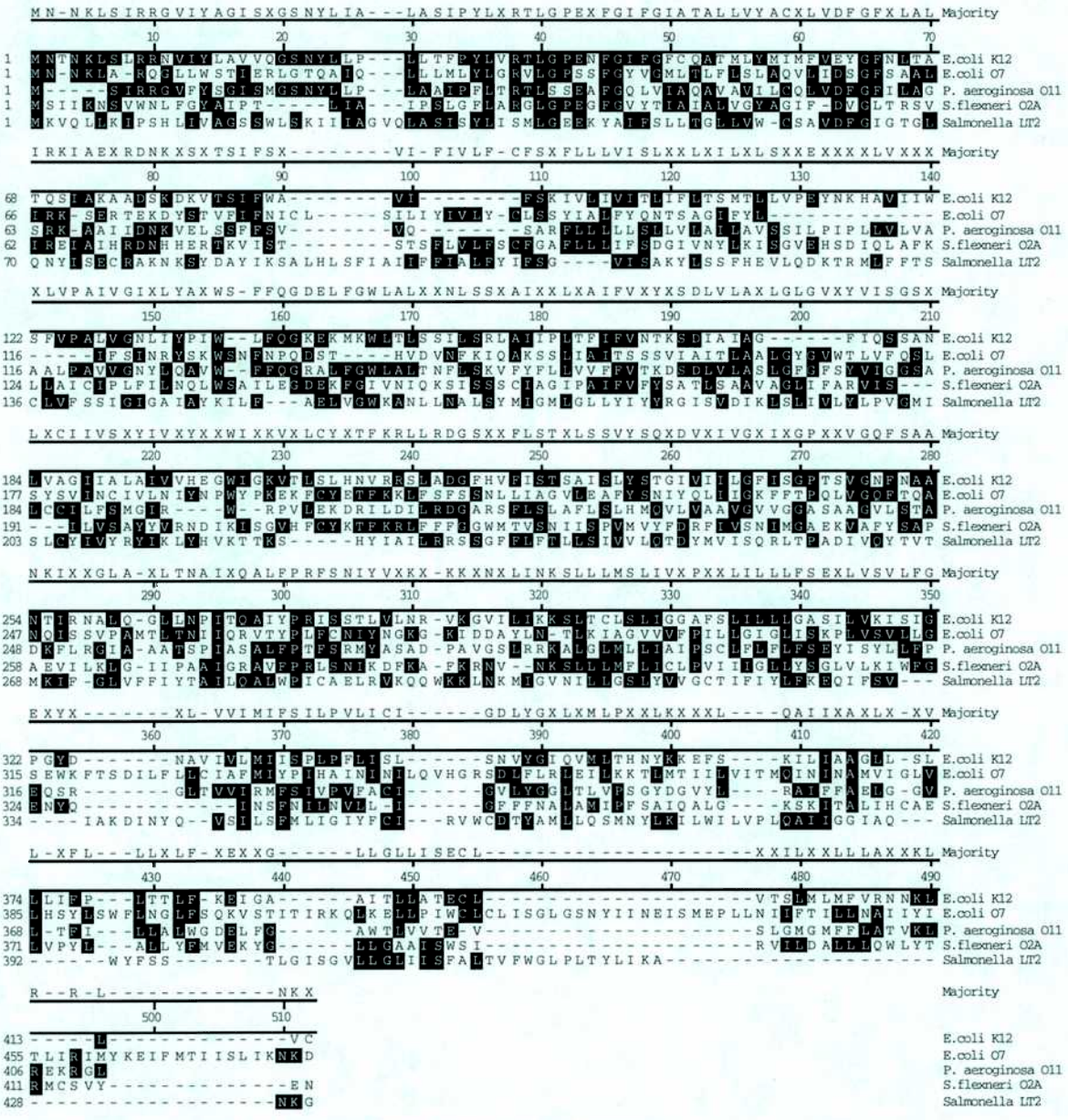


Figura 8

Alineamiento de las secuencias de algunas putativas translocasas de diferentes orígenes. En negro se observan los aminoácidos conservados.

1.6 Translocasas que intervienen en la biosíntesis de exopolisacáridos

La biosíntesis de exopolisacáridos generalmente se inicia de la misma manera que la síntesis de antígeno O, con la transferencia de azúcares-P desde nucleótido azúcares hacia un prenol-P. Para la translocación a través de la membrana se ha propuesto un mecanismo similar al planteado para el antígeno O. Entre los polisacáridos que operarían por este mecanismo se encuentran el succinoglicano de *Rhizobium meliloti* [27], el xantano de *Xanthomonas campestris*, el ácido colánico en *E. coli* [28], el amilovorano en *Erwinia amylovora* y el exopolisacárido de *Lactococcus lactis*. En los respectivos operones existen genes homólogos a la putativa translocasa Wzx, que poseen 12 regiones transmembrana. Además se han encontrado también homólogos a Wzx en bacterias Gram positivas, como *Bacillus subtilis*. En este caso el gen homólogo a *wzx* intervendría en la biosíntesis de ácidos teicoicos[29].

En *R. meliloti*, la mutación del gen homólogo a *wzx*, *exoT*, produce un fenotipo distintivo. La cepa mutante *exoT* sintetiza normalmente el succinoglicano de alto peso molecular, pero no produce el succinoglicano de bajo peso molecular que consiste en dímeros y trímeros de la subunidad de octasacárido. Este hecho plantea la posibilidad que ExoT pueda tener alguna otra función adicional a la de translocasa o aún cumplir una función completamente diferente. Se ha postulado además que ExoT formaría complejos con otras proteínas de membrana como ExoP y ExoQ[30].

En la figura 9 se representan las estructuras de las subunidades repetitivas del sucinoglicano y del ácido colánico.

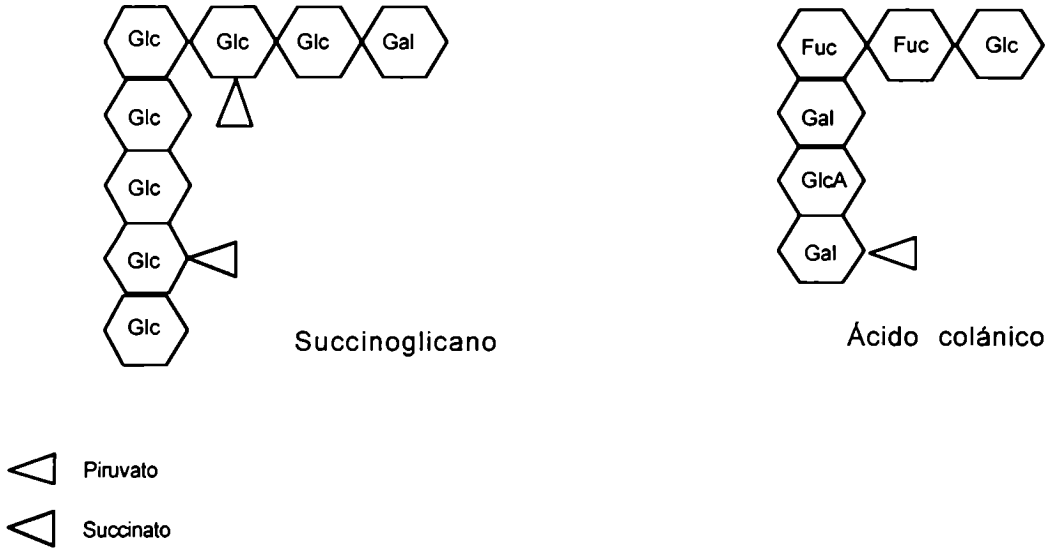


Figura 9

Estructura de las subunidades repetitivas del succinoglicano de *R. meliloti* y el ácido colánico de *E. coli* K12.

Puede observarse en la figura 10 el árbol filogenético resultante de la comparación de las putativas translocasas de antígeno O, exopolisacáridos y ácido teicoico. De este árbol se desprende que existen translocasas de antígeno O, como la de *E. coli* O7 que presenta más homología con translocasas de exopolisacáridos como ExoT o WzxC que con otras translocasas de antígeno O de su misma especie, como la de *E. coli* O157, lo cual sugiere una función común para todas estas translocasas: la translocación de oligosacáridos-prenol a través de la membrana.

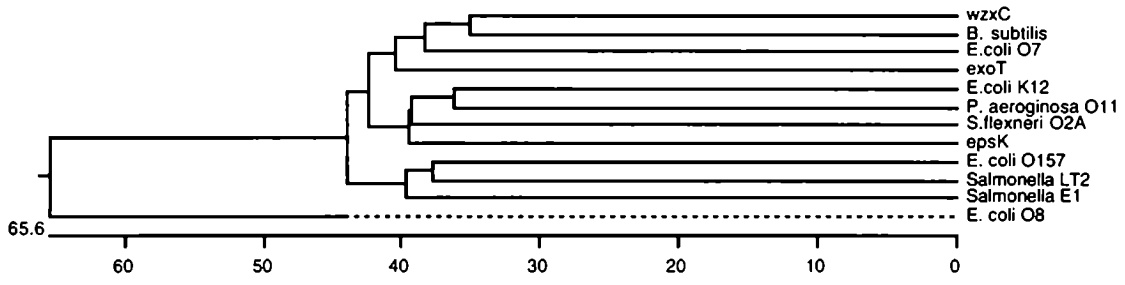


Figura 10

Arbol filogenético que incluye translocasas de antígeno O (*E. coli* K12, *E. coli* O7, *E. coli* O157, *E coli* O8, *S. enterica* LT2, *S. enterica* E1, *P. aeroginosa* O11 y *S. flexneri* O2A), de exopolisacáridos (ExoT, EpsK y WzxC) y de ácidos teicoicos (*B. subtilis*).

1.7 Translocasas en la síntesis de peptidoglicano

La biosíntesis de peptidoglicano ha sido el foco de una exhaustiva investigación durante los últimos 40 años, debido principalmente a la vulnerabilidad de las bacterias a la inhibición de esta esencial y exclusiva vía[31]. El descubrimiento y la aplicación clínica de los antibióticos β-lactámicos y glicopéptidos que actúan sobre las últimas etapas de la biosíntesis de mureína han hecho posible el tratamiento de rutina de infecciones bacterianas. Sin embargo, el uso indiscriminando de estos antibióticos ha llevado a la aparición global de resistencias a estos antibióticos. Por lo tanto, se ha renovado el interés por el estudio de la biosíntesis de peptidoglicano en busca de nuevos blancos de inhibición para antibióticos.

El peptidoglicano se sintetiza en tres etapas: síntesis del precursor citoplasmático UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-X-D-Ala-D-Ala (donde X puede ser ácido meso-diaminopimélico, m-DAP, o L-Lys); translocación a través de la membrana plasmática, y transglicosilación y cross-linking sobre la superficie

celular (figura 11).

El pentapéptido precursor es sintetizado en el citoplasma mediante la adición secuencial de L-Ala, D-Glu y m-DAP a UDP-MurNAc, seguida de la adición de un dipéptido D-Ala-D-Ala por ligasas solubles dependientes de ATP[31]. El pentapéptido-MurNAc se transfiere posteriormente a undecaprenol-P que actúa como transportador, por la acción de una proteína integral de membrana (translocasa I), que en *E. coli* está codificada por el gen *mraY*, produciéndose UMP y undecaprenol-pirofosfato-MurNAc-pentapéptido (figura 9). Posteriormente se agrega GlcNAc al residuo de MurNAc por la transferasa codificada por el gen *murG* Se ha demostrado recientemente que esta enzima se encuentra periféricamente asociada a la cara citoplasmática de la membrana interna[32]. El disacárido-pentapéptido es de alguna manera translocado hacia la cara externa de la membrana, donde es transglicosilado y se produce su posterior entrecruzamiento. La etapa de transglicosilación libera undecaprenol-pirofosfato, el cual es reciclado a través de una defosforilación para generar undecaprenol-fosfato (figura 11).

Hasta el momento no ha sido identificada ninguna proteína que participe en el proceso de translocación del disacárido-pentapéptido-P-P-undecaprenol a través de la membrana plasmática. Sin embargo, dada la evidente analogía que existe entre este proceso y la translocación de subunidades de antígeno O, es lógico sugerir que deberá existir una proteína que asista la translocación del precursor del peptidoglicano. La identificación de esta proteína y su caracterización podrían permitir el diseño y desarrollo de nuevos antibióticos.

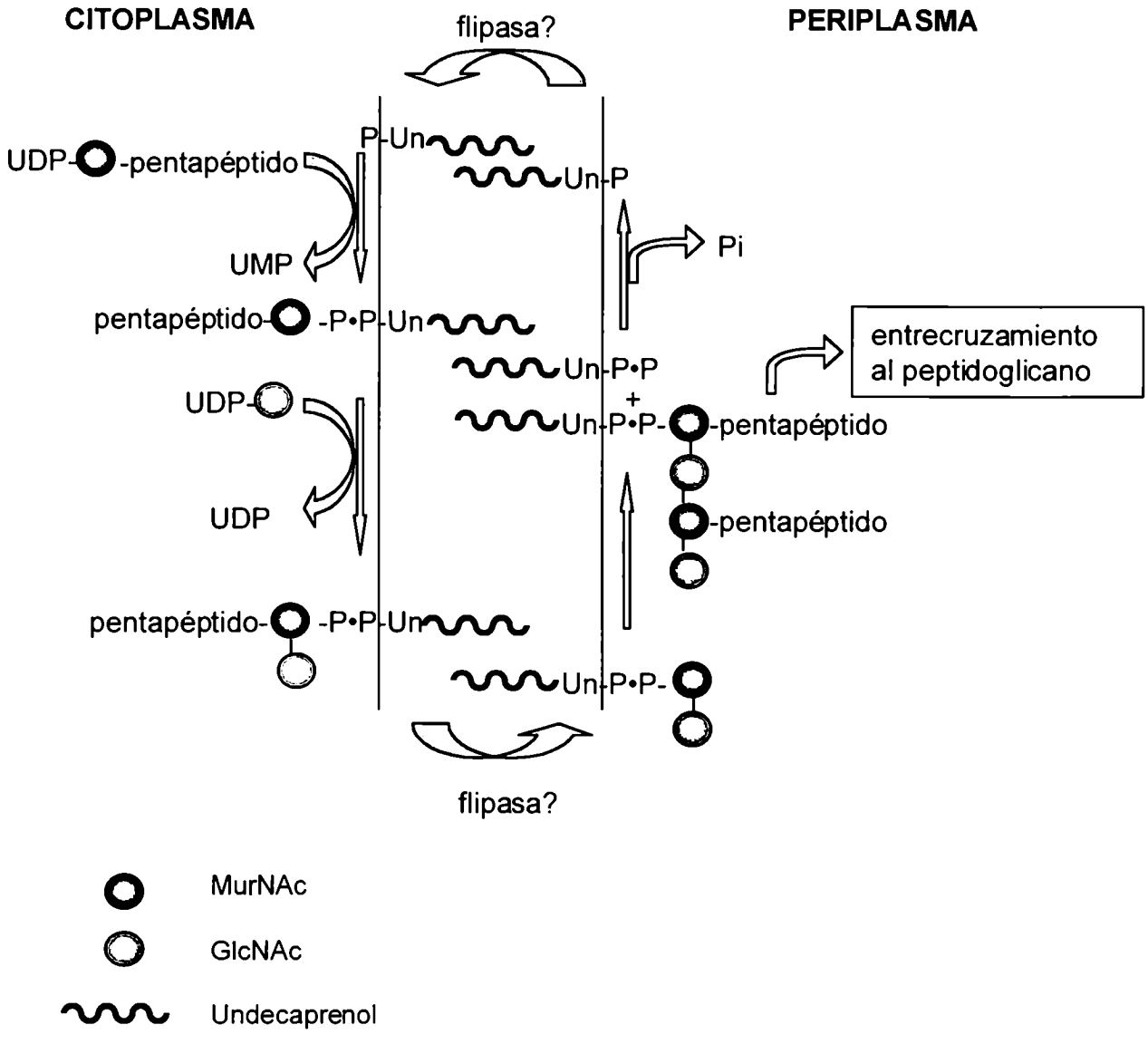


Figura 11

Biosíntesis de peptidoglicano. Las primeras etapas se realizan en el citoplasma y las últimas sobre la cara periplasmática de la membrana interna. La existencia de la flipasa no está demostrada.

1.8 Translocasas que translocan Dol-P-azúcares a través de la membrana del Retículo Endoplásmico

La *N*-glicosilación de proteínas en eucariotas puede ser dividida en dos procesos diferentes: el ensamblado del Dol-P-P-oligosacárido ($Glc_3Man_9GlcNAc_2$) en la membrana del retículo endoplásmico (RE) y la transferencia del oligosacárido desde el Dol-P-P a residuos de asparagina de cadenas polipeptídicas. Se ha determinado que la primera parte del primer proceso en el lado citoplasmático de la membrana del RE, mientras que la adición de cuatro residuos de Man y los residuos de Glc tiene lugar en el lumen del RE[33]. El caracter bipartito del camino propuesto requiere varias etapas de translocación de Dol-P-P-monosacárido y oligosacárido-P-P-Dol[34]. El intermediario $Man_5GlcNAc_2$-P-P-Dol y los dadores de azúcares para las reacciones de ensamblado posteriores, Dol-P-Man y Dol-P-Glc, se sintetizan en el lado citoplasmático y tienen que translocarse al lumen del RE[33]. En base a experimentos con liposomas, se ha sugerido que la translocación del Dol-P-Man se produce en forma simultánea a su síntesis a partir de GDP-manosa y Dol-P, resultando el Dol-P-Man orientado hacia el espacio lumenal[35]. Sin embargo, esta translocación no fue observada en experimentos *in vivo*[36].

Utilizando un análogo de Dol-P-Man soluble en medio acuoso, citronelol-P-Man y extractos de células eucariotas, se ha determinado la existencia de una translocación asistida por proteínas[37]. El proceso poseería gran especifidad, ya que el citronelol-P-Glc no resultó ser un inhibidor competitivo del transporte transmembrana del citronelol-P-Man. Además se ha demostrado que el movimiento transmembrana no asistido de prenol-pirofosfato-azúcares en liposomas es extremadamente lento[38,39], lo que sugeriría que *in vivo* estaría asistido por proteínas. Sin embargo, hasta el momento, no se han aislado mutantes deficientes en alguno de los genes relacionados con las etapas de translocación, probablemente debido a que una mutación en estos genes resultaría en un fenotipo letal en levaduras, debido a que la *N*-glicosilación se encontraría inhibida[40]. También la

translocasa de Dol-P-Man podría ser una enzima esencial, debido al requerimiento de Dol-P-Man para la O-glicosilación de proteínas y la síntesis de glicosil fosfatidil inositol en el lumen del RE[41]. La falta de la translocasa para Dol-P-Glc debería resultar en un fenotipo similar a una mutante en los genes de la Dol-P-Glc sintetasa (*alg5*) o la glucosiltransferasa (*alg6*) responsable de la transferencia de la primera Glc de Dol-P-Glc a $Man_9GlcNAc_2$-P-P-Dol y podría por lo tanto no afectar ostensiblemente la viabilidad celular. Sin embargo, los "screenings" intensivos tendientes a aislar estas mutantes han sido infructuosos[42]. Basándose en esta evidencia negativa, se ha especulado que la translocasa de Dol-P-Man podría también translocar Dol-P-Glc y viceversa. Esta redundancia no permitiría la detección sencilla de una mutante en alguno de esos transportadores. Alternativamente, el Dol-P-Glc podría ser translocado por alguna de las transferasas que lo utilizan como dador de Glc, como Alg6p, Alg8p o Alg10p, ocurriendo la translocación simultáneamente con la transferencia de la Glc al oligosacárido-P-P-dolicol. La estructura propuesta para estas transferasas, consistente en múltiples dominios transmembrana, es compatible con ese modelo, el cual podría aplicarse también para las manosiltransferasas que utilizan Dol-P-Man como dador de manosas.

2.-OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo de Tesis son:

√ Iniciar estudios mecanísticos acerca de la translocación de glicolípidos a través de membranas biológicas, utilizando el antígeno O de *E. coli* como modelo.

√ Establecer las bases estructurales requeridas para que una subunidad de antígeno O sea translocada al espacio periplásmico.

√ Analizar si los procesos de translocación funcionan de la misma manera para el antígeno O y para exopolisacáridos, en base a la capacidad de las putativas translocasas de exopolisacáridos de reemplazar funcionalmente a las translocasas de antígeno O.

√ Analizar los componentes de la maquinaria de translocación de undecaprenol-P-P-azúcares a través de la membrana de *E. coli*.

√ Determinar el sitio de unión del antígeno O al lípido A-core de *E. coli* K12/O16.

3.-MATERIALES Y METODOS

3.1 Células y medios de cultivo

Para los procesos de clonado se utilizó la cepa *E. coli* DH5α (Life Technologies). La mutante en el gen *glf* se construyó sobre una cepa resistente a ácido nalidíxico (Nx) derivada de *E. coli* K12 W3110 [*rph-1 IN(rrnD-rrnE)1*]. Para otros experimentos se utilizaron las cepas CLM4[43], que es una derivada *recA* de la cepa SØ874[44] a la que se le delecionaron los genes requeridos para la síntesis de ácido colánico y LPS O16. La cepa CLM20 también deriva de SØ874 y su construcción se detalla más adelante.

Las células fueron generalmente crecidas a 37 °C en medio LB líquido o placas de LB agar 1.5%. La composicion del medio LB es NaCl 1%, triptona 1% y extracto de levadura 0.5%. Las concentraciones finales de antibióticos utilizadas fueron a concentraciones finales 100 μg/ml para ampicilina (Amp), 20 μg/ml para tetraciclina (Tet), 40 μg/ml para kanamicina (Km), 80 μg/ml para spectinomicina (Sp), 15 μg/ml para cloramfenicol (Cm) y 50 μg/ml para Nx. A menos que se especifique, todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de Sigma.

3.2 Procedimientos con DNA

Las enzimas de restricción y otras enzimas modificadoras utilizadas fueron generalmente compradas a New England BioLabs. La enzima T4 DNA ligasa se obtuvo de GIBCO BRL. En todos los casos se utilizaron de acuerdo a las condiciones recomendadas por los fabricantes. Las transformaciones de bacterias se realizaron por electroporación con un electroporador Gene Pulser (Bio-Rad). Las preparaciones de DNA cromosomal se hicieron utilzando el método descripto por Owen y Borman[45]. Los plásmidos se purificaron como se ha descripto previamente[46]. Cuando fue necesario los fragmentos de DNA se purificaron de geles de agarosa utilizando el kit Gen Clean II (Bio101). Los plásmidos utilizados en este trabajo se listan en la tabla I.

Tabla I **Características de los Plásmidos utilizados en este estudio**

Plásmido	Propiedades relevantes	Origen o referencia
pCM206	amplicon de 9Kb conteniendo *ΔwecA-C* de la cepa CLM20, clonado en pMAV3	este estudio
pEXT21	Vector de expresión de bajo número de copias, con resistencia a Spy replicon pSa	57
pGP704	Vector de clonado, plásmido suicida	47
pJHCV32	Cósmido conteniendo el operón de genes para la biosíntesis de antígeno O7	51
pJHCV32::Tn3 HoHoI-128	pJHCV32, wzx::Tn3HoHoI-128	21
pMAV3	Vector de clonado	54
pMAV11	*wecA*$^+$ clonado en pACYC184	53
pMF1	Amplicón de 1.9 Kb conteniendo el gen *glf* y sus regiones flanqueantes en pGEM3	este estudio
pMF2	pMF1, *glf::cat*, inserción del gen *cat* en el sitio *StyI* de *glf*.	este estudio
pMF9	*glf::cat* y sus secuencias flanqueantes clonados en pGP704	este estudio
pMF10	pMF9 conteniendo el casette SacB-SacR-nptI en el sitio BglII	este estudio
pMF19	Amplicón de 900bp conteniendo el gen *wbbL* (ramnosiltranferasa) en pEXT21	este estudio
pMF20	Amplicón de 1.25 Kb conteniendo el gen *wzx* de *E. coli* K12/O16 clonado en pEXT21	este estudio
pMF21	Amplicón de 1.5 Kb conteniendo el gen *wzx* de *E. coli* O7 clonado en pEXT21	este estudio
pMF24	Amplicón de 1.2 Kb conteniendo el gen *wzx* de *S. enterica* LT2 clonado en pEXT21	este estudio
pMF26	Amplicón de 1.5 Kb conteniendo el gen *wzx*C de *E. coli* K12 para la síntesis de ácido colánico clonado en pEXT21	este estudio
pMF28	Amplicón de 1.2 Kb conteniendo el gen *exoT* de *R. meliloti* clonado en pEXT21	este estudio

3.3 Reacciones de PCR

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en un ciclador MJ Research. Los oligonucleótidos se sintetizaron en GIBCO BRL. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la tabla II. Se utilizó DNA *genómico o* plásmidos conteniendo los genes de interés como templados. El templado fue calentado a 95 °C por 5 min en un volumen final de 45 µl conteniendo 200 µM de cada uno de los desoxinucleótidos (dNTPs), Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2.5 mM y 5 µg de cada oligonucleótido. Luego de los 5 min se agregaron 2.5 unidades de *Taq* polimerasa (GIBCO-BRL) y se realizaron de 25 a 30 ciclos. En los casos en los que se requirió el producto de amplificación para su expresión, se utilizó la enzima *Pwo* polimerasa (Roche Diagnostics) que posee una tasa de mutaciónes menor a la de la *Taq* polimerasa.

En algunos casos se utilizó la técnica de "PCR sobre colonia", realizando la reacción de PCR utilizando como templado el DNA extraído sencillamente de una colonia entera. Para estos casos, una colonia se resuspendió en 40 µl de agua, se calentó a 100 °C durante 5 min y luego se centrifugó a 10.000 rpm por 2 min. Se utilizaron 5 ul del sobrenadante como templado para la PCR.

3.4 Construcción y caracterización de la cepa de *E. coli* CLM20

La cepa 21566[48] posee un transposón Tn10 insertado en el gen *wecD*. Esta inserción se transdujo en la cepa SØ874 usando el bacteriofago P1[49]. Se seleccionaron colonias resistentes a Tet y se seleccionó por PCR un clon (CLM5), que poseía la inserción Tn10 en la orientación deseada (figura 12). Se aislaron derivados de CLM5 que no poseían el Tn10 por el método descripto por Maloy y Nunn[50]. Se seleccionaron colonias Tet^s y se analizaron según su capacidad de expresar el LPS O7 cuando son transformadas con el plásmido pJHCV32[51]. Dado que el gen *wecA* es necesario para la expresión del LPS O7

y el gen *wecD* no es requerido[52,53],la falta de producción de LPS 07 indica una deleción que elimina la actividad del gen *wecA* que está ubicado río arriba del gen *wecD* (figura10).

TABLA II

PRIMERS UTILIZADOS

Primer	Secuencia	Blanco	Sitio
#15	CATGACGAGCTTCGGACTGA	*rmlA*	
# 62	TCGATGCAATGGAAT	*rho*	
#39	GATCACTTCGCAGAAT	*cat*	
#40	AATTACGCCCCGCCCT	*cat*	
#85	CTGGTTGCTGGAATTAT	*glf*	
#88	CGCATACGGCTGGATAA	*glf*	
#98	TCAACGGTAGCGTCATTTA	*wzy*	
#99	TGCTCGCGGCCCTGGAATG	*wbbL*	
#100	GAACATTGAAATGGTAT	*wbbL*	
#101	ATGAGCTCATGAATAACAAACTAGCCAG	wzx_{EcO7}	*Sac*I
#102	TAGGATCCCAGGTAAGGCATGAATTC	wzx_{EcO7}	*Bam*HI
#103	ATGGATCCTGCATGAATACGAATAAATTAC	wzx_{EcO16}	*Bam*HI
#104	TAAAGCTTAATCCTCAGCAAACCAG	wzx_{EcO16}	*Hin*dIII
#105	TAGAATTCTGCATAATGAAAGTTCAATTG	wzx_{SeLT2}	*Eco*RI
#106	ATGTCGACGCATATGATTATCCCTTATTTG	wzx_{SeLT2}	*Sal*I
#107	ATGGATCCATGACCCCAACCGTTAACG	*exoT*	*Eco*RI
#108	TAAAGCTTCTCTTTCTTCCGCAGTCG	*exoT*	*Hin*dIII
#109	ATGGATCCGATATGAGCTTACGTGA	*wzxC*	*Eco*RI
#110	TAAAGCTTAACAGCAACTCACCCCG	*wzxC*	*Hin*dIII

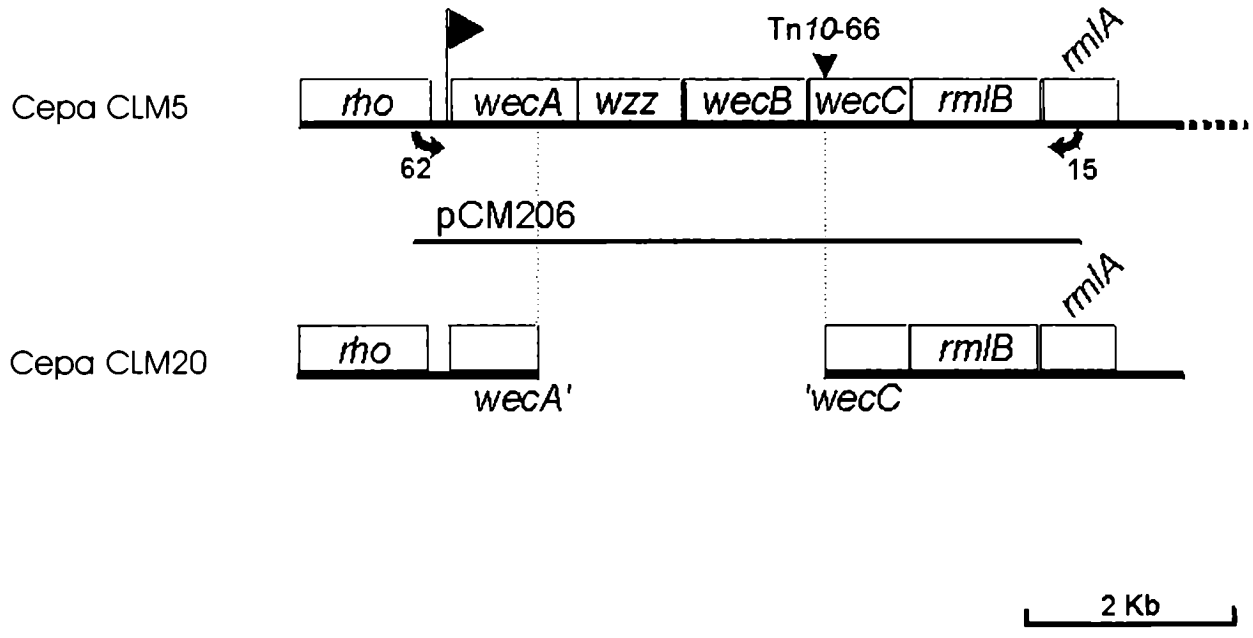


Figura 12

Construcción de la cepa CLM20. Mapa genético parcial del operón *wec* (síntesis del ECA) en las cepas CLM5 y CLM20 de *E. coli* K-12. La región sombreada representa la región eliminada en CLM20. CLM5 posee una inserción Tn*10* en la región próxima al extremo 5' del gen *wec*C. La ubicación de los primers #15 y #62 utilizados para la amplificación del fragmento clonado en el plásmido pCM206 se indica con flechas.

Una de esas colonias, denominada CLM20 se examinó además por PCR utilizando los primers #15 y #62. Se obtuvo un fragmento de 9 Kb. que se clonó en el sitio *Sma*I del vector pMAV3[54], generando el plásmido pCM206. El tamaño exacto de la deleción fue verificado por secuenciación.

3.5 Obtención de una mutante en el gen *glf* de *E. coli* K12 W3110 (cepa MFF1)

La estrategia utilizada se representa esquemáticamente en la figura 13. Se amplificó por PCR un fragmento de 1.9 Kb que abarca el gen *glf* y sus regiones flanqueantes. Se utilizaron para ello los primers #85 y #88 sobre el plásmido pZY1018[58] como templado (figura 14). El producto de amplificación se fosforiló para permitir su ligación en el sitio *Hin*cII del vector pGEM3 y obtener el plásmido pMF1. Este plásmido fue utilizado como punto de partida para generar la mutación en el gen *glf* por la inserción de un casette de resistencia a Cm. Este casette contiene el gen *cat* (Cm acetil transferasa) con su propio promotor, pero carece de señales de terminación de la transcripción a fin de no afectar la expresión de los genes ubicados río abajo en el operón. El gen *cat* se amplificó por PCR utilizando el plásmido pMAV3 como templado y los primers #39 y #40. El producto de PCR se fosforiló y se insertó en el sitio *Sty*I ubicado en la región codificante del gen *glf* en pMF1. Luego de la transformación, se analizaron por PCR las colonias resistentes a Amp y Cm para seleccionar un clon (pMF2) con el gen *cat* insertado en la orientación deseada. El plásmido pMF2 se trató con *Sma*I y *Sph*I, liberándose un fragmento de 2.5 Kb conteniendo el gen *glf* interrumpido por el gen *cat*. Este fragmento fue ligado en los sitios *Sph*I y *EcoR*V del plásmido suicida pGP704. Este vector posee un gen de resistencia a Amp (Amp^r) y el replicón R6K dependiente de la proteína Pir. Esto significa que este plásmido y todos sus derivados no pueden replicarse a menos que sean complementados con la proteína Pir codificada en *trans*. Por esta razón la mezcla de ligación se introdujo en la cepa BW19610 que posee la proteína Pir codificada por un fago

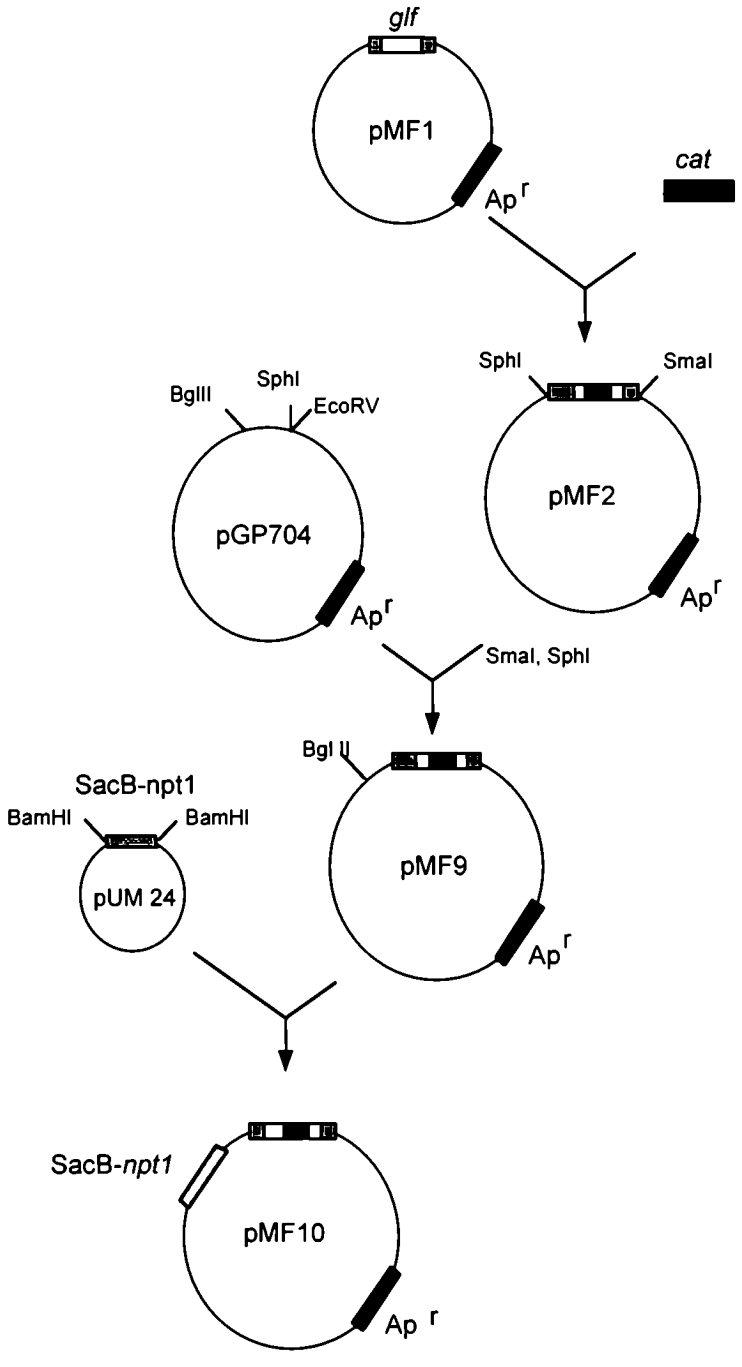


Figura 13

Construcción de la cepa MFF1. Se utilizó el plásmido suicida pGP704, en el cual se clonó el gen *glf* con su región adyacente en en el cromosoma, interrumpido por el gen *cat*. Para facilitar la búsqueda de la doble recombinante se incluyó en la construcción el gen *sacB*, que es letal en presencia de sacarosa 10%.

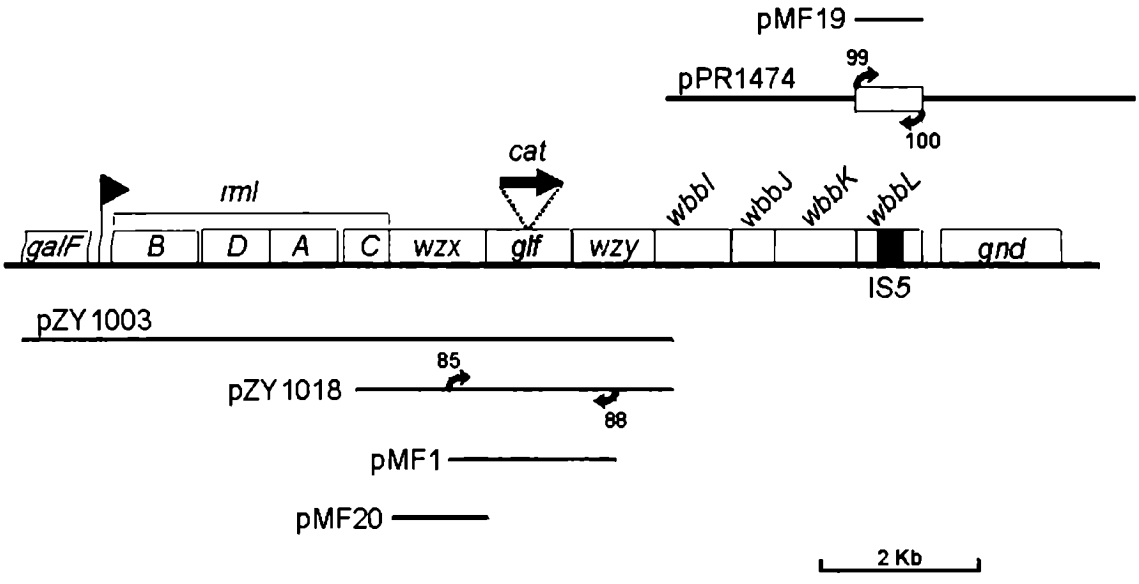


Figura 14

Mapa genético del operón *wb* de *E. coli* K-12/O16. La ubicación y dirección de la transcripción del gen *cat* insertado en el gen *glf* en la cepa MFF1 se señala con la flecha. Se observa la presencia de una inserción IS5 en el gen *wbbL* (sombreado). También se señalan las ubicaciones de los plásmidos pMF1, pMF19, pMF20, pMF21, pPR1474 y pZY1003 y de los primers #85, #88, #99 y #100 (flechas curvas). *RmlABCD*, genes necesarios para la síntesis de TDP-Rha; *wzx*, translocasa; *glf*, UDP-Galp mutasa; *wbbI*, polimerasa de antígeno O; *wbbJ*, galactofuranosil transferasa; *wbbK* o-acetil transferasa; *WbbL*, ramnosil transferasa.

lambda integrado en el cromosoma. El plásmido resultante se denominó pMF9.

Paralelamente se obtuvo a partir de una digestión con *Bam*HI del plásmido pUM24[55] un casette que confiere resistencia a Km y sensibilidad a sacarosa. El casette se compone del gen *nptI* y los genes *sacB* y *sacR* de *B. subtilis*. Por razones no muy conocidas, la expresión del gen *sacB* es letal en bacterias Gram$^-$ en presencia de sacarosa 5% y ha sido utilizado ampliamente para obtener mutantes por doble recombinación. Al gen *sacR* se le ha asignado una función regulatoria[55]. El fragmento de 3 Kb conteniendo el casette *sacB-npt1* se ligó al sitio *BglII* de pMF9. El plásmido obtenido se designó como pMF10.

Se transformaron con el plásmido pMF10 células de la cepa conjugativa BW19851 Sp^r (Pir$^+$)[56]. Posteriormente se mezclaron estas células con otras de la cepa W3110 Nx^r para permitir la conjugación entre ambas. Se seleccionó un clon resistente a sacarosa, Cm y Nx sensible a Amp, Sp y Km. Para obtener células con este fenotipo debieron haber ocurrido dos eventos de recombinación: en el primero el plásmido conteniendo el gen *glf:Cm^r* se integró al cromosoma de W3110 y en un segundo evento el cassette npt1-sacB y el resto del plásmido pGP704 se escindieron de él.

Para comprobar que la inserción del gen *cat* se produjo en el sitio esperado se realizó una PCR sobre colonia ("colony PCR") utilizando el primer #39 en el gen *cat* y el primer #98 en el gen *wzy*, ubicado inmediatamente hacia el 3' del gen *glf*. La cepa mutante en el gen *glf* se designó MFF1.

3.6 Southern-Blot

El correcto remplazamiento alélico en el gen *glf* se confirmó además por Southern-Blot. Para ello se digirió DNA cromosomal de las cepas W3110 y MFF1 con la enzima *Sph*I que no corta dentro de la construcción utilizada para obtener la mutante. El producto de la digestión se resolvió en un gel de agarosa y se transfirió a un filtro de nitrocelulosa[46]. Se utilizó como sonda el

gen *glf* completo amplificado por PCR y marcado con dioxigenina utilizando el kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection de Boeringer-Roche, el que se utilizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

3.7 Construcción del plásmido pMF19

Como ya se ha mencionado la cepa W3110 posee una inserción IS5 en el gen *wbbL* que codifica para la ramnosil transferasa que agrega la Rha en la posición 2 de la subunidad O. Para complementar esta mutación se utilizaron los primers #99 y #100 para amplificar por PCR el gen *wbbL* utilizando el plásmido pPR1474[19] como templado y *Taq* polimerasa. El producto de PCR se ligó al pGEM-T-easy (Promega), obteniéndose el plásmido pMF5. Este plásmido se digirió con *Eco*RI a fin de recobrar el fragmento conteniendo el gen *wbbL*. El fragmento se purificó a partir de un gel de agarosa y ligado en el vector de expresión pEXT21[57] previamente digerido con *Eco*RI y tratado con fosfatasa alcalina. El plásmido resultante se denominó pMF19.

3.8 Clonado y expresión de las diferentes putativas translocasas

En todos los casos se utilizó el vector de bajo número de copias pEXT21. Se eligió este vector debido a que los intentos de utilizar vectores de alto número copias para la expresión de proteínas de membrana frecuentemente han resultado infructuosos[22]. El número de copias por cromosoma del pEXT21 varía entre tres y cuatro[57]. Las regiones codificantes de los diferentes genes *wzx* y sus genes homólogos *exoT y wzxC* fueron clonadas bajo el control del promotor inducible p*lac*.

Para todos los genes se utilizaron primers conteniendo sitios de restricción únicos para facilitar su clonado. Para amplificar el gen *wzx* de la cepa de *E. coli* VW187 O7:K1 (wzx_{EcO7}) se utilizaron los primers #101 y #102. El primer #101 contiene un sitio para la enzima *Sac*I y el primer #102 el sitio *Bam*HI. Se empleó la enzima *Pwo* polimerasa, a una temperatura de hibridización de 52 °C y el plásmido pJHCV32[51] como templado. El producto

de PCR se digirió con *Sac*I y *BamH*I, se purificó y se ligó al plásmido pEXT21 previamente digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante que expresa el gen wzx_{EcO7} se denominó pMF21.

Se utilizó la misma estrategia para el clonado del gen *wxz* de *E. coli* W3110 O16:K12 (wzx_{EcO16}) y los demás genes *wzx* utilizados en esta Tesis. Para obtener wzx_{EcO16} se emplearon los primers #103 y #104 conteniendo los sitios *Bam*HI y *Hind*III respectivamente y el plásmido pZ1001[58] como templado. El plásmido obtenido que expresa el gen wzx_{EcO16} se denominó pMF25.

Para amplificar *wzx* de *S. enterica* serovar typhimurium de la cepa LT2 (wzx_{SeLT2}) se utilizaron los primers #105 y #106 conteniendo los sitios correspondientes a *EcoR*I y *Sal*I. Como templado se utilizó DNA cromosomal de la cepa SA4022. El plásmido obtenido que expresa el gen wzx_{SeLT2} se denominó pMF24.

Para el clonado del gen *exoT* de *R. meliloti* se realizó una PCR sobre DNA cromosomal de la cepa B399. Se utilizaron los primers #107 y #108 conteniendo los sitios *Bam*HI y *Hind*III. Para esta reacción de PCR debió elevarse la temperatura de hibridización a 60 °C. El fragmento amplificado por PCR se clonó en los sitios mencionados del vector pEXT21 generando el plásmido pMF28. Para el clonado de *wzxC* de *E. coli* K12 se utilizaron DNA cromosomal de la cepa W3110 como templado y los primers #109 y #110 conteniendo los sitios para *Bam*HI y *Hind*III respectivamente. El plásmido obtenido que expresa el gen *wzxC* se denominó pMF26.

3.9 Purificación de LPS (minipreparaciones)

Para realizar las minipreparaciones de LPS se partió de células de *E. coli* crecidas en LB. En los casos donde correspondía se agregó al medio isopropil beta tio-galactósido (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM para inducir la expresión de genes bajo acción del promotor *lac*. Las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en PBS ajustando la OD_{600} a

2. Porciones de 1.5 ml de la suspensión se centrifugaron, se resuspendieron en 150 µl de buffer de lisis (2% SDS, 4 % 2-mercapto etanol, 10 % glicerol, 1 M Tris-HCl pH 6.8) y se hirvieron durante 10 min. Se agregó a las preparaciones 2 µl de proteinasa K (GIBCO-BRL), se agitó y se incubó a 60 °C por 60 min. Posteriormente se agregó 150 µl de una solución de fenol 95%, incubándose *por* 15 min a 70 °C, invirtiendo los tubos cada 5 min. Las preparaciones de dejaron en hielo por 10 min y se centrifugaron a 14000 rpm por otros 10 min. La fase acuosa se transfirió a otro tubo, al que se le agregaron 2 volúmenes y medio de etanol para precipitar el LPS. Se centrifugó por 20 min., se descartó el sobrenadante y el LPS se resupendió en 50 µl de agua.

3.10 Purificación de LPS (maxipreparaciones)

Las preparaciones a gran escala se realizaron mediante el método del fenol caliente[59], partiendo de 1 a 20 lt. de cultivo, según el caso. Las células se colectaron por centrifugación y se lavaron con buffer PBS (50 mM fosfato de sodio, 150 mM NaCl. pH 7.4). Posteriormente se resuspendieron en solución PCP (fenol-cloroformo-éter de petroleo 1:2.5:4), utilizando 50 ml por cada 2 g de células. Las preparaciones se homogenizaron en un homogeneizador (Potter) y se centrifugaron a 7000 rpm a 4 °C. Los sobrenadantes se calentaron a 50 °C hasta la evaporación total del cloroformo y el éter. El LPS se precipitó con un volumen de agua destilada y se centrifugó nuevamente, obteniéndose tres fases, el agua en la fase superior, el LPS en la fase intermedia y el fenol en la fase inferior. El fenol se removió y se repitió la adición de agua para completar la precipitación del LPS. Las dos fases de LPS se combinaron y se repitió la centrifugación. Al sedimento de LPS se le agregaron 20 ml de metanol. Se centrifugó nuevamente por 15 min a 10000 rpm y posteriormente se aspiró el metanol. Se secó al vacío el LPS obtenido y se resuspendió en 10 ml de agua destilada conteniendo Mg_2Cl 0.1 mM. Se centrifugó a 100.000 x *g* a 15 °C por espacio de 16 h. El precipitado obtenido se resuspendió en 2 ml de agua destilada. La calidad de LPS obtenido se

examinó por electroforesis en geles de poliacrilamida y se cuantificó analizando el contenido de ácido cetodesoxioctanoico (KDO).

3.11 Análisis de LPS

El análisis de LPS se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). Se utilizaron geles a una concentración de poliacrilamida 15 % conteniendo urea a una concentración final 4 M. En algunos casos se visualizó el LPS directamente por tinción argéntica[21].

Cuando se consideró conveniente se transfirió el contenido del gel a una membrana de polivinildendivinilfluoride (PVDF), (Roche Diagnostics), utilizando un dispositivo de electrotransferencia semi-seco SemiporTE77 (Hoefer). Se utilizó el buffer de electroforesis conteniendo metanol 10% y se transfirió durante 30 min. a 80 mA (10 V iniciales).

En algunos experimentos se efectuó un Western-blot revelando con anticuerpos policlonales anti-antígeno O16 y O7. Para estos casos primeramente se bloqueó el filtro con PBS conteniendo leche descremada 5% por espacio de 1 h. Se incubó con una dilución 1/200 del anticuerpo en la misma solución. Posteriormente el filtro se lavó tres veces con PBS leche, y se incubó con proteína A-peroxidasa por 2 h. El filtro se lavó nuevamente 3 veces con agua desionizada y se reveló en presencia de 4-cloro-naftol.

Para otros experimentos se procedió al revelado utilizando la lectina de germen de trigo (WGA). Luego de bloquear la membrana, se incubó en PBS leche conteniendo 7 μg/ml de WGA marcada con dioxigenina (Roche Diagnostics). La presencia de la lectina unida a la membrana se detectó utilizando un anticuerpo anti-dioxigenina conjugado a fosfatasa alcalina, revelándose con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) y cloruro de 4-nitroblue tetrazolio (NBT). Como control positivo de unión de la lectina se utilizó ovoalbúmina.

3.12 Aglutinación por la lectina WGA

Se crecieron bacterias en LB, y cuando se llegó a una OD_{600} de 0.4 , se agregó IPTG 0.5 mM y se continuó incubando a 37 °C por 3 h más. Alícuotas de 1 ml se lavaron una vez con PBS y se ajustó la absorbancia a un valor de 2. Por otra parte, la lectina WGA (Roche) se diluyó también en PBS y 25 µl de las suspensiones bacterianas se mezclaron con 25 µl de diluciones seriadas de la lectina WGA. La aglutinación fue observada luego de 3 min de rotación sobre placas de vidrio.

La especificidad de la lectina por GlcNAc se determinó examinando la aglutinación de las bacterias en presencia de Glc o GlcNAc, utilizando concentraciones de azúcares 0.1, 0.156, 0.312, 0.625 y 1.25 M. A las soluciones de azúcares se les agregó una concentración de WGA de 12.5 µg/m y se examinó la capacidad aglutinante como se ha descripto en el párrafo anterior.

3.13 Cuantificación de LPS

La cuantificación de LPS se realizó mediante la medición de KDO[60]. El LPS se disolvió en 0.1 ml de H_2SO_4 0.02 N y se calentó a 100° C por 20 min. Posteriormente se agregó H_2SO_4 0.02 N hasta completar 0.2 ml. Luego se agregó 0.25 ml de HIO_4 0.04 N en 0.125 N de H_2SO_4. Se dejó 20 min a temperatura ambiente (TA) y se agregó 0.5 ml de $NaAsO_2$ 2.6 % en HCl 0.5 N. Por último se agregaron 2 ml de ácido tiobarbitúrico 0.6 %, se calentó por espacio de 20 min a 100 °C. Luego de enfriar, se midió la absorbancia a 548 nm. La cantidad de KDO se calculó en base a una curva estandar realizada con cantidades conocidas de LPS.

3.14 Reacciones de RT-PCR

Para la preparación de RNA a partir de bacterias, se utilizó Trizol (GIBCO-BRL) de acuerdo a las condiciones estipuladas por el proveedor. La

calidad del RNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa. El RNA obtenido se trató con DNAsa libre de RNAsa (Promega) en presencia del inhibidor de RNAsa Rnasin (Promega). El RNA se trató con fenol y se precipitó con etanol. Para la reacción de transcriptasa reversa (RT) se partió de 5 µg de RNA al que se le agregó 1µl de una solución 10 µM del oligonucleótido en un *volumen* total de 12 µl. La muestra se calentó a 70 °C 10 min y luego se incubó 5 min en hielo. Pasado este tiempo se agregaron 4 µl del buffer provisto por el proveedor de la transcriptasa reversa Superscript II (GIBCO-BRL), 2 µl de 0.1 M DTT y 1 µl de 10 mM de cada uno de los dNTPs. Se incubó 2 min a 42 °C y se agregó 1 µl de Superscript II y se dejó reaccionar por espacio de 50 min a 42 °C. Se utilizaron duplicados sin Superscript como control de la ausencia de DNA plasmídico. La reacción se detuvo calentando a 70° C por 10 min. Se utilizó 1 µl de esta mezcla como templado en las reacciones de PCR.

4.- RESULTADOS

4.1 Obtención y caracterización de una mutante *glf*

Para investigar si la formación de una subunidad completa de antígeno O es un prerrequisito para su translocación a través de la membrana citoplasmática se construyó la cepa MFF1, que posee una mutación en el gen *glf*. Este gen es el responsable de la adición de Gal*f* a la subunidad O16 de *E. coli*. Una mutante *glf* debería sintetizar una subunidad O conteniendo sólo tres azúcares, GlcNAc, Rha y Glc (figuras 4 y 6).

La estrategia utilizada para la construcción de la cepa MFF1 está representada en la figura 13 y se detalla en Materiales y Métodos. Para construir la mutante *glf* ⁻ se insertó un casette de resistencia a Cm interrumpiendo el gen *glf*. Este casette contiene el gen con propio promotor, pero carece de señales de terminación de la transcripción a fin de no afectar la expresión de los genes ubicados río abajo en el operón *wb*. Para determinar que el gen *cat* se había insertado interrumpiendo el gen *glf*, se realizaron dos reacciones de PCR sobre colonias de la cepa MFF1. En la figura 15 se representan las regiones sobre las que se aparean los primers y los resultados esperados. Las bandas obtenidas para la cepa MFF1 (figura 15, calles 1 y 2) coinciden con los tamaños correspondientes a la inserción del casette en el gen *glf*. Este hecho fue confirmado por Southern-Blot. Se digirió DNA de las cepas W3110 y MFF1 con *Sph*I y se utilizó como sonda el gen *glf* amplificado por PCR y marcado con dioxigenina. Se obtuvieron los fragmentos esperados de 3840 bp (Figura 16, calle 1) y 4600 bp respectivamente (figura 16, calle 2). De estos experimentos se concluyó que la cepa MFF1 posee el gen *cat* insertado en el gen *glf*.

Las cepas de *E. coli* K12 del linaje W3110 no producen antígeno O debido a que poseen una inserción del tipo IS*5* interrumpiendo el gen *wbbL*, último gen del operón (figuras 7 y 14)[19,61]. Este gen codifica para la ramnosiltransferasa involucrada en la transferencia de Rha en la segunda

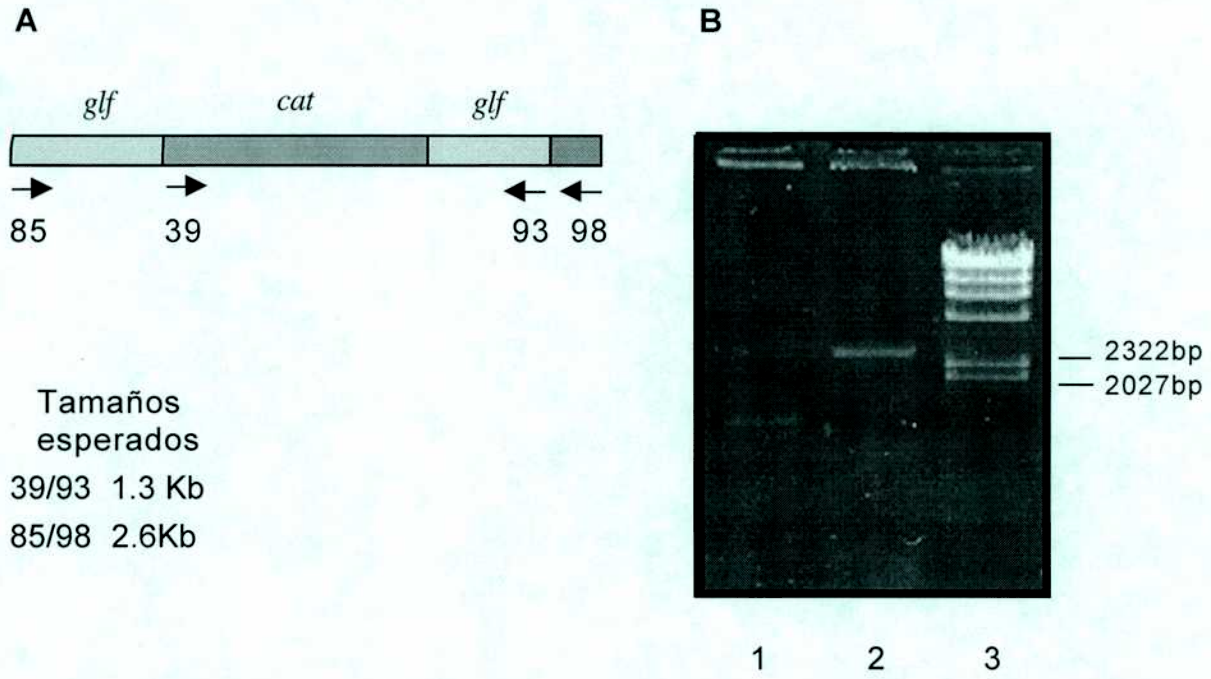
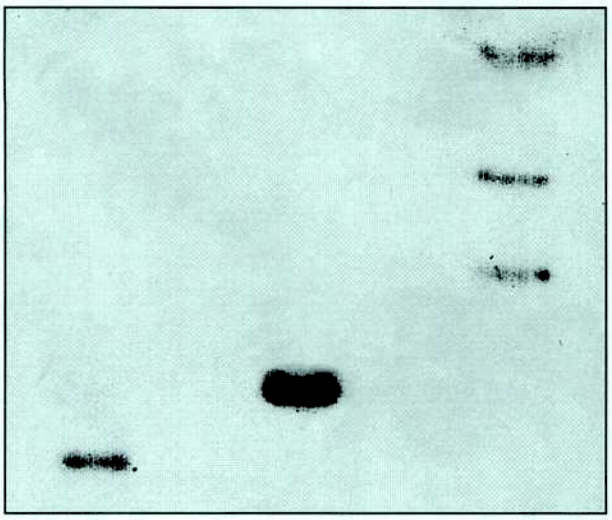


Figura 15

Análisis por PCR de la mutante *glf* (cepa MFF1). Panel A: Esquema que muestra la región del cromosoma a la que se aparean los primers y los resultados esperados para una mutante conteniendo el gen *cat* insertado en en gen *glf* en la orientación deseada. Panel B: Electroforesis en un gel de agarosa mostrando los resultados obtenidos en la PCR. Calle 1, con primers #39 y #93; calle 2, con primers #85 y #98; calle 3, marcador de peso molecular λ*Hin*dIII.



1 2 3

Figura 16

Verificación de la mutagénesis del gen *glf* por Southern Blot en la cepa MFF1. Se digirió DNA de las cepas W3110 y MFF1 con *Sph*I que no corta en el gen *glf* ni en el casette Cm^r. Los tamaños esperados son 3.84 Kb para W3110 (calle 1) y 4.6 Kb para MFF1 (calle 2). La calle 3 corresponde al marcador de peso molecular λ*Hin*dIII .

posición del esqueleto O16 (figuras 4 y 6). La introducción del gen *wbbL* en *trans* es capaz de restablecer la capacidad de sintetizar antígeno O[19]. Por lo tanto se construyó el plásmido pMF19 que contiene el gen *wbbL* en el vector pEXT21 (tabla I y figura 4) para poder analizar el efecto de la mutación del gen *glf*.

La capacidad de sintetizar antígeno O puede examinarse rápidamente mediante el uso de bacteriófagos. Se ha descripto que algunos bacteriófagos como el U3, BR2 y C21 no pueden infectar células que sintetizan antígeno O. La tabla III resume los resultados obtenidos para las cepas W3110 y MFF1 transformadas con el plásmido pMF19. Sólo el fago C21 es capaz de distinguir entre ambas cepas, produciendo solamente la lisis de la cepa mutante MFF1(pMF19) y no la de su cepa isogénica W3110(pMF19), capaz de sintetizar antígeno O. Además la cepa MFF1(pMF19) se hace resistente al fago C21 si se transforma con un plásmido que expresa sólo el gen *glf*.

Cepa	Fago U3	Fago BR2	Fago C21
W3110	S	S	S
W3110 pMF19	R	R	R
MFF1	S	S	S
MFF1 pMF19	R	R	S

Tabla III

Comparación del comportamiento de las cepas W3110 y MFF1 sin transformar y transformadas con el plásmido pMF19 frente a los fagos BR2, U3 y C21. R= resistente; S= sensible.

De estos experimentos se concluyó que la disrupción del gen *glf*

provocada por el casette de resistencia a Cm afecta de alguna manera la síntesis de antígeno O y que la sensibilidad al bacteriofago C21 observada en la cepa MFF1(pMF19) se debe a la falta de producción de Galf y no a un efecto polar de la mutación provocada por el casette de resistencia a cloramfenicol. La resistencia de la cepa MFF1 transformada con el plásmido pMF19 a los fagos U3 y BR2 indica que esta cepa difiere de su cepa isogénica W3110(pM19), conteniendo antígeno O completo o parcialmente sintetizado en su superficie.

4.2 Una subunidad O16 formada por tres azúcares se puede translocar y unir al core

El análisis del efecto de la disrupción del gen *glf* se evaluó por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). En ausencia del plásmido pMF19, tanto la cepa W3110 como su mutante isogénica *glf::cat* , MFF1, produjeron un LPS en el que sólo se detectó el lípido A-core (figura 17A, calles 1 y 3). Mediante análisis por Western-Blot con antisuero anti-O16 no se observaron bandas reactivas en ambos casos (figura 17B, calles 1 y 3). La cepa W3110 transformada con el plásmido pMF19 produjo polisacárido-O, que se observó en geles de poliacrilamida y posterior tinción con plata (figura 17A calle 2), y por Western-Blot (figura 17B, calle2), observándose el típico bandeo escalonado. En constraste, la cepa MFF1 transformada con el pMF19 mostró una única banda que migró por encima de la correspondiente al lípido A-core (figura 17A, calle 4) y que también resultó reactiva con anticuerpos anti-O16 (figura 17B, calle 4).

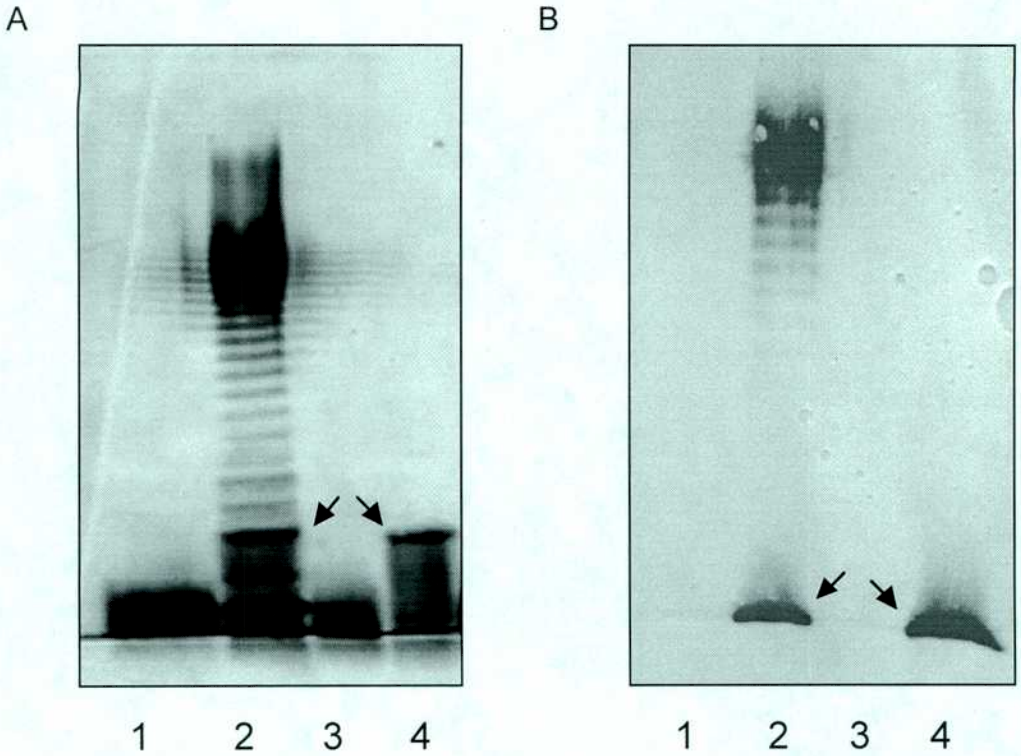


Figura 17

Análisis del LPS producido por la cepa MFF1 por SDS-PAGE. **Panel A**, tinción argéntica. Calle 1, W3110; calle 2, W3110(pMF19); calle 3, MFF1; calle 4, MFF1(pMF19). **Panel B**, Western Blot de un gel similar al mostrado en A revelado con antisuero policlonal anti-O16. Las flechas indican la posición de las bandas de lípido A-core con una subunidad O completa (calle 2) y una subunidad incompleta (calle 4).

La síntesis del core y del lípido A se realiza en forma independiente a la del antígeno y la unión de éste al core-lípido A se produce en la cara externa de la membrana plasmática. El resultado obtenido en este experimento es el esperado si es posible que una subunidad que carece de Gal*f* pueda translocarse a través de la membrana interna y ligarse al lípido A-core.

4.3 Análisis estructural del LPS de las cepas MFF1 y MFF1(pMF19)

Para confirmar los resultados de obtenidos en el punto procedente se decidió caracterizar el LPS de las cepas MFF1 y MFF1(pMF19) por métodos fisicoquímicos. La estructura actualmente aceptada para el core de *E. coli* K12 en W3100[62] sirvió como punto de partida para la interpretación de los resultados obtenidos.

Se purificó el LPS de las cepas MFF1 y MFF1(pMF19) según el método de Galanos[63] y se realizó un análisis de la composición de los mismos. La cepa MFF1 mostró la presencia de Glc, Gal, GlcNAc y L-*glicero*-D-*mano*-heptosa (LD-Hep). El LPS de MFF1(pMF19) también estaba compuesto de Glc, Gal, GlcNAc y LD-Hep y contenía además Rha.

Posteriormente se sometió el LPS a metilación exhaustiva y posterior hidrólisis. El análisis de los productos obtenidos en el caso del LPS de la cepa MFF1 la presencia de un residuos de Gal terminal, LD-Hep y GlcNAc; diferentes residuos de Glc sustituidos en los carbonos 2, 6, y 3 y 6; y un residuo de L-D-Hep sustituido en la posición 7. Los residuos de LD-Hep no se detectaron en este análisis debido a que se encuentran fosforilados[64].

Se realizaron experimentos por bombardeo rápido de átomos-espectrometría de masa (FAB-MS) del LPS metilado de la cepa MFF1. El espectro obtenido mostró un pico primario tipo A correspondiente a un ión glicosil oxonio a *m/z* 260 confirmando la presencia de un residuo de GlcNAc terminal.

El análisis de los tipos de unión detectados en el LPS de la cepa

MFF1(pMF19) arrojó el mismo resultado que el obtenido para la cepa MFF1, con la excepción de que el único residuo de GlcNAc fue detectado como un derivado 3,6 disustituido. Además, se detectaron dos residuos adicionales no presentes en el LPS de la cepa MFF1: un residuo de Glc terminal y una Rha sustituida en el carbono 3. Los derivados de GlcNAc, Rha y Glc identificados se corresponden con los de la estructura del antígeno O16 correspondiente a esta cepa.

El espectro de masa del LPS de la cepa MFF1(pMF19) mostró un fuerte ión primario de tipo A a *m/z* 842 y su correspondiente ión secundario, proveniente de la β-eliminación de Glc-Rha (m/z 410) desde la posición O-3 de la GlcNAc, a *m/z* 432 (*m/z* 842 - 810). Estos datos se corresponden con la siguiente estructura: Glc-(1→3)-Rha-(1→3)[Glc-1→6]-GlcNAc$^+$. Se obtuvieron además dos picos correspondientes a iones mayor masa. Uno de ellos, a m/z 1090 corresponde a la siguiente estructura: Glc-(1→3)-Rha-(1→3)[Glc-(1→6)]-GlcNAc-(1→7)-LD-Hep$^+$. El otro pico obtenido, a *m/z* 1294, corresponde a la estructura: Glc-(1→3)-Rha-(1→3)[Glc-(1→6)]-GlcNAc-(1→7)-LD-Hep-(1→6)]-Glc$^+$).

Mediante estos experimentos pudo determinarse que la cepa MFF1 transformada con pMF19 posee una subunidad O incompleta unida al core que carece de Gal*f*, lo que confirma lo mencionado previamente en cuanto a que una subunidad que no posee Gal*f* puede translocarse y unirse al core. La subunidad incompleta posee una Glc terminal unida a la GlcNAc, la cual está ausente en la cepa MFF1 (figura 19). Este resultado sugiere que para que ocurra la glicosilación se requiere la presencia previa de Rha unida a la GlcNAc. La cepa MFF1 posee un residuo de GlcNAc terminal. Dado que este azúcar es un componente de la subunidad repetitiva O16, se sugiere que la presencia de este monosacárido podría corresponder a la translocación de undecaprenol-P-P-GlcNAc y su posterior ligación al core por la ligasa (WaaL), siendo la Hep el sitio de unión entre el antígeno O y el core de *E. coli* K12.

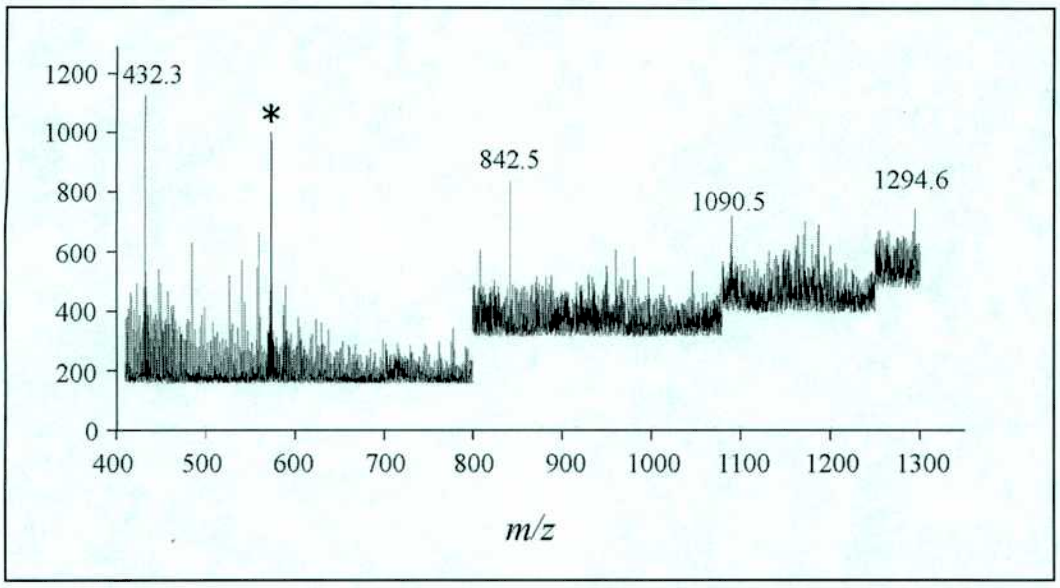


Figura 18

Espectro de masa (FAB-MS) mostrando las regiones entre *m/z* 400 y 1300 del LPS metilado de la cepa MFF1(pMF19). Se indican los iones primarios glicosil oxonio tipo A (*m/z* 842, 1090 y 1294) y un ión secundario (*m/z* 432) producido por β-eliminación de la estructura a *m/z* 842. *, pico no asignado. Las estructuras representadas a cada pico se indican en el texto.

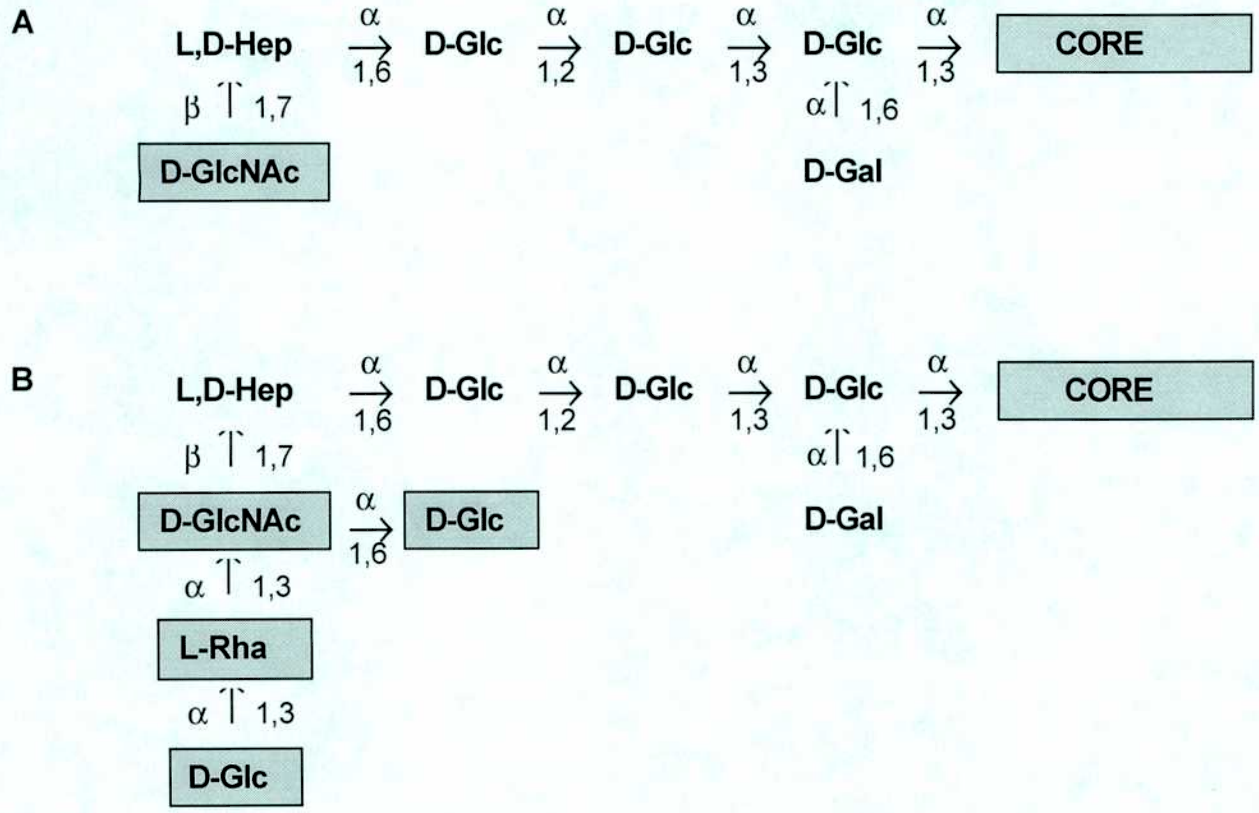


Figura 19

Estructuras químicas del core externo de las cepas MFF1 (A) y MFF1 transformada con el plásmido pMF19 (B). En gris se observan los componentes de las subunidades incompletas unidas al core para cada caso.

4.4 Undecaprenol-P-P-GlcNAc puede translocarse y unirse al core

El hecho de que una subunidad incompleta O16 formada sólo por tres residuos pueda translocarse a través de la membrana interna y ligarse al core, plantea el interrogante de cuál es la mínima unidad requerida para este proceso. La presencia de una GlcNAc terminal en la estructura del LPS de la cepa MFF1 sugiere que es posible la translocación de subunidades conteniendo tan sólo un azúcar. Si la GlcNAc observada es parte en realidad de la subunidad O, debió transferirse a partir de undecaprenol-P-P-GlcNAc y para ello debió requerirse la actividad de la UDP-GlcNAc:undecaprenol-P GlcNAc-1-P transferasa (WecA) y de la putativa translocasa Wzx.

A fin de demostrar que la GlcNAc terminal en MFF1 proviene de la translocación de una subunidad incompleta de antígeno O, se construyó la cepa CLM20 (ver Materiales y Métodos), que posee una deleción que elimina los operones para la biosíntesis de antígeno O y el ácido colánico. Además posee otra deleción que elimina los primeros 4 genes necesarios para la síntesis del ECA. Esta deleción incluye parte del gen *wecA* (figura 12), que es requerido para la síntesis del ECA y también para la iniciación de la de varios antígeno O cuyo primer azúcar es GlcNAc[53,65], entre ellos el de O16 [7, 58]. Por lo tanto la cepa CLM20 puede ser utilizada para reconstruir de manera escalonada la síntesis y ensamblado de la subunidad O16, por la adición secuencial de los componentes individuales codificados en plásmidos específicos.

El plásmido pMAV11[53] contiene el gen *wecA* y el plásmido pMF20 contiene el gen *wzx* de *E. coli* O16 (wzx_{EcO16}) en el vector de bajo número de copias pEXT21 (tabla I). Ambos plásmidos fueron introducidos en forma conjunta o separadamente en la cepa CLM20. Se extrajo el LPS y se analizó por Western blot utilizando la lectina WGA marcada con dioxigenina, que dada su gran especifidad por residuos terminales de GlcNAc[66], permite la detección de este azúcar en el extremo del LPS. En paralelo, se tomaron muestras que

fueron sometidas a electroforesis y tinción argéntica a fin de corroborar que se sembraron cantidades comparables de LPS en cada calle y determinar la existencia de bandas no reactivas con la lectina (figura 20). Como control positivo, en los blots se utilizó ovoalbúmina (figura 20A calle 9). Solamente el LPS de la cepa CLM20 transformada con ambos plásmidos fue capaz de unir la lectina (Figura 20A calle 4). Además la banda de LPS reactiva con la lectina resultó de un tamaño levemente mayor que las bandas de la cepa CLM20 sin transformar (figura 20B calle 4).

En algunos experimentos, una tenue banda reactiva a la lectina pudo ser observada en la cepa CLM20 con o sin plásmidos, pero sólo en los casos donde se agregó una gran cantidad de LPS en los geles. Esto fue confirmado por experimentos adicionales en los que se utilizaron aglutinaciones de suspensiones bacterianas por la lectina WGA. La aglutinación de la cepa CLM20 fue posible con el agregado de WGA a una concentración de 250 µg/ml, mientras que la cantidad de WGA necesaria para aglutinar la cepa CLM20 transformada con los plásmidos pMAV11 y pMF20 se redujo a 3.12 µg/ml (tabla IV). Esta observación sugiere que la presencia de los genes de la transferasa de GlcNAc y la translocasa Wzx son necesarios para la incorporación del residuo de GlcNAc al core. Estos resultados fueron reforzados por el hecho de que la banda reactiva a la lectina WGA desapareció cuando se introdujeron los plásmidos pZY1003, pMAV11 y pMF19 en la cepa CLM20 (figura 20A calle 6). El plásmido pZY1003[58] posee los genes para la síntesis de TDP-Rha y el gen wzx_{EcO16}, mientras que el plásmido pMF19 expresa la ramnosiltransferasa y el plásmido pMAV11 el gen *wecA*. La desaparición de esta banda coincidió con la aparición de una nueva banda de mayor peso molecular que la correspondiente al lípido A-core de la cepa CLM20 que sólo se observó en los geles revelados por plata (figura 20B calle 6). Esta banda correspondería a un producto formado por la transferencia de una subunidad O16 incompleta que contiene sólo dos azúcares, Rha y GlcNAc. Como consecuencia de la unión de la Rha, la GlcNAc ya no

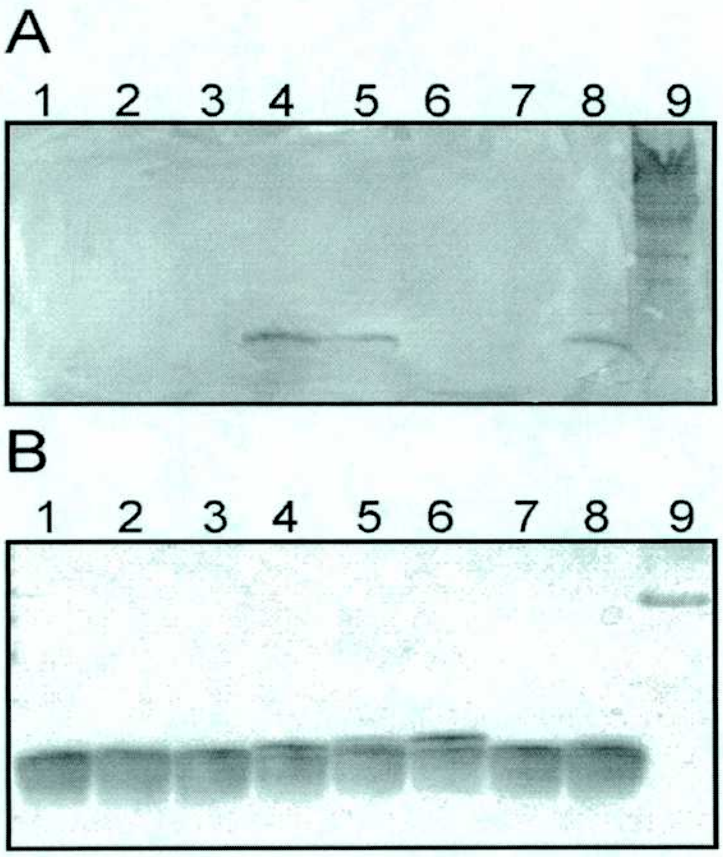


Figura 20

Panel A: Western blot de preparaciones de LPS proveniente de la cepa CLM20 transformada con uno o varios plásmidos recombinantes. La membrana fue incubada con la lectina WGA marcada con dioxigenina y revelada con una anticuerpo monoclonal anti-dioxigenina marcado con peroxidasa. Calle 1, sin plásmido; calle 2, pMAV11 (*wecA*$^+$); calle 3, pMF20 ($wzx_{EcK12/O16}^+$); calle 4, pMAV11 + pMF20; calle 5, pMAV11+pZY1003 (*rml*BDAC +, $wzx_{EcK12/O16}^+$); calle 6, pMAV11 + pZY1003 + pMF19 (*wbbL*$^+$); calle 7, pMF24 (wzx_{SeLT2+}); calle 8, pMAV11 + pMF24; calle 9, ovoalbúmina. **Panel B**: SDS-PAGE con tinción argéntica similar al mostrado en A.

Tabla IV Aglutinación de suspensiones bacterianas por la lectina WGA

Cepa CLM20 transformada con los plásmidos[a]:	WGA (µg/ml)[b]
ninguno	250.00 (1)
pMAV11 (wecA+)	125.00 (2)
pMAV11, pMF20 (*wecA*$^+$; $wzx_{EcK12/O16}{}^+$)	3.12 (80)
pMAV11, pMF21 (*wecA*$^+$; $wzx_{EcO7}{}^+$)	1.56 (160)
pMAV11, pMF24 (*wecA*$^+$; $wzx_{SeLT2}{}^+$)	6.25 (40)
pMAV11, pMF26 (*wecA*$^+$; *exoT*$^+$)	15.62 (16)
pMAV11, pMF26 (*wecA*$^+$; *wzxC*$^+$)	125 (2)

[a] Se crecieron células de la cepa CLM20 como se ha indicado en Materiales y Métodos. Se estandarizaron las muestras ajustando la OD a 600 nm de los cultivos a 2. 25µl de las suspensiones bacterianas se mezclaron con 25µl de una dilución de WGA. La aglutinación se observó luego de 3 min.

[b] Los valores indican la dilución más baja que dieron una reacción de aglutinación comparable a la obtenida con el control negativo (CLM20 sin plásmidos) y representa la media de tres experimentos. Entre paréntesis se indica el número de veces que se redujo la concentración de WGA necesaria para obtener la aglutinación en comparación al control negativo.

sería terminal y por lo tanto no reaccionaría con la lectina. El experimento control con CLM20 conteniendo solo pMAV11 y pZY1003, en el cual se obtuvo una banda reactiva, confirmó esta interpretación (figura 20A, calle 5). En este caso, dado que la ramnosil transferasa WbbL no está presente, la banda de LPS de mayor peso molecular está ausente en el gel teñido con plata (figura 20B, calle 5).

En este experimento se analizó además la actividad de la translocasa de *S. enterica* en cuanto a su capacidad de translocar GlcNAc, aunque su sustrato natural contiene Gal en lugar de GlcNAc. Llamativamente, en presencia de pMAV11 y pMF24 (wzx_{SeLT2}) se observó una banda reactiva a la lectina (figura 20A, calle 8) que no se detectó en presencia de pMF24 sólo (figura 20A, calle 7), indicando que Wzx_{SeLT2} es capaz de translocar undecaprenol-P-P-GlcNAc a través de la membrana interna de la célula.

No se observó ninguna banda reactiva a la lectina WGA en ausencia del plásmido pMAV11, lo que implica que la aparición de esta banda es dependiente del gen *wecA*, lo que sugiere que la GlcNAc observada proviene muy probablemente de undecaprenol-P-P-GlcNAc, que actuó como precursor.

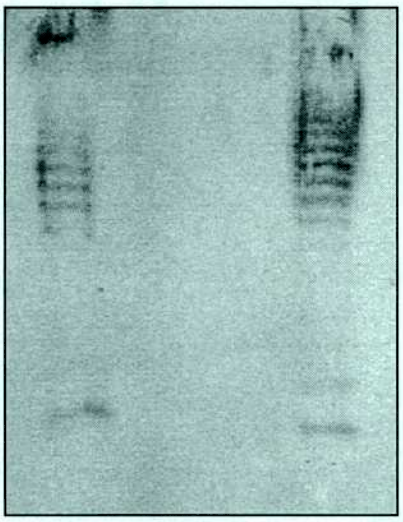
Los experimentos presentados en esta sección proveen una fuerte evidencia de que el residuo de GlcNAc presente en el LPS de E. *coli* K12/O16 se origina en la biosíntesis de antígeno O y su maquinaria de ensamblado, y requiere la presencia de las proteínas WecA y Wzx. Al mismo tiempo, estos resultados indican que es posible translocar y unir al core unidades de antígeno O que contienen sólo uno o dos residuos.

4.5 Caracterización de una mutante *wzx* en *E coli* O7

Para analizar la especifidad de las diferentes translocasas en cuanto a su capacidad de translocar subunidades completas mediante experimentos de complementación, era necesario contar con una mutante del gen *wzx*. Se realizaron las construcciones necesarias para obtener una mutante

cromosomal en este gen utilizando la misma estrategia que la empleada para la disrupción del gen *glf*, pero por razones desconocidas fue imposible obtener la mutante. Previamente se han descripto en la literatura casos similares, en los que la mutación de genes que codifican para proteínas que participan en la síntesis de polisacáridos presumiblemente es letal[22, 25]. Por lo tanto se decidió transformar la cepa CLM4, a la cual se le ha delecionado todo *el operón wba*, con el plásmido JHCV32::Tn3HoHoI-128 (tabla I). Este plásmido contiene todo el operón de genes necesarios para sintetizar el antígeno O7, pero posee un transposón Tn3HoHoI inactivando el gen *wzx*. Este plásmido se encontraba disponible en el laboratorio[21]. Un sistema similar, consistente en utilizar plásmidos conteniendo transposones insertados en el gen de interés ya ha sido utilizado en *Sh. dysenteriae*[25] como alternativa a la mutante en el cromosoma. Para caracterizar esta mutante, se examinó su capacidad de sintetizar antígeno O mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, electrotransferencia y revelado con anticuerpos anti antígeno O7. Para la cepa CLM4 transformada con el plásmido JHCV32::Tn3HoHoI-128 no se obtuvieron bandas reactivas (figura 18, calle 2), en constraste con lo ocurrido en el experimento utilizando el plásmido control pJHCV32 (figura 21, calle 1), que lleva un operón de LPS O7 casi completo

Dado que este fenotipo puede deberse a la mutación del gen *wzx* o a un efecto polar de la inserción de TnHoHoI, se decidió evaluar si la presencia del gen *wzx* en *trans* es capaz de revertir el efecto del transposón. Para ello se transformó CLM4 pJHCV32::Tn3HoHoI-128 con el plásmido pMF21, que contiene el gen wzx_{O7} en el vector de bajo número de copias pEXT21 [57] (ver Materiales y Métodos). Se observó que este plásmido es capaz de complementar la mutación en *wzx* (figura 21, calle 3) y que el efecto observado es debido a la propia mutación y no a un efecto polar del transposón.



1 2 3

Figura 21

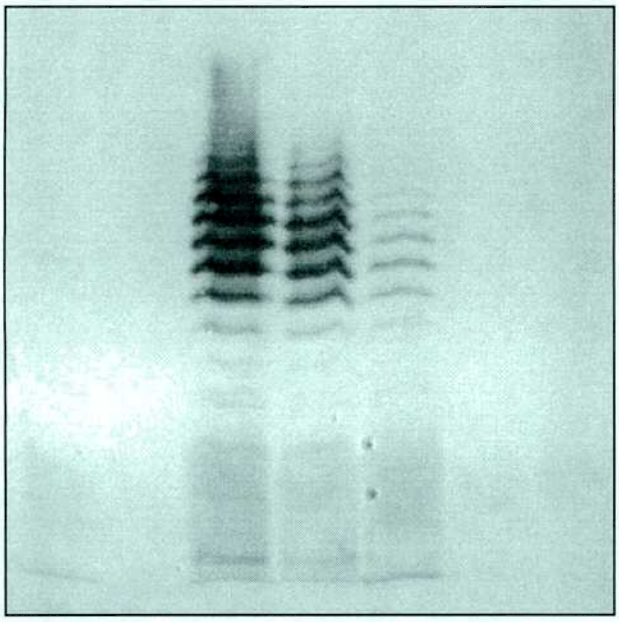
Efecto de la mutación de *wzx* de E .*coli* O7. Se realizó un Western blot con antisuero de conejo anti antígeno O7. Se sembraron preparaciones de LPS de la cepa CLM4 transformada con el plásmido pJHCV32 que contiene el operón de biosíntesis de antígeno O7 intacto (calle1); con el plásmido pJHCV32::Tn3HoHoI-128 (posee el transposón insertado en el gen *wzx*, calle 2) y con pJHCV32::Tn3HoHoI-128 + pMF21 (wzx_{EcO7}^{+}, calle 3).

4.6 Especifidad de la translocación de antígeno O

Como se ha mencionado en la introducción, las proteínas Wzx de diferentes orígenes poseen muy poca homología a nivel estructura primaria, presentando una identidad de hasta un 20 %. Además existe un grupo de proteínas implicadas en la síntesis de exopolisacáridos que también presentan homología con los genes *wzx*.

Los datos presentados en las secciones precedentes sugieren que una subunidad O incompleta se puede sintetizar y ligar posteriormente al core e implican que la proteína Wzx no es específica en cuanto a la longitud de la subunidad O. Por lo tanto se decidió investigar aún mas la especifidad de la función de la proteína Wzx y verificar si esta inespecificidad se mantiene en los casos en los que se sintetizan subunidades O completas.

Para ello se utilizó la cepa CLM4 conteniendo el plásmido pJHCV32::TnHoHoI, que como se ha mencionado en el punto precedente no sintetiza antígeno O debido a que posee el transposón TnHoHoI insertado en la región codificante del gen wzx_{O7}. Cuando se transformaron células de esta cepa con el plásmido pMF20 que contiene el gen de la translocasa $wzx_{EcK12/016}$ se observó por Western-blot utilizando anticuerpos anti-07 la formación de antígeno O7 a niveles comparables a los obtenidos cuando se complementó con el gen wzx_{EcO7} en el plásmido pMF21 (figura 22, calles 2 y 3). En un experimento similar se complementó con el plásmido pMF24 que posee el gen *wzx* de *S. enterica* LT2 (wzx_{SeLT2}), cuyo producto normalmente transloca una subunidad completamente diferente a la de E. coli O7 (figura 4). En este caso también se observó la reversión del fenotipo provocado por la mutación (figura 22, calle 4).



1 2 3 4 5 6

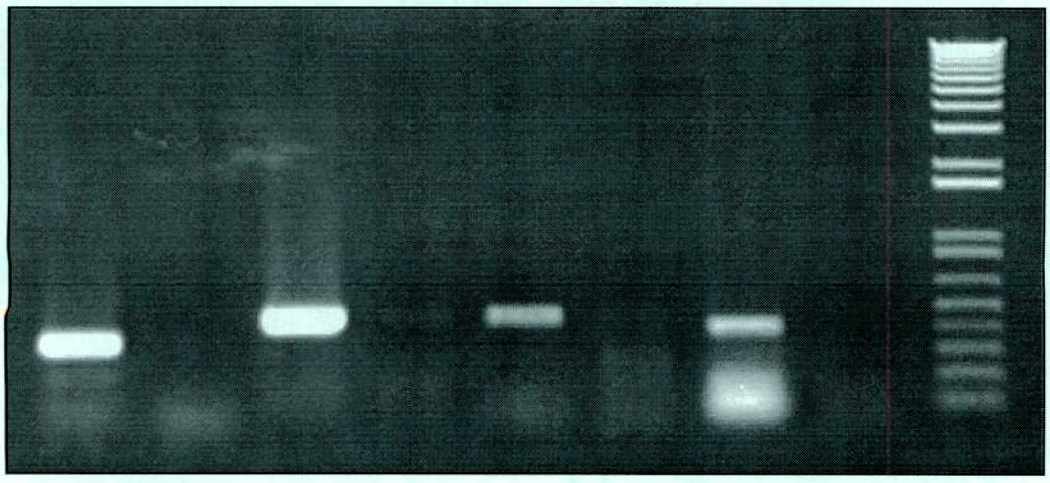
Figura 22

Complementación de una mutante de wzx_{EcO7}. Se realizó un Western-Blot con antisuero anti-O7 de conejo. La muestra de LPS sembrada en la calle 1 corresponde a la cepa CLM4 tranformada con el plásmido pJHCV32::Tn*3*HoHoI-128 (wzx_{EcO7}^{-}). Las calles 2 a 6 contienen LPS de la misma cepa conteniendo además: calle 2, pMF21 (wzx_{EcO7}^{+}); calle 3, pMF20 ($wzx_{EcK12/O16}^{+}$); calle 4, pMF24 (wzx_{SeLT2}^{+}); calle 5, pMF28 ($wzxC^{+}$) y calle 6, pMF26 ($exoT^{+}$).

Sin embargo en este caso se observó una menor cantidad de antígeno O en las membranas en comparación a la observada con $wzx_{EcK12/O16}$ y wzx_{EcO7}. Las muestras de LPS se cuantificaron estimando la cantidad de KDO en cada una de ellas y se sembró idéntica cantidad de LPS en cada calle. Por lo tanto, las diferencias en los niveles de antígeno O no se deben a artefactos provocados por la siembra de diferentes cantidades en las calles.

Se realizaron experimentos de complementación con los plásmidos pMF26 que contiene el gen exoT de *R. meliloti* y el plásmido pMF28 que codifica el gen *wzxC* de *E. coli K12* sobre la misma cepa. Para ambos casos no se observaron bandas reactivas en el Western-blot (figura 22, calles 5 y 6). La falta de complementación no se debió a la ausencia de la expresión de los genes *exoT* y *wzxC*, ya que fue posible detectar el mRNA correspondiente a estos genes por RT-PCR (figura 23) a partir de células de la cepa CLM4 transformadas con los plásmidos pMF26 y pMF28, como así también los correspondientes a las mismas células transformadas con los plásmidos pMF20 y pMF24.

Estos resultados en conjunto sugieren que las translocasas de diferentes orígenes (pero sólo aquellas que participan en la síntesis de antígenos O) pueden ser funcionalmente intercambiables a pesar de la aparente falta de conservación de su secuencia de aminoácidos y que, normalmente, estas translocasas translocan subunidades completamente diferentes a través de las membranas internas bacterianas. En contraste, las translocasas involucradas en la síntesis de exopolisacáridos no podrían complementar una mutación de una translocasa de antígeno O



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Figura 23

Análisis de la transcripción de los genes de diferentes translocasas. Se purificó el RNA de la cepa CLM4 transformada con los plásmidos pMF20 ($wzx_{EcK12/O16}^{+}$, calles 1 y 2); pMF24 (wzx_{SeLT2}^{+}, calles 3 y 4); pMF28 ($exoT^{+}$, calles 5 y 6) y pMF26 ($wzxC^{+}$, calles 7 y 8). Se realizaron reacciones de RT (calles impares) y se hicieron controles sin RT (calles pares). Sobre estas muestras serealziaron reacciones de PCR con primers específicos sobre cada uno de los genes. Calle 9, marcador de peso molecular (1 Kb Ladder plus).

5.-DISCUSION

5.1 Subunidades O incompletas pueden translocarse a través de la membrana interna y ligarse al core

La biosíntesis de antígeno O dependiente de polimerasa (figura 6) es, como se ha mencionado previamente, un proceso sumamente complejo, en el que intervienen un gran número de proteínas. Algunas de éstas están implicadas en la síntesis de los nucleótido azúcares, en la formación de subunidades sobre un lípido transportador, en su transporte a través de la membrana plasmática o en su polimerización y posterior ligación al lípido A-core.

Poco o nada se conoce acerca de la especifidad de la maquinaria de ensamblado del antígeno O. El modelo clásico asume que la subunidad O debe sintetizarse en forma completa para luego translocarse a través de la membrana citoplasmática, polimerizarse y ligarse al lípido A-core previamente sintetizado en forma independiente[10, 25, 67, 68]. Sin embargo, los experimentos descriptos en esta Tesis demuestran que en *E. coli* K12, subunidades incompletas pueden servir como sustratos de la maquinaria de translocación y ensamblado del antígeno O.

Se ha obtenido una cepa derivada de *E. coli* K12 que carece de los genes necesarios para la síntesis del ácido colánico, el antígeno O16 y el ECA. En esta cepa, denominada CLM20, no está alterada la síntesis del lípido A y del core. Mediante la transformación de CLM20 con diferentes plásmidos que poseían alguna de las proteínas involucradas en la síntesis de antígeno O, se realizó la reconstrucción paso a paso de la síntesis y ensamblado de los componentes del antígeno O sobre el lípido A-core y se examinó la presencia o ausencia de los diferentes azúcares correspondientes a subunidades O truncadas unidas al lípido A-core.

Mediante los experimentos en los cuales se analizó la unión de la lectina WGA a GlcNAc se demostró en forma concluyente que un residuo terminal de GlcNAc puede unirse al lípido A-core, requiriéndose a tal efecto la

síntesis de la proteína Wzx. La adición de GlcNAc no ocurrió en ausencia de la proteína WecA, lo que sugiere que este azúcar debe ser donado al lípido A-core a partir de un intermediario undecaprenol-P-P-GlcNAc .

El siguiente azúcar de la subunidad O16, L-Rha, pudo agregarse al undecaprenol-P-P-GlcNAc cuando se transformó además con los genes que codificaban para la síntesis de dTDP-Rha y la ramnosiltransferasa WbbL. El disacárido Rha-GlcNAc también pudo ser incorporado al lípido A-core dependiendo de la presencia de Wzx, como se ha evidenciado por la falta de unión de la lectina WGA con el concomitante incremento en la movilidad electroforética del LPS. Finalmente, una mutación en el gen *glf* afectando la síntesis del cuarto azúcar de la subunidad, Gal*f* , produjo la formación de una subunidad O truncada unida al core del LPS. De estos experimentos puede concluirse que la maquinaria responsable de la translocación no requiere que las subunidades O se encuentren completamente sintetizadas para poder reconocerlas y translocarlas a través de la membrana plasmática. Por otra parte, se determinó que aún el undecaprenol-P-P-GlcNAc, el glicolípido más sencillo, puede ser reconocido como sustrato para la translocación y ligación al core. Esta conclusión puede ser aplicada a cepas que sintetizan otras clases de antígeno O, ya que la GlcNAc está presente en un gran número de cepas de diferentes especies como primer residuo de la subunidad O, en los cuales se transfiere también por acción de la proteína WecA[6, 24, 53, 69].

En un trabajo previo, utilizando mutantes en algunas de las transferasas que forman parte del operón de *Sh. dysenteriae* tipo 1, Klena y Schnaitman[24] reportaron la aparición de bandas adicionales en el perfil electroforético del LPS de las mutantes, que podrían atribuirse a la formación parcial de subunidades O. Aunque los mencionados autores no aportaron ninguna evidencia para confirmar esta hipótesis, los datos bioquímicos y estructurales presentados en esta Tesis concuerdan con sus conclusiones y confirman que esta capacidad de translocar subunidades incompletas puede extenderse a otras especies bacterianas.

5.2 La GlcNAc terminal en el core de E. *coli* K12 proviene de la vía de síntesis de antígeno O

Los datos estructurales obtenidos del análisis del LPS de la cepa MFF1 y de MFF1 transformada con el plásmido pMF19 codificando la ramnosiltransferasa WbbL, permitieron confirmar un reporte previo indicando que existe un residuo de GlcNAc unido a una L-glicero-D-mano-heptosa terminal (HepIV) en el core externo de las cepas W3110 y W3100[62]. Los experimentos utilizando la lectina WGA demuestran que la presencia de GlcNAc depende de la actividad de la transferasa WecA y de la putativa translocasa Wzx, proteínas que forman parte de la maquinaria de transporte y ensamblado del antígeno O. De estos resultados se puede deducir que la HepIV es el sitio de unión del antígeno O16 al core del LPS y que la unión GlcNAc-β(1→7)-HepIV define la especificidad de la ligasa del antígeno O de *E. coli* K12. Esta ligasa, codificada por el gen *waaL*, es la única proteína conocida requerida para la reacción de ligación, la cual permite la transferencia del antígeno O polimerizado sobre el lípido transportador al lípido A-core[70]. WaaL es una proteína integral de membrana que actúa sobre la cara periplasmática de la membrana interna. Varias líneas de evidencia sugieren que estas enzimas no poseen una especifidad obvia para la estructura del polisacárido ligado, reconociendo posiblemente sólo algún tipo de estructura en la unión del residuo de hidrato de carbono al undecaprenol-P-P[70]. Los experimentos en los cuales se demostró que las subunidades parcialmente sintetizadas pudieron unirse al lípido A-core confirman esta hipótesis e indican que una propiedad similar existe para las proteínas Wzx. De esta forma puede explicarse también el porqué ha sido posible clonar y expresar diferentes antígenos O en *E. coli* K12.

Otro resultado interesante de este estudio es la identificación de un residuo adicional de Glc unido a la GlcNAc en la estructura del LPS de la cepa MFF1(pMF19), no presente en la cepa MFF1 sin el plásmido. Este resultado sugiere que la unión de la Glc a la GlcNAc requiere que previamente se una la

Rha. La incorporación de la Glc podría explicarse por la actividad de una glucosiltransferasa codificada en un locus diferente, ubicado separadamente del operón *wb* en el cromosoma de *E. coli* K-12. Un caso homólogo se ha reportado en el sistema de glucosilación involucrado en alteraciones antigénicas codificadas por un bacteriófago en *Sh. flexneri*[71].

5.3 Las proteínas Wzx codificadas por operones de síntesis de antígeno O son intercambiables

El sistema experimental desarrollado en el presente trabajo de Tesis permitió explorar una segunda cuestión crítica en lo referente a la biosíntesis de antígeno O: la especifidad de las proteínas Wzx. La adición del GlcNAc al lípido A-core en la cepa CLM20 se produjo no sólo con la translocasa de *E. coli* O16, sino que también ocurrió con las proteínas homólogas de *E. coli* O7 y *S. enterica* LT2. Estas proteínas poseen muy baja homología a nivel de estructura primaria y los antígenos O sintetizados en cada caso son estructuralmente diferentes. Las dos cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio comparten el primer residuo en la subunidad O, GlcNAc, mientras que en *S. enterica* el primer residuo es galactosa. Resulta sorprendente que Wzx_{SeLT2} sea capaz de translocar undecaprenol-P-P-GlcNAc, ya que este es un intermediario que no participa normalmente de la biosíntesis de antígeno O en *S. enterica*. En contraste, las proteínas implicadas en la síntesis de exopolisacáridos ensayadas, ExoT de *R. meliloti* y WzxC de *E. coli* K12, no produjeron la adición significativa de GlcNAc al lípido A-core.

El análisis semicuantitativo realizado a través de la aglutinación con la lectina WGA muestra que en presencia de las translocasas Wzx de *E. coli* K-12/O16 y *E. coli* O7, el lípido A-core contenía mayores cantidades de residuos de GlcNAc que en presencia de la translocasa de *S. enterica*. Este resultado se confirmó mediante el experimento paralelo en el cual se complementó una mutante *wzx*$^-$ en *E. coli* O7 con las translocasas de las tres cepas. Las translocasas de *E. coli* K12/O16 y de *E. coli* O7 complementaron la mutación

muy eficientemente, mientras que la proteína de *S. enterica* también fue capaz de corregir el fenotipo, pero con menor eficiencia. Estas diferencias no podrían atribuirse a la existencia de diferentes niveles de expresión de los genes respectivos, ya que fueron clonados en el mismo vector utilizando la misma estrategia de clonado.

Una posible explicación para las diferencias en los niveles de complementación observados es que para que ocurran los procesos de translocación y ligación al core deba producirse la interacción entre las proteínas involucradas, las que formarían un complejo multiproteico en la membrana interna. En este hipotético complejo podrían participar la translocasa Wzx, la ligasa WaaL, WecA y la polimerasa Wzy. Si este proceso es mediado por un complejo multiproteico, las translocasas $Wzx_{EcK12/O16}$ y Wzx_{EcO7} podrían interactuar más eficientemente con WecA y con WaaL, ya que el primer azúcar de la subunidad para ambos casos es GlcNAc y la mutante utilizada se construyó en una cepa *E. coli*. Wzx_{SeLT2} normalmente interactuaría con WbaP, la transferasa de galactosa y/o con la ligasa de *S. enterica* $WaaL_{Se}$, que no se encontraban disponibles en la mutante de *E. coli* utilizada. La noción de que interacciones específicas entre las proteínas involucradas en la transferencia de azúcares-P al undecaprenol-fosfato, la translocación, la polimerización y la ligación al core es requerida para la biosíntesis de antígeno O es apoyada además por el hecho de que las translocasas ExoT y WzxC, involucradas en la síntesis de exopolisacáridos no complementaron la mutante de una translocasa de antígeno O. Ambas proteínas poseen mayor homología a Wzx_{EcO7} que los otros genes Wzx (figura 10) y según los modelos aceptados para la biosíntesis de succinoglicano y ácido colánico, estas translocasas cumplirían la misma función que las translocasas de antígeno O, la translocación de un undecaprenol-P-P-oligosacárido a través de la membrana interna. Sin embargo estas proteínas no fueron capaces de translocar undecaprenol-P-P-GlcNAc en el ensayo de aglutinación con WGA ni la subunidad O7 en el experimento de complementación de la mutante *wzx*$^-$. Estas supuestas interacciones entre las proteínas que participan en la

biosíntesis y ensamblado del antígeno O podrían contribuir a la regulación de ambos procesos. Para confirmar la existencia de este hipotético complejo se requerirán experimentos de cross-linking que permitan aislar estos complejos e identificar sus componentes. La cepa CLM20 sería un modelo apropiado para realizar estos experimentos.

5.4- Un proceso similar de translocación independiente de la estructura glicosídica podría ocurrir en eucariotas

Existe una remarcable analogía entre la topología de la biosíntesis de antígeno O dependiente de polimerasa, las etapas iniciales de la formación del oligosacárido que se transfiere a las glicoproteínas en eucariotas y la biosíntesis de peptidoglicano (figura 24)[72].

Entre las similitudes se destaca:

a) el uso de un transportador lipídico poliprenol-fosfato
b) la adición del primer azúcar como azúcar-P a través de una enzima integral de membrana, que es sensible a un mismo antibiótico (tunicamicina) y la liberación de un nucleósido monofosfato
c) la adición de los subsecuentes residuos de azúcares por otras proteínas asociadas a membranas a partir de nucleótido difosfoazúcares
d) el reciclaje del lípido transportador vía defosforilación.

Recientemente, se han encontrado homologías a nivel de secuencia de aminoácidos entre las enzimas implicadas en la biosíntesis de glicoproteínas y lipopolisacárido. Se ha reportado que una proteína que interviene en la síntesis de LPS en *Campilobacter jejuni* que tiene una gran homología con la subunidad Sst3 de la oligosacariltransferasa de levaduras, aunque aún no se ha determinado experimentalmente su función[73].

Para iniciar la síntesis de glicoproteínas en eucariotas, el heptasacárido $Man_5GlcNAc_2$-P-P-Dol se sintetiza en la cara citoplasmática de la membrana del retículo endoplásmico y luego se transloca hacia el lumen donde continúa el procesamiento del oligosacárido y finalmente se transfiere a proteínas[33,40].

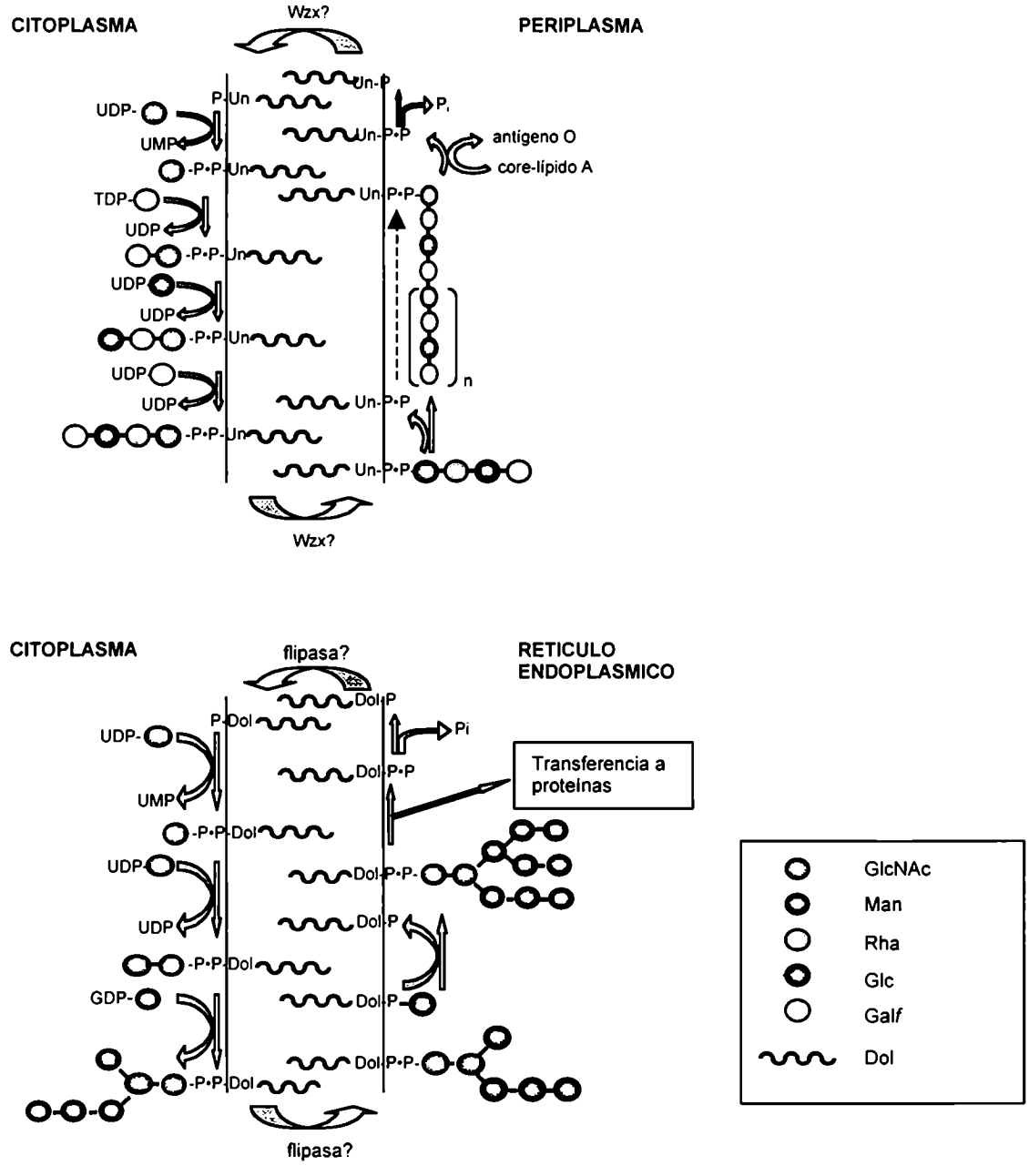


Figura 24

Analogías entre la biosíntesis de antígeno O en procariotas (*E. coli* K12/O16) y glicoproteínas en eucariotas.

Puede observarse que la translocación de oligosacáridos unido a lípidos tarnsportadores representa un proceso biológico básico encontrado tanto en células procariotas como en eucariotas. En un reciente trabajo, utilizando vesículas microsomales se sugirió que el movimiento transmembrana de Dol-P-P-oligosacáridos está mediado por alguna proteína transportadora, aunque hasta el presente no se ha identificado ninguna proteína específica que medie esta translocación[37,74]. Llamativamente, en cepas de levaduras con mutaciones en el gen *alg2*, se producen oligosacáridos truncados que sólo contienen $Man_2GlcNAc_2$ que se transfieren *in vivo* a proteínas, sugiriendo que no es estrictamente necesario que el oligosacárido se sintetice en forma completa para que pueda translocarse a través de la membrana del RE[75]. Estos resultados pueden explicarse si, como se sugiere en este trabajo para las translocasas involucradas en la síntesis de antígeno O, la actividad de las hipotéticas translocasas eucarióticas es independiente de la estructura de la porción glicosídica unida al poliprenol.

Se requerirán experimentos adicionales para probar la generalidad del modelo aquí propuesto. Mientras tanto, el sistema experimental diseñado en este estudio posiblemente permitirá el análisis de las interrelaciones entre las diferentes proteínas involucradas en el ensamblado del antígeno O y otros polisacáridos como así también las interacciones entre los sustratos y la maquinaria de síntesis.

REFERENCIAS

[1] Reeves P. R. (1992) Variation in O-antigens, niche-specific selection and bacterial populations. *FEMS Microbiol. Lett.* **15**, 509-516.

[2] Paulsen, I. T., Beness, A. M. and Saier, M. H. (1997) Computer-based analysis of the protein constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria. *Microbiology* **143**, 2685-2699.

[3] Raetz, C. R. H. (1996) Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive molecules. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology* (Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. y Umbarger, H. E., eds.). ASM Press, Washington, DC.

[4] Holst O. and Brade H. (1992). Chemical structure of the core region lipopolysaccharides. *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides*, Vol 1. (Morrison D. C. y Ryan. J. L., eds.) Molecular Biochemistry and Cellular Biology. CRC Press, Boca Raton, USA. pp. 135-170.

[5] Roantree, R.J. (1967). *Salmonella* O-antigen and virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* **21**, 443-466.

[6] Jann K and Jann B. (1984) Structure and biosynthesis of O-antigen. *Handbook of endotoxin*, Vol 1.Chemistry of endotoxin. (Riestchel E. T., ed.),. Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam.

[7] Stevenson, G., Neal, B., Liu, D., Hobbs, M., Packer, N. H., Batley, M., Redmond, J. W., Lindquist, L. and Reeves, P. (1994) Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its *rfb* cluster. *J. Bacteriol.* **176**, 4144-4156.

[8] Osborn, M. J. (1979) Biosynthesis and assembly of the lipopolysaccharide of the outer membrane. *Bacterial Outer Membranes*. (Inouye M., ed). John Wiley & Sons, New York.

[9] Rick, P.D. (1987) Lipopolysaccharide biosynthesis. *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: *Cellular and Molecular Biology*. (Neidhart F., Ingraham J. L., Low, K. B., Magasanik B., Schaechter, M. y Umbarger H. E., eds). American Society for Microbiology, Washington D.C.

[10] Whitfield, C. (1995) Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol.* **3**, 178-185.

[11] Whitfield, C. and Roberts, I. S. (1999) Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli. Mol. Microbiol* **31**, 1307-1319.

[12] Bronner, D., Clarke, B. R. and Whitfield, C. (1994) Identification of an ATP-binding cassette transport system required for translocation of *lipopolysaccharide* O-antigen side-chains across the cytoplasmic membrane of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1. *Mol. Microbiol*, **14**, 505-519.

[13] Keenleyside, W. J. and Whitfield, C. (1999) Genetics and biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Endotoxin in Health and Disease*. (Brade, H., Morrison, D. C., Vogel, S. y Opal, S., eds.). Marcel Dekker, Inc., New York.

[14]Goldman R. C. and Hunt F. (1990) Mechanism of O-antigen distribution in lipopolysaccharide.*J. Bacteriol.* **172**, 5352-5359.

[15] Batchelor R. A., Haraguchi G. E., Hull R. A. and Hull S. I. (1991) Regulation by a novel protein of the bimodal distribution of lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli. J Bacteriol.* **173**, 5699-5704.

[16] Marolda, C .L., Feldman, M. F. and Valvano, M. A. (1999) Genetic organization of the O7-specific lipopolysaccharide biosynthesis cluster of *Escherichia coli* VW187 (O7:K1). *Microbiology* **145**, 2485-2496.

[17] Reeves, P. R., Hobbs, M., Valvano M. A., Skurnik, M., Whitfield, C., Coplin, D., Kido, N., Klena, J., Maskell, D,. Raetz, C. R. and Rick, P. D. (1996) Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* **4**, 495-503.

[18] Nassau, P. M., Martin, S. L., Brown, R. E., Weston, A., Monsey, D., McNeil, M. R. and Duncan, K. (1996) Galactofuranose biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: identification and cloning of UDP-galactopyranose mutase. *J Bacteriol.* **178**, 1047-1052.

[19] Liu, D. and Reeves, P. R. (1994) *Escherichia coli* K12 regains its O antigen. *Microbiology* **140**, 49-57.

[20] Pluschke, G. and Achtman, M. (1984) Degree of antibody-independent activation of the classical complement pathway by K1 *Escherichia coli* differs with O antigen type and correlates with virulence of meningitis in newborns. *Infect. Immun.* **43**, 684-692.

[21] Marolda, C. L., Welsh, J., Dafoe, L. and Valvano, M. A. (1990) Genetic analysis

of the O7-polysaccharide biosynthesis region from the *Escherichia coli* O7:K1 strain VW187. *J. Bacteriol.* **172**, 3590-3599.

[22] Macpherson D. F., Manning P. A. and Morona R. (1995) Genetic analysis of the rfbX gene of *Shigella flexneri*. Gene **155**, 9-17.

[23] Wang, L. and Reeves, P. R. (1998) Organization of the *Escherichia coli* O157 *O antigen* cluster and identification of its specific genes. *Infect. Immun.* **66**, 3545-3551.

[24] Klena, J. D. and Schnaitman, C. A. (1993) Function of the *rfb* gene cluster and the *rfe* gene in the synthesis of O antigen by *Shigella dysenteriae* 1. *Mol Microbiol* **9**, 393-402.

[25] Liu, D., Cole, R. A. and Reeves, P. R. (1996) An O-antigen processing function for Wzx (RfbX): A promising candidate for O-unit flippase. *J Bacteriol*, **178**, 2102-2107.

[26] Burrows L .L. and Lam J. S. (1999) Effect of wzx (rfbX) mutations on A-band and B-band lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* O5. *J Bacteriol.* **181**, 973-980.

[27] Reuber T. L. and Walker G. C. (1993) Biosynthesis of succinogycan, a symbiotically imporatnt exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell* **74**, 269-280.

[28] Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M. and Reeves, P. R. (1996) Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J. Bacteriol.* **178**, 4885-4893.

[29] Soldo, B., Lazarevic, V., Pagni, M. and Karamata, D. (1999) Teichuronic acid operon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microb.* **31**, 795-805.

[30] Gonzalez, J. E., Semino, C. E., Wang, L. X., Castellano-Torres, L. E. and Walker, G. C. (1998) Biosynthetic control of molecular weight in the polymerization of the octasaccharide subunits of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13477-13482.

[31] Bugg T. D. and Walsh C. T. (1992) Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance. *Nat. Prod. Rep.* **9**,199-215.

[32] Bupp, K. and Heijenoort, J. (1993) The final step of peptidoglycansubunit

assembly in *Esherichia coli* occurs in the cytoplasm. *J. Bacteriol.* **175**: 1841-1843.

[33] Abeijon, C. and Hirschberg, C. B. (1992) Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 32-36.

[34] Hirschberg, C .B. and Snider, M. D. (1987) Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 63-87.

[35] Haselbeck A., and Tanner W. (1982) Dolichyl phosphate-mediated mannosyl transfer through liposomal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A..* **79**, 1520-1524.

[36] Schutzbach J. S. and Zimmerman J. W. (1992). Yeast dolichyl-phosphomannose synthase: reconstitution of enzyme activity with phospholipids. *Biochem. Cell Biol* . **70**, 460-465.

[37] Rush, J. S. and Waechter, C. J. (1995) Transmembrane movement of a water-soluble analogue of mannosylphosphoryldolichol is mediated by an endoplasmic reticulum protein. *J. Cell Biol.* **130**, 529-536.

[38] Hanover, J. A. and Lennarz, W. J. (1978) The topological orientation of N,N'-diacetylchitobiosylpyrophosphoryldolichol in artificial and natural membranes. *J. Biol. Chem.* **254**, 9237-9246.

[39] McCloskey, M. A. and Troy, F. A. (1980) Paramagnetic isoprenoid carrier lipids: chemical synthesis and incorporation into model membranes. *Biochemistry* **19**, 2061-2066.

[40] Burda, P. and Aebi, M. (1999) The dolichol pathway of *N*-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 239-257.

[41] Gentzsch, M and Tanner, W. (1996) The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J.* **15**, 5752-5759.

[42] Zufferey R., Knauer R., Burda P., Stagljar I., te Heesen S., Lehle L. and Aebi M. (1995) STT3, a highly conserved protein required for yeast oligosaccharyl transferase activity *in vivo*. *EMBO J.* **14**, 4949-4960.

[43] Marolda, C. L. and Valvano, M. A. (1993) Identification, expression, and DNA sequence of the GDP-mannose biosynthesis genes encoded by the O7 *rfb* gene cluster of strain VW187 (*Escherichia coli* O7:K1). *J. Bacteriol.* **175**, 148-158.

[44] Neuhard, J. and Thomassen, E. (1976) Altered deoxyribonucleic pools in P2 eductants of *Escherichia coli* K-12 due to deletion of the *dcd* gene. *J. Bacteriol.* **126**, 999-1001.

[45] Owen, R. J. and Borman, P. (1987) A rapid biochemical method for purifying high molecular weight bacterial chromosomal DNA for restriction enzyme *analysis*. *Nucl. Acids Res.* **15**, 3631.

[46] Sambrook, J., Fristch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.

[47] Miller, V. L. and Mekalanos, J. J. (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**, 2575-2583.

[48] Meier-Dieter, U., Starman, R., Barr, K., Mayer, H. and Rick, P. D. (1990) Biosynthesis of enterobacterial common antigen in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 13490-13497.

[49] Provence, D. L. and Curtiss III, R. (1994) Gene transfer in Gram-negative bacteria. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. (Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. and Krieg, N. R., eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC.

[50] Maloy, S. and Nunn, W. (1981) Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **145**, 1110-1112.

[51] Valvano, M. A. and Crosa, J. H. (1989) Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* K-12 of chromosomal genes determining the O7 lipopolysaccharide antigen of a human invasive strain of *E. coli* O7:K1. *Infect. Immun.* **57**, 937-943.

[52] Marolda, C. L. and Valvano, M. A. (1995) Genetic analysis of the dTDP-rhamnose biosynthesis region of the *Escherichia coli* VW187 (O7:K1) *rfb* gene cluster: identification of functional homologs of *rfbB* and *rfbA* in the *rff* cluster and correct location of the *rffE* gene. *J. Bacteriol.* **177**, 5539-5546.

[53] Alexander, D. C. and Valvano, M. A. (1994) Role of the *rfe* gene in the biosynthesis of the *Escherichia coli* O7-specific lipopolysaccharide and other O-specific polysaccharides containing N-acetylglucosamine. *J. Bacteriol.* **176**, 7079-7084.

[54] Yao, Z., Liu, H. and Valvano, M. A. (1992) Acetylation of O-specific lipopolysaccharides from *Shigella flexneri* 3a and 2a occurs in *Escherichia coli* K-12 carrying cloned *S. flexneri* 3a and 2a *rfb* genes. *J. Bacteriol.* **174**, 7500-7508.

[55] Ried, J. L. and Collmer, A. (1987) A *npt1-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis. *Gene* **57**, 239-246.

[56] Metcalf, W. W., Jiang, W. and Wanner, B. L. (1994) Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers. *Gene* **138**, 1-7.

[57] Dykxhoorn, D. M., St Pierre, R. and Linn, T. (1996) A set of compatible *tac* promoter expression vectors. *Gene* **177**, 133-136.

[58] Yao, Z. and Valvano, M. A. (1994) Genetic analysis of the O-specific lipopolysaccharide biosynthesis region (*rfb*) of *Escherichia coli* K-12 W3110: identification of genes that confer group 6 specificity to *Shigella flexneri* serotypes Y and 4a. *J. Bacteriol.*,**176,** 4133-4143.

[59] Westphal, O. and Jann, K. (1965) Bacterial lipopolysaccharides. *Methods Carbohydr. Chem.* **5**, 83-91.

[60] Karkhanis Y. D, Zeltner J. Y., Jackson J. J. and Carlo D. J. (1978) A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Anal. Biochem.* **85**, 595-601.

[61] Stevenson, G., Neal, B., Liu, D., Hobbs, M., Packer, N. H., Batley, M., Redmond, J. W., Lindquist, L. and Reeves, P. R. (1994) Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its *rfb* cluster. *J. Bacteriol.* **176**, 4144-4156.

[62] Holst, O., Zahringer, U., Brade, H. and Zamojski, A. (1991) Structural analysis of the heptose/hexose region of the lipopolysaccharide from *Escherichia coli* K-12 strain W3100. *Carbohydr. Res.* **215**, 323-335.

[63] Galanos C. , Luderitz O. and Westphal O. (1969) A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* **9**, 245-249.

[64] Holst, O., Zahringer, Brade, H., and Zamojsky, A. (1991) Structural analysis of the heptose/hexose region of the lipopolysaccharide from Escherichia coli K-12 strain W3100. *Carbohydr. Res.* **215**, 323-335.

[65] Rick, P. D., Hubbard, G. L. and Barr, K. (1994) Role of the rfe gene in the synthesis of the O8 antigen in Escherichia *coli* K-12. *J. Bacteriol.* **176**, 2877-2884.

[66] Allen, A. K., Neuberger, A. and Sharon, N. (1973) The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin. *Biochem. J.* **131**, 155-162.

[67] Mulford, C. A. and Osborn, M. J. (1983) An intermediate step in translocation of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Salmonella typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 1159-1163.

[68] Nikaido, H. (1996) Outer Membrane. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology* . (Neidhardt, F.C., Curtiss, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W .S., Riley, M., Schaechter, M. and Umbarger, H. E., eds.). ASM Press, Washington, DC..

[69] Clarke, B. R., Bronner, D., Keenleyside, W. J., Severn, W. B., Richards, J. C. and Whitfield, C. (1995) Role of Rfe and RfbF in the initiation of biosynthesis of D-galactan I, the lipopolysaccharide O antigen from *Klebsiella pneumoniae* serotype O1. *J. Bacteriol.* **177**, 5411-5418.

[70] Heinrichs, D. E., Yethon, J. A. and Whitfield, C. (1998) Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica. Mol. Microbiol.* **30**, 221-232.

[71] Guan, S., Bastin, D. A. and Verma, N. K. (1999) Functional analysis of the O antigen glucosylation gene cluster of *Shigella flexneri* bacteriophage SfX. *Microbiology* **145**, 1263-1273.

[72] Bugg, T. D. and Brandish, P. E. (1994) From peptidoglycan to glycoproteins: common features of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 255-262.

[73] Wood A. C., Oldfield N. J., O'Dwyer C. A. and Ketley J. M. Cloning, mutation and distribution of a putative lipopolysaccharide biosynthesis locus in *Campylobacter jejuni.* (1999) *Microbiology* **145**,379-388.

[74] Rush, J. S., van Leyen, K., Ouerfelli, O., Wolucka, B. and Waechter, C. J. (1998) Transbilayer movement of Glc-P-dolichol and its function as a glucosyl

donor: protein-mediated transport of a water-soluble analog into sealed ER vesicles from pig brain. *Glycobiology* **8**, 1195-1205.

[75] Jackson, B. J., Warren, B., Bugge, B. and Robbins, P .W. (1989) Synthesis of lipid-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: $Man_2GlcNAc_2$ and $Man_1GlcNAc_2$ are transferred from dolichol to protein in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* **272**, 203-209.