



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS – FUNDACIÓN INSTITUTO LOLOIR

**“GENÉTICA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA
DE LA SÍNTESIS DE EXOPOLISACÁRIDOS
BACTERIANOS”**

MARÍA VERÓNICA IELMINI

DIRECTOR: DR LUIS IELPI

**LUGAR DE TRABAJO: INTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS –
FUNDACION INSTITUTO LOLOIR**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE
BUENOS AIRES**

2006



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS – FUNDACIÓN INSTITUTO LOLOIR

**“MOLECULAR GENETIC AND
BIOCHEMISTRY OF BACTERIAL
POLYSACCHARIDE BIOSYNTHESIS”**

MARÍA VERÓNICA IELMINI

ADVISOR: DR LUIS IELPI

**PLACE OF WORK: INTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS –
FUNDACION INSTITUTO LOLOIR**

2006

Resumen

Los polisacáridos son componentes característicos de bacterias Gram positivas y negativas. El interés en estas moléculas se debe a su contribución a la virulencia en bacterias patógenas y a que proveen una alternativa a los polímeros tradicionales de uso industrial, (derivados de las plantas) y a los plásticos (derivados de los hidrocarburos). En muchos casos la biosíntesis de las subunidades que los componen se conoce en detalle, pero poco se sabe sobre los mecanismos de polimerización y exportación de estas macromoléculas.

Nuestro objetivo fue el estudio de ambos procesos utilizando como modelo al polisacárido **xantano**, heteropolímero sintetizado por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (bacteria Gram negativa fitopatógena). El análisis de la secuencia genómica de *X. campestris* y el estudio de mutantes deficientes en la producción del xantano, mostraron que por lo menos tres proteínas estarían involucradas, GumB, GumC y GumE.

Mediante aproximaciones genéticas y bioquímicas se determinó que GumE tendría la función de polimerasa, GumB favorecería el acercamiento de las membranas celulares, mientras que GumC actuaría como co-polimerasa. El estudio estructural y bioquímico del polímero reveló que la estequiometría entre estas proteínas afecta la calidad del polímero sintetizado. El estudio de estabilidad de estas proteínas en distintos entornos genéticos, reveló que la interacción no solo se da a nivel de las proteínas de polimerización/exportación sino también con las proteínas responsables de la síntesis de la subunidad repetitiva.

En la presente tesis se ha aportado evidencia experimental que confirma la existencia de un complejo proteico de membrana responsable de los procesos de polimerización/exportación del xantano y que ambos procesos se llevan a cabo en forma simultánea.

Abstract

Polysaccharides are characteristic components of Gram positive and negative bacteria. The interest in these molecules is due to its contribution to the virulence of pathogenic bacteria and because provide an alternative to the traditional industrial use polymers (plants derivatives) and to the plastics (hydrocarbons derivatives). In many cases, it was well characterized the biosynthesis of the subunit that compose them, but little it is known about the polymerization and export mechanisms of these macromolecules.

Our purpose was the study of both processes in the model polysaccharide xanthan, heteropolymer synthesized by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (phytopathogen Gram negative bacteria). The analysis of the genomic sequence of *X. campestris* and the study of mutants lacking xanthan production, showed that at least three proteins would be involved, GumB, GumC and GumE.

By means of genetic and biochemical approaches it was determined that GumE has the polymerase activity, GumB would approach of the cellular membranes, while GumC would act as co-polymerase. Structural and biochemical studies of the polymer revealed that the stoichiometry among these proteins affects the quality of the polymer synthesized. Stability studies of these three proteins in different mutant backgrounds revealed that the interaction is not only at the level of polymerization/export proteins, but also with the proteins responsible for the synthesis of the subunits.

In the present thesis experimental evidence has been provided that confirms the existence of a protein membrane complex responsible for the polymerization/export of xanthan and that both processes are carried out in simultaneous form.

Abreviaturas

aa	aminoácidos	LPS	lipopolisacárido
<i>aacC1</i>	gen que codifica para la resistencia a gm	Man	manosa
ABC	proteínas con motivos de unión a ATP (<i>ATP binding cassette</i>)	ME	membrana externa de bacterias Gram-negativas
AFM	microscopia de fuerza atómica	MFP	proteína de fusión de membranas.
ap	ampicilina	MI	membrana interna de bacterias Gram-negativas
ATP	adenosina-5'-trifosfato	NTG	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
β -gal	β -galactosidasa	OMP	proteínas de membrana externa
cb	carbenicilina	PEP	fosfoenol piruvato
<i>core</i>	núcleo oligosacárido	PhoA	fosfatasa alcalina
CPS	polisacárido capsular	<i>phoA</i>	gen que codifica para la enzima fosfatasa alcalina de <i>E. coli</i>
Da	Dalton	PSII	peptidasa señal II
dNTPs	deoxiadenosina-trifosfato, deoxicitidina-trifosfato, deoxiguanosina-trifosfato, deoxitimidina-trifosfato (en conjunto)	rif	rifampicina
EMS	etil metano sulfonato	RT	transcriptasa reversa
EP	espacio periplásmico de bacterias Gram-negativas	SDS	dodecil sulfato de sodio
EPS	exopolisacárido	STM	segmento transmembrana
FPM	fuerza protón-motriz	T°amb	temperatura ambiente
Glc	glucosa	tc	tetraciclina
GlcA	ácido glucurónico	TC-DB	base de datos de transportadores
gm	gentamicina	Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
GSP	vía general de secreción de proteínas	<i>ugp</i>	gen que codifica para la enzima uridina 5'-difosfatoglucosa pirofosforilasa
KDO	ácido 3-deoxi-D- <i>mano</i> -oct-2-octulosónico o ulosónico	UGP	UDP-Glc pirofosforilasa
km	kanamicina	und-P	undecaprenil fosfato
lacZ	gen que codifica para la enzima β -galactosidasa de <i>E. coli</i>		
lip-P	poliprenol fosfato aceptor		

1.

Introducción

1.1 Polisacáridos bacterianos. Generalidades

Todas las células tienen en su superficie hidratos de carbono complejos, que sirven esencialmente de elementos estructurales otorgando forma y rigidez, o como moléculas de reconocimiento célula-célula. En esta tesis nos referiremos exclusivamente a los presentes en las superficies bacterianas.

Diversos géneros de bacterias producen polímeros de carbohidratos denominados **polisacáridos extracelulares**, los cuales pueden permanecer asociados a la pared bacteriana o bien, pueden ser liberados al medio extracelular (3). Los polisacáridos extracelulares abarcan a los lipopolisacáridos (LPS), embebidos en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas; a los polisacáridos capsulares (CPS), que forman una envoltura denominada cápsula o glicocálix la cual rodea completamente a la célula, y a los exopolisacáridos (EPS), que son liberados al medio extracelular en forma de material mucoso (Fig. 1). La asignación de cada una de estas categorías a los distintos polisacáridos no siempre es muy clara y a veces arbitraria. (5).

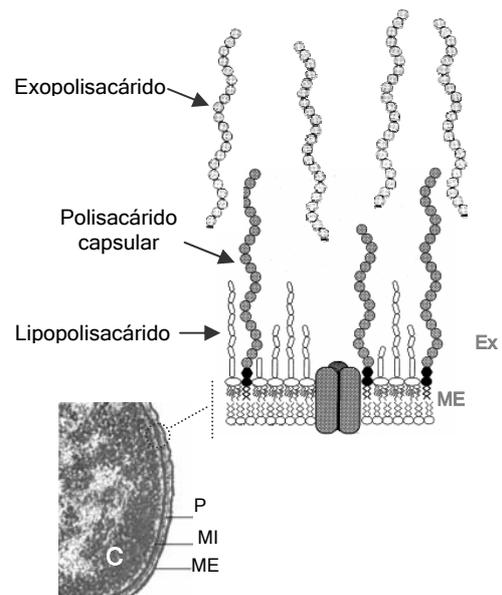


Fig. 1 Polisacáridos extracelulares bacterianos. Microfotografía electrónica de la membrana de una bacteria Gram negativa y detalle de los distintos tipos de exopolisacáridos. *C*, citoplasma; *P*, periplasma; *MI*, membrana interna; *ME*, membrana externa; *Ex*, extracelular.

1.1.1 Función biológica y composición química

La función biológica de los polisacáridos está determinada por tres propiedades físicas (6), (7). En primer lugar, son muy higroscópicos, por lo que se encuentran altamente hidratados, protegiendo a la bacteria contra la desecación y previniendo el contacto de la membrana celular con sustancias hidrofóbicas, como detergentes y antibióticos. En segundo lugar, la mayoría de los polisacáridos extracelulares poseen gran cantidad de grupos aniónicos, pudiendo actuar como resinas de intercambio iónico, concentrando nutrientes y minerales en las cercanías de la célula, o secuestrando sustancias tóxicas. En tercer lugar, producen soluciones muy viscosas, e inclusive geles, lo cual es determinante en la función de protección contra agentes agresivos del medio ambiente, protozoos o bacteriofagos, y para la adhesión a superficies biológicas o inertes durante el

establecimiento de *biofilms* (8). Por último, cabe destacar la función que cumplen los polisacáridos en las interacciones bacteria-hospedador. Desde este punto de vista, estas asociaciones pueden ser benéficas (simbiosis) o perjudiciales (patogénesis) para los organismos hospedadores, entre lo que se encuentran animales y plantas (9).

Por su composición química, los polisacáridos pueden clasificarse como homopolímeros o heteropolímeros según estén constituidos por una única o diferente clase de monosacáridos respectivamente. A su vez pueden diferir en la secuencia de los azúcares que los componen, el tipo de enlace glicosídico entre ellos y la configuración del carbono anomérico del enlace, la forma del anillo (furanosa o piranosa) y la configuración absoluta (D- o L-) de los monosacáridos, la presencia de diferentes sustituyentes orgánicos e inorgánicos y también, en la longitud y tipo de cadena sacarídica (lineal, ramificada o cíclica). En conjunto, estas características hacen de los polisacáridos bacterianos un grupo de moléculas con una amplia diversidad estructural, la cual no se encuentra entre los polisacáridos de origen vegetal o animal, y hasta el momento tampoco puede ser obtenida por síntesis química.

Tabla 1. Usos comerciales e industriales de los biopolímeros (10)

Funciones	Aplicaciones	Polímero
Propiedades biológicas:	Agentes antitumorales Cirugía Análogos de heparina Cicatrizantes	(1→3) β-D-glucanos ^a Ácido hialurónico ^b EPS K5 ^c Celulosa bacteriana ^d
Propiedades químicas:	Sustrato enzimático Preparación de oligosacáridos	EPS K4 ^e y K5 Curdlanos ^f , pullulanos ^g , escleroglucanos ^h
Propiedades físicas: Estabilizante de emulsiones Resistencia Formación de película (<i>film</i>) Coagulante Estabilizante de espuma Gelificante	Alimentos y pinturas tixotrópicas Membranas acústicas Cobertura de comida Purificación de agua y extracción de oro Cerveza y extinguidores de fuego Tecnología enzimática Alimentos Recuperación de petróleo Cosméticos y fármacos Alimentos congelados, pastillas y jaleas Barros impregnados de petróleo y tintas Alimentos Papel Pesticidas agroquímicos y <i>sprays</i>	Xantano ⁱ Celulosa bacteriana Pullulano Varios Xantano Gelano ^j Curdano, gelano Curdano, xantano Ácido hialurónico Xantano Xantano Xantano Varios Xantano
Hidratante Inhibidor de cristalización Control de viscosidad Suspensión		

(a) *Agrobacterium* sp., *Rhizobium* sp; (b) *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus*; (c) *Escherichia coli* K5; (d) *Acetobacter xylinum*; (e) *Escherichia coli* K4; (f) *Agrobacterium* sp., *Rhizobium* sp; (g) *Aureobasidium pullulans*; (h) *Sclerotium rolfsii*, *Schizophyllum commune*; (i) *Xanthomonas* sp; (j) *Sphingomonas paucimobilis*.

1.1.2 Aplicaciones industriales

Los polisacáridos bacterianos son una alternativa importante a los polímeros tradicionales de uso industrial derivados de las plantas, y a los plásticos, derivados de los hidrocarburos. Además de su variedad estructural, solo en *E. coli* se han identificado 173 tipos de LPS y 80 de CPS diferentes (5), estos polímeros presentan otras ventajas. Pueden ser sintetizados bajo condiciones de cultivo reguladas; un mismo tipo de organismo puede sintetizar varios polisacáridos diferentes, son

biodegradables y biocompatibles, son un recurso renovable con una tasa de recuperación muy rápida; y por último, son capaces de disolverse o dispersarse en agua, alterando las propiedades de la solución que los contiene. (10). Estas características encuentran diversas aplicaciones en la industria alimenticia, cosmética, química, biomédica, petrolera y de tratamiento de residuos (11), algunas de las cuales se detallan en la Tabla 1.

Aunque aún en su fase inicial, la capacidad para controlar y modificar la estructura y composición de los polisacáridos permite desarrollar nuevos polímeros adecuados para cada aplicación particular. Una de las estrategias para lograr este objetivo involucra la manipulación genética de los organismos productores de polisacáridos, para lo cual es indispensable conocer, en forma muy detallada, cuáles son los pasos responsables de la biosíntesis de estas moléculas y los genes asociados a cada uno de ellos.

1.1.3 Mecanismos de síntesis de los polisacáridos extracelulares

Se identificaron dos mecanismos generales de síntesis de polisacáridos extracelulares. El primero, restringido casi exclusivamente a bacterias Gram-positivas, involucra a enzimas extracelulares encargadas de sintetizar los polímeros en una sola etapa a partir de disacáridos, generalmente sacarosa. Los ejemplos más estudiados son el dextrano producido por *L. mesenteroides* (12) y el levano sintetizado por *E. amylovora* (13).

El segundo mecanismo, más generalizado, involucra la formación de uniones glicosídicas *de novo* a partir de hexosas activadas, en el interior celular (6). En el caso de los polímeros de estructura más simple, como por ejemplo los glucanos cíclicos de *Agrobacterium tumefaciens*, la incorporación del primer residuo (glucosa), la elongación, y la polimerización son llevadas a cabo por una única proteína, que actúa, además, como molécula aceptora (14). En cambio, en la mayoría de los polisacáridos extracelulares más complejos (heteropolisacáridos) las hexosas activadas forman unidades repetitivas cuyos tamaños varían entre dos y ocho residuos. (7).

Básicamente, la biosíntesis de estas macromoléculas involucra cinco etapas: 1) la **conversión de azúcares simples en donores glicosídicos activados**. Estos precursores son principalmente nucleótido-azúcares difosfato, y raramente monofosfato, cuya síntesis se realiza en el citoplasma; 2) el **ensamblado de la unidad repetitiva**, con formación de un glicolípido intermediario. Se produce por la adición secuencial de los monosacáridos a partir de los precursores, a un lípido isoprenoide mono fosforilado (lip-P) ubicado en la membrana interna; 3) la **adición de sustituyentes**, como acetato, piruvato, succinato, hidroxibutirato y sulfato. El orden en que ocurre esta etapa, con respecto a las anteriores, es variable. En algunos casos se encontró que la sustitución de ciertos grupos es indispensable para que se complete la síntesis de la unidad repetitiva (15), mientras que en otros casos, no son requeridas para el ensamblado final del polímero (16); y por último, 4) la **polimerización** de las subunidades y 5) la **exportación** del polisacárido.

En la última década, se han estudiado en detalle las tres primeras etapas de la biosíntesis de gran cantidad de polisacáridos. Sin embargo, poco se sabe sobre la polimerización y exportación de estas macromoléculas.

1.2 Secreción de polisacáridos bacterianos

La presencia en la envoltura celular de polímeros hidrofílicos, sintetizados en el interior de la célula, indica la existencia de mecanismos de transporte que permiten la exportación de los polisacáridos o bien de sus intermediarios biosintéticos a través de la membrana plasmática. En las bacterias Gram-negativas este transporte presenta un desafío adicional, ya que las moléculas deben atravesar una envoltura celular formada por dos membranas y el espacio comprendido entre ambas (Fig. 2).

La **membrana interna (MI)** o **plasmática** esta compuesta mayoritariamente por tres fosfolípidos, fosfatidiletanolamina (70-80%), fosfatidilglicerol y cardiolipinas, distribuidos por igual en ambas hojas de la membrana. Las proteínas integrales de la MI cumplen funciones de transporte de nutrientes, proteínas y proveen la energía celular a través de la fosforilación oxidativa. Están insertas en la membrana a través de uno o más segmentos hidrofóbicos con estructura de hélices- α conocidos como segmentos transmembrana (STM) (17).

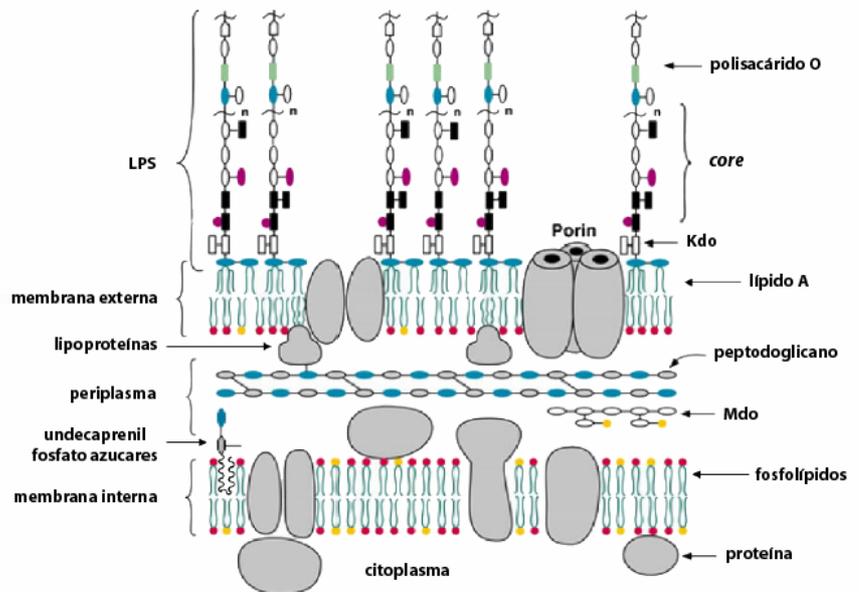


Fig. 2 Modelo de las membranas interna y externa de *E. coli* K-12. (modificado de (1)).

Por el contrario, la **membrana externa (ME)** es una bicapa asimétrica en la cual la hoja interna tiene una composición similar a la MI mientras que la hoja externa esta compuesta mayoritariamente por lípido A, ancla hidrofóbica de los lipopolisacáridos (ver sección 1.2.3). Debido a la gran cantidad de grupos fosfato y carboxilo expuestos al medio, a pH neutro esta cara tiene una densidad de cargas negativas por unidad de superficie muy alta, mayor que cualquier fosfolípido (18). La ME es impermeable a moléculas mayores de 650 Da y sirve como protección a las agresiones ambientales (19). Las proteínas representan el 50% de la masa de la ME y pueden ser integrales o lipoproteínas. Estas últimas están ancladas a la membrana a través de un lípido unido en el extremo N-terminal (20) y en algunos casos se unen covalentemente al peptidoglicano por su extremo C-terminal. Las proteínas integrales, en cambio, utilizan hojas- β antiparalelas para atravesar la bicapa, de forma que originan una estructura cilíndrica (barril- β) que expone los residuos hidrofóbicos hacia los lípidos (17).

El **espacio periplásmico (EP)**, de entre 7 y 25 nm de ancho, contiene una matriz tipo gel, el periplasma, compuesta por una capa fina de peptidoglicano y proteínas de unión a distintos tipos de moléculas (aa, azúcares, vitaminas, iones). Sirve además como reservorio de componentes asociados a estructuras superficiales (por ej. pilinas) y de factores de virulencia (18). Su composición varía permanentemente, siendo un reflejo del estado metabólico celular y del medio ambiente.

En esta tesis definiremos como secreción a cualquier proceso por el cual una macromolécula atraviesa la ME y como exportación al proceso por el cual pasa del citoplasma al medio extracelular.

1.2.1 Clasificación de los sistemas de transporte

La mayoría de los procesos de transporte a través de membranas están mediados por proteínas integrales y periféricas. Por definición, un transportador es una proteína o complejo proteico que cataliza una reacción vectorial, independiente si ello involucra una reacción química o transferencia electrónica (21). A cada uno de estos complejos proteicos se los denomina indistintamente sistemas transportadores, **transportadores**, sistemas de permeasas o permeasas. (22)

La utilización de energía metabólica definió la primera clasificación que se hizo de los transportadores. Se denominó difusión facilitada al proceso que no está acoplado a gasto de energía y que comprende dos categorías de transportadores, canales o poros y *carriers*. Por el contrario, el proceso asociado a gasto energético se lo denominó transporte activo. Existen distintos tipos de fuentes de energía acopladas a este transporte, que incluyen reacciones químicas en las que están involucradas hidrólisis de uniones fosfato, descarboxilaciones, transferencia de grupos metilo o flujo electrónico. Otras provienen de la absorción de luz y el flujo de iones en gradientes electroquímicos, como la fuerza protón-motriz (FPM). Dentro de los transportadores activos existe una segunda clasificación dependiendo si catalizan el pasaje de una única especie molecular (*uniport*) o varias, y en tal caso, dependerá si el movimiento de estas especies se hace en la misma dirección (*sinport*) o en dirección contraria (*antiport*) (23).

Tabla 2 Clases y subclases de transportadores del sistema TC^a

1. Canales y poros
1.A Canales tipo α
1.B Porinas barriles β
1.C Toxinas formadoras de poros
1.D Canales no sintetizados vía ribosomas
1.E Holinas
2. Transportadores accionados por potencial electroquímico
2.A Porters
2.B Porters no sintetizados vía ribosomas
2.C Accionados por gradiente de iones
3. Transportadores activos primarios
3.A Accionados por hidrólisis de uniones difosfato
3.B Accionados por descarboxilación
3.C Accionados por transferencia de metilos
3.D Accionados por oxidoreducción
3.E Accionados por absorción de luz
4. Grupo de translocadores
4.A Accionados por transferencia de grupos fosfato
5. Transportadores de electrones
5.A Transportador de membrana 2
5.B Transportador de membrana 1
8. Factores accesorios
8.A Proteínas auxiliares de transporte
9. Sistemas semicaracterizados
9.A Sin función bioquímica conocida
9.B Posibles transportadores
9.C Identificados solo funcionalmente

^a Una descripción más detallada del sistema se encuentra en la página web <http://www-biology.ucsd.edu/msaier/transport/>. Las categorías 6 y 7 permanecen sin asignar en espera de nuevos tipos de transportadores.

Esta primera clasificación se basó únicamente en la función de los transportadores sin tener en cuenta los mecanismos de acción, la secuencia de aminoácidos o la estructura tridimensional de las proteínas involucradas, así como tampoco su historia evolutiva.

Con el avance en las áreas de la genómica y proteómica, se describió un gran número de transportadores lo cual hizo necesario uniformar la terminología empleada en el área para permitir, no sólo el reconocimiento de potenciales transportadores, sino también la incorporación de nuevos tipos de transportadores. En 1999 la comisión de transporte de la *International Union of Biochemistry and*

Molecular Biology (IUBMB) diseñó un nuevo sistema de clasificación, el **sistema de Clasificación de Transportadores (TC)** (22). Este sistema, basado en la función y en análisis filogenéticos, refleja tanto características funcionales como estructurales y mecánicas de los diferentes grupos (Tabla 2) y será utilizado a lo largo de esta tesis.

1.2.2 Sistemas exportadores de polisacáridos en bacterias

Los genes conocidos relacionados con sistemas de exportación de polisacáridos extracelulares están agrupados en operones que pueden incluir o no a los genes responsables de la biosíntesis de los polisacáridos (Fig. 3). Sobre la base de la homología entre los distintos operones, se han identificado 3 familias de proteínas relacionadas al transporte de polisacáridos extracelulares, sin embargo, muy pocas de estas proteínas han sido caracterizadas bioquímica y funcionalmente.

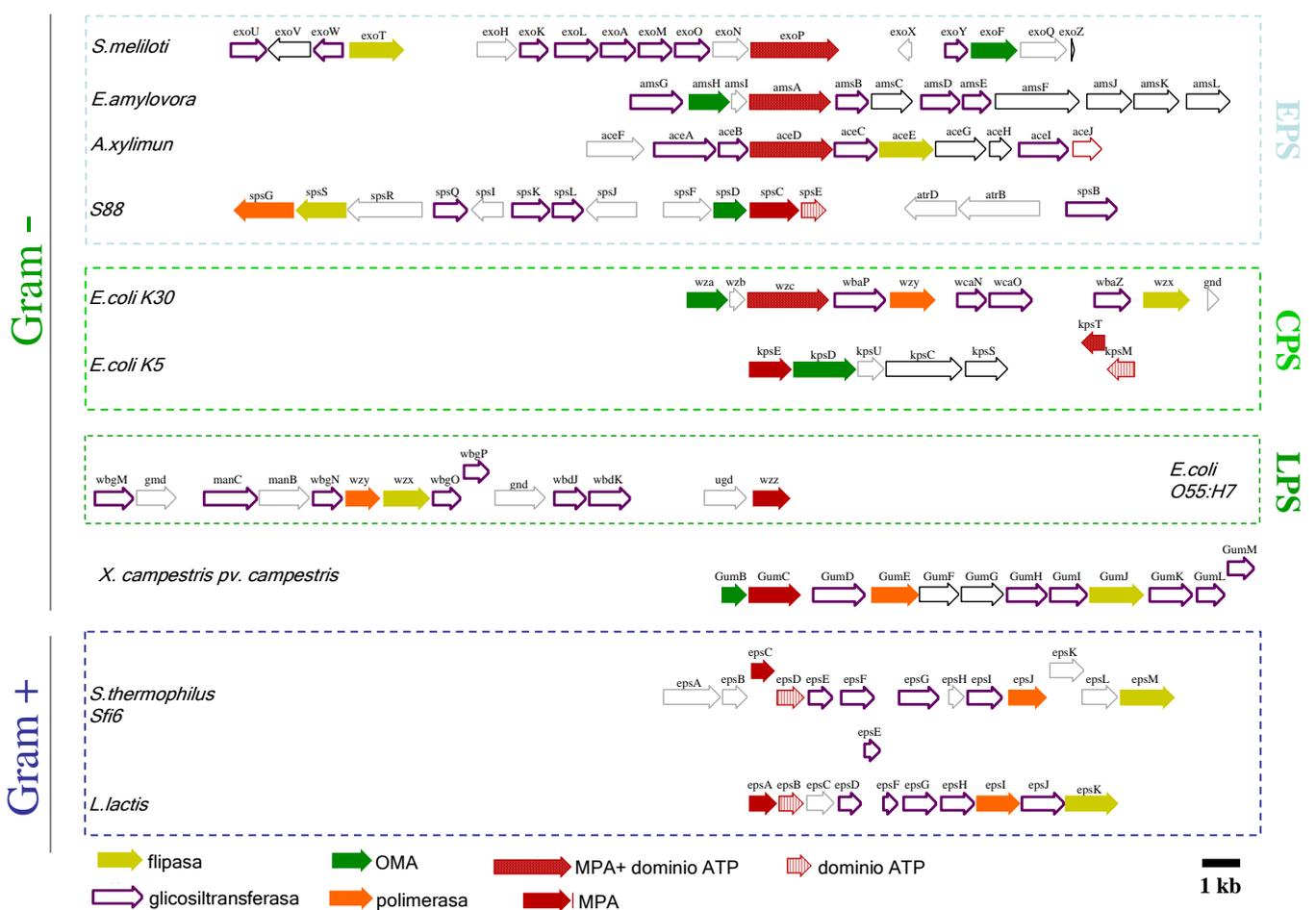


Fig. 3 Mapa genético de diferentes regiones involucradas en la biosíntesis y transporte de exopolisacáridos en bacterias gram-positivas y negativas. Se muestran la organización de los genes responsables de la síntesis del succinoglicano en *S. meliloti* (región *exo*), del amilovorano en *E. amylovora* (región *ams*), del acetano de *A. xylinum* (región *ace*), esfingano en *Sphingomonas* S88 (región *sps*), del antígeno K30 y K5 en *E. coli* (regiones *wz* y *kps*), del antígeno O en *E. coli* O55:H7 (regiones *wbg* y *wz*), del xantano en *X. campestris* (región *gum*), del exopolisacárido en *S. thermophilus* Sfi6 (región *eps*) y del exopolisacárido en *L. lactis* NIZO B40 (región *eps*).
 EPS= exopolisacáridos; CPS= polisacáridos capsulares; LPS= lipopolisacáridos.

Familia de proteínas auxiliares de membrana externa (OMA)

Estas proteínas sólo se encuentran en bacterias Gram-negativas. Están involucradas en la síntesis de CPS y EPS y solo en algunos casos, como CtrA de *N. meningitidis*, KpsD y Wza de *E. coli*, se ha podido determinar su participación directa en el transporte (2426). La mayoría de estas proteínas se localiza preferentemente en la membrana externa. Cada proteína OMA exhibe un segmento hidrofóbico N-terminal a continuación del cual, en la mayoría de los miembros de esta familia, está presente una secuencia similar a la consenso para el corte de la Peptidasa señal II (PSII) (27). El sitio de corte contiene una cisteína conservada a la que se une covalentemente un lípido originando una lipoproteína. El resto de la proteína presenta regiones hidrofóbicas cortas que se correlacionan con la estructura secundaria de hojas beta típica de las proteínas de ME.

Familia de proteínas auxiliares de periplasma y membrana citoplasmática (MPA)

Cada operón que codifica una proteína OMA también codifica para una proteína auxiliar adicional. Las proteínas MPA poseen una topología característica que consiste en dos segmentos transmembrana separados por un gran dominio hidrofílico. Morona y col. denominan a este grupo de proteínas **co-polimerasas de polisacáridos (PCP)**, en función del rol que cumplen en la polimerización y/o determinación del largo de cadena de los polisacáridos que sintetizan (28).

Estas proteínas auxiliares pueden dividirse en dos subfamilias diferentes las cuales no presentan homología de secuencia significativa. La subfamilia **MPA2** es exclusiva de bacterias Gram-negativas (29). Sus miembros presentan cierta homología entre sí, en particular una hélice- α muy anfipática. Algunos datos experimentales relacionan a estas proteínas con el proceso de transporte, como por ejemplo KpsE de *E. coli* y CtrB de *N. meningitidis* (30; 25). Estudios topológicos realizados por fusiones a β -lactamasa o fosfatasa alcalina para ambas proteínas revelaron que los extremos N- y C-terminal se encuentran localizados en el citoplasma mientras que el dominio central se encuentra en el periplasma. Las estructuras secundarias de estas proteínas exhiben un alto contenido de hélices- α , en particular los 50 residuos centrales del dominio periplasmático.

La subfamilia **MPA1** incluye miembros tanto de bacterias Gram-negativas como positivas. ExoP de *S. meliloti* y Wzc de *E. coli* son algunas de las pocas proteínas de las cuales se tienen datos experimentales relacionados con el transporte (31, 32). En su topología, son similares a la subfamilia MPA2 con el agregado de un dominio citoplasmático el cual incluye un motivo de unión a ATP, denominado C. Poseen un extremo N-terminal corto e hidrofílico seguido por un STM, a continuación un dominio hidrofílico periplasmático de 400 aa aproximadamente, un segundo STM y por último un segmento C-terminal citoplasmático de 200-250 aa. Este dominio posee actividad de tirosina quinasa, lo que confiere a estas proteínas una función regulatoria del proceso de exportación (32). En bacterias Gram-positivas este dominio C-terminal es más pequeño, de 100 a 130 aa, y se encuentra codificado por una proteína diferente. Por esta razón se designa a las proteínas de bacterias Gram-negativas MPA1-C y a las de Gram-positivas MPA1+C. La excepción a esta regla la presentan el par SpsC/SpsE de *Sphingomonas* S88, bacteria Gram-negativa, en la cual la proteína MPA está desdoblada en dos polipéptidos diferentes (33).

Transportadores de membrana citoplasmática

Los operones secuenciados hasta el momento que codifican tanto una proteína OMA y una MPA, también codifican un posible transportador de membrana citoplasmática. Estas proteínas pueden dividirse en dos grupos. El más grande corresponde a la familia de **proteínas ABC-2**, también denominadas ATPasas de tráfico o transportadores ABC (34). Pertenecen a la superfamilia de proteínas ABC involucradas tanto en la incorporación como en la secreción de moléculas pequeñas y macromoléculas (35). Estos procesos obtienen la energía necesaria para el transporte mediante la hidrólisis de ATP. Los sistemas ABC-2 descritos están compuestos por cuatro subunidades: dos dominios integrales de membrana, cada uno de los cuales atraviesa la membrana seis veces y dos dominios que contienen el motivo de unión a ATP. Estos últimos acoplan la hidrólisis de ATP con el proceso de exportación. Un ejemplo de este sistema es el par KpsMT de *E. coli* K1 (36; 37).

El otro grupo es novel y representa a los **transportadores específicos de polisacáridos (PST)** cuyos miembros poseen 12 pasos transmembrana con sus extremos N- y C-terminal localizados en el citoplasma. Según su topología se pueden definir dos subfamilias diferentes. La subfamilia PST(1) se caracteriza por tener un dominio citoplasmático de 80 aa aproximadamente entre los STM6 y STM7 y sus miembros participan del transporte de CPS y EPS, como por ej. ExoT de *S. meliloti* (38). Por el contrario, los miembros de la subfamilia PST(2), carecen de este dominio y están involucrados en el transporte de LPS. Existe una región de alta homología entre ambas subfamilias, que comprende la región entre los STM1 y STM2, la cual permite diferenciar a las proteínas filogenéticamente según el tipo de polisacárido que transportan (29).

A manera de resumen podemos decir entonces que cada operón que codifica para una proteína OMA también tiene una proteína MPA1 o MPA2, pero no ambas. Al par OMA-MPA2, está asociado el sistema de dos componentes ABC-2. Mientras que en la mayoría de los casos, al par OMA-MPA1 o a MPA1 sola, está asociada una proteína PST (Fig. 4 y Tabla 3).

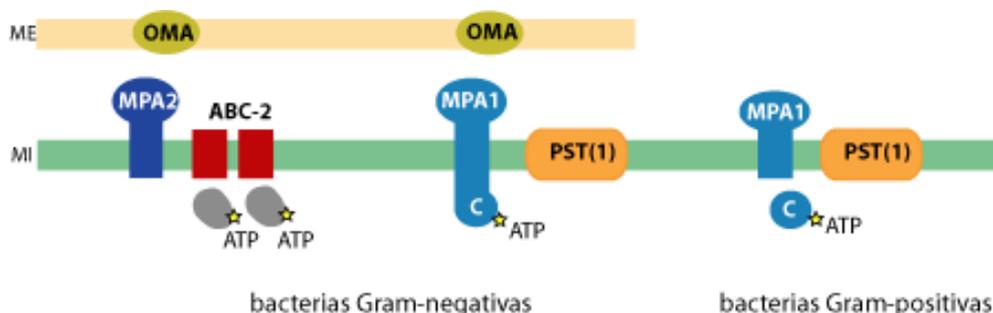


Fig. 4 Representación de los tres sistemas de exportación de exopolisacáridos bacterianos que utilizan proteínas auxiliares. *OMA*: de proteínas auxiliares de membrana externa, *MPA*: proteínas auxiliares de periplasma y membrana citoplasmática. *C*: dominio citoplasmático de la familia MPA1 que contiene el sitio de unión a ATP, *PST*: transportadores de membrana citoplasmática, *MI*: membrana interna, *ME*: membrana externa.

Tabla 3 Composición de los sistemas de exportación de polisacáridos bacterianos (modificado de (29))

Grupo	Polisacárido	Proteínas auxiliares			Proteína de membrana citoplasmática	Fuente de energía
		OMA	MPA	Wzz		
Gram-negativas	CPS I y EPS	OMA	MPA1-C	--	PST(1)	ATP/FPM?
	CPS II	OMA	MPA2	--	ABC-2	ATP
	LPS	nd.	--	Wzz	PST(2)	FPM?
	LPS y LOS	--	--		ABC-2	ATP
Gram-positivas	CPS	--	MPA1 + C	--	PST(1)	ATP
	TCA y drogas	OMF	--	--	ABC-2	ATP

FPM, fuerza protón motriz;
Wzz: ver página 10

1.2.3 Lipopolisacáridos

Actualmente los sistemas de transporte de LPS constituyen los modelos más conocidos de exportación de polisacáridos extracelulares, ya que son los únicos en los cuales se identificaron la mayoría de los genes biosintéticos, así como la función de sus correspondientes productos proteicos. Las unidades estructurales que componen a los LPS son dos, el lípido A unido a un grupo de oligosacáridos denominado *core*, y una cadena de polisacárido conocida como antígeno ó polisacárido O (1). Ambas unidades se sintetizan por separado en el citoplasma y son exportadas a la cara periplasmática de la MI donde se ensamblan. El lípido A-*core* atraviesa la membrana por medio de la proteína MsbA (Fig. 5E) mientras que existen tres vías diferentes para la síntesis del polisacárido O y su posterior transporte. En todas ellas se utiliza un lípido, poliprenil fosfato, como aceptor para iniciar la síntesis de la subunidad de antígeno O que luego será transportada al periplasma. La reacción de iniciación (Fig. 5A) está muy conservada e involucra la transferencia de un residuo glicosídico 1-P al aceptor, siendo este residuo galactosa 1-fosfato o galactosamina 1-fosfato. (39; 40; 41; 42).

Síntesis del polisacárido O

Como ya se dijo, luego de la reacción de iniciación, se conocen tres vías diferentes para la síntesis del polisacárido O:

a. Polimerasa (Wzy) dependiente

Los grupos más representativos de esta categoría son los polisacáridos O de *S. enterica* serogrupo B (*typhimurium*) y E1 (*anatum*). Aparentemente esta vía es exclusiva para la síntesis de heteropolisacáridos, la mayoría con ramificaciones laterales. Las unidades de antígeno O se sintetizan a partir de hexosas activadas (ver sección 1.1.3). El proceso de exportación de estas subunidades (Fig. 5B) requiere de una proteína homóloga a Wzx, la cual transporta el glicolípido a la cara periplasmática de la MI (43). A estos transportadores se los conocen como **flipasas** (1) y pertenecen a la familia de transportadores PST. Las proteínas descritas de esta familia son muy hidrofóbicas,

poseen 12 potenciales pasos transmembrana y baja homología a nivel de secuencia primaria. Sin embargo comparten similitudes estructurales con la familia de permeasas bacterianas. En varios casos se ha visto que las funciones de los miembros de esta familia son intercambiables, lo cual indicaría que Wzx opera independientemente de la unidad oligosacárida unida al poliprenil fosfato (44), siendo solo importante el primer azúcar de cada unidad (45).

Una vez que las subunidades de antígeno O se encuentran en la cara periplasmática de la MI son polimerizadas para formar el polisacárido O. Esta reacción involucra la transferencia del polímero naciente al extremo no reductor de una nueva subunidad de antígeno O (Fig. 5B). La polimerización es catalizada por la **polimerasa** del polisacárido O, proteínas homólogas a Wzy (46). Estas son descritas como proteínas integrales con 11-13 pasos transmembrana y con una muy baja similitud en la secuencia primaria entre los miembros de la familia (47). A diferencia de Wzx, las proteínas Wzy reconocen unidades de antígeno O específicas o bien tipos de uniones entre las subunidades (48). La ausencia de dominios conservados tanto en la familia de Wzx como Wzy, hace difícil la identificación de los residuos involucrados en la unión al sustrato y la catálisis, y en consecuencia de los mecanismos involucrados en cada paso.

El último componente de esta vía es Wzz. Esta proteína genera, según la cepa, una distribución modal del largo de cadena del polisacárido O. Bastin y col. concluyeron que Wzz es la responsable de que la polimerasa, la ligasa o bien ambas tengan una preferencia particular por un largo de cadena determinado (49; 50). Su función se asemejaría a un **reloj molecular** el cual modula la actividad de la polimerasa entre dos estados, la elongación o bien la transferencia del polisacárido O al lípido *A-core* (final de la polimerización). Por esta razón también recibe el nombre de co-polimerasa (28). Los integrantes de la familia Wzz tienen regiones conservadas en su secuencia primaria al igual que una estructura secundaria similar. Están localizadas en la MI y poseen dos hélices transmembrana separadas por un gran dominio periplasmático con una estructura *coiled-coil* (28). Esta estructura permitiría la interacción con otras proteínas, por ej. Wzy y WaaL, aunque hasta el momento no se conocen evidencias experimentales que demuestren la existencia de estos complejos.

Por último, luego de cada ciclo de polimerización el policaprenol fosfato debe ser reciclado a su forma activa (monofosforilada) para iniciar una nueva ronda de biosíntesis.

b. Transportador ABC dependiente

Esta vía es utilizada para la síntesis de polisacáridos lineales (sin ramificaciones laterales) como por ejemplo los polímeros de manosa de *E. coli* O8 y O9 (51) o los D-galactanos de *K. pneumoniae* (52).

En este caso la cadena de polisacárido crece por la adición sucesiva de residuos glicosídicos al extremo no reductor de la cadena unida al poliprenol fosfato (Fig. 5C) (53). No se necesita una polimerasa específica y la polimerización es finalizada en la cara citoplasmática de la MI.

Solo se utiliza un aceptor poliprenol fosfato por polímero de modo que su reciclado no resulta un factor limitante del proceso.

Para la ligación al lípido *A-core*, el polisacárido debe ser transportado al periplasma y en este paso interviene un transportador ABC. En un principio se identificaron por su homología con los transportadores de la subfamilia ABC-2 (54). Estos constan de una proteína integral con seis pasos

transmembrana, Wzm y una proteína hidrofílica asociada, Wzt, la cual contiene el motivo de

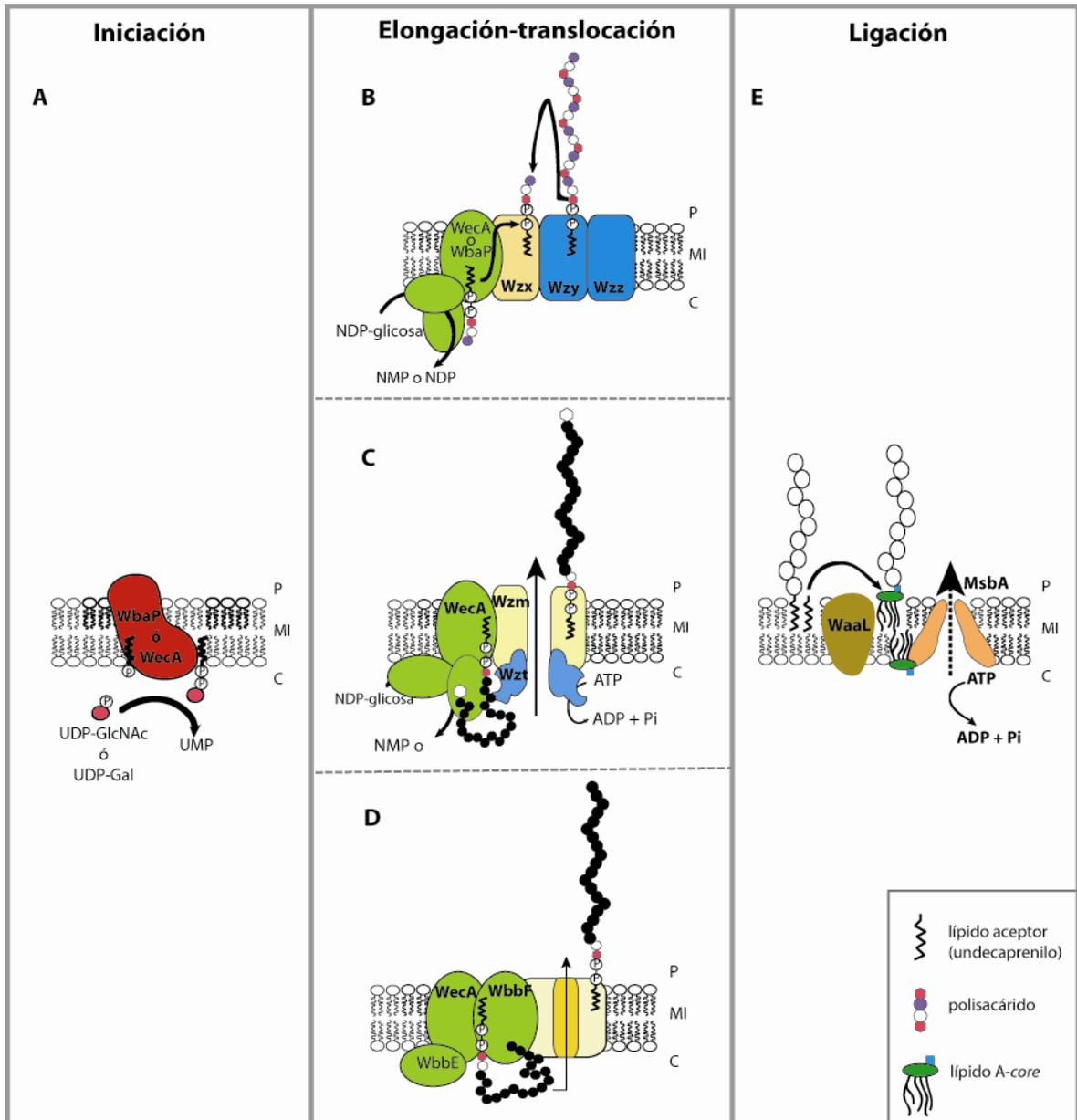


Fig. 5 Etapas involucradas en la síntesis de los lipopolisacáridos. Reacción de iniciación (A), la enzima undecaprenilfosfato glicosil-1-P transferasa (WbaP ó WecA) transfiere el residuo glicosídico (Gal-1-P ó GlcNAc-1-P) al lípido-P aceptor. Síntesis y polimerización del polisacárido O por la vía Wzy-dependiente (B), por la vía ABC-dependiente. (C) y por la vía sintetasadependiente (D). Las glicosiltransferasas involucradas se muestran en verde, la proteína transportadora en amarillo y las proteínas involucradas en la polimerización en azul. El hexágono blanco representa al residuo de terminación. Ensamblado del LPS (E) la ligasa WaaL transfiere el polisacárido O al lípido A-core, el cual fue transportado mediante la proteína MsbA. P, periplasma; MI, membrana interna; C, citoplasma. (adaptado de (1))

unión a ATP o caja Walker. No existen datos estructurales disponibles por lo que poco se conoce sobre la organización de estos transportadores o sobre su modo de acción. La mayor parte de los datos y modelos ha sido inferida a partir de sistemas similares, como por ej. el sistema Sec de secreción de proteínas (55) o el involucrado en la síntesis de polisacáridos capsulares de tipo II de *E.*

coli (ver sección 1.2.4). Se especula, que al igual que en este último, la polimerización y exportación son eventos coordinados. El transporte estaría mediado por la hidrólisis de ATP que llevaría a la inserción de Wzt en la membrana mediante su interacción con Wzm. Por una serie de eventos de inserción-desinserción, el polímero sería introducido en el canal y finalmente atravesaría la membrana (1). Esta vía no presenta una proteína homóloga a Wzz, aunque estos LPS tienen un largo de cadena específico (56). ¿Cómo se regula entonces el largo de cadena? Se encontraron en el extremo terminal no reductor de la cadena nuevos tipos de residuos glicosídicos (como 3-*O*-metilmanosa, α -KDO) y se especula que su incorporación podría interrumpir la elongación y promover la exportación del polisacárido (52; 57).

c. Sintetasa dependiente

El único ejemplo de polisacárido O sintetizado por esta vía es la poli-N-acetilmanosamina de *S. enterica* serovar Borreze (antígeno O:54) (58).

Las sintetetasas son glicosiltransferasas procesivas capaces de sintetizar el polímero como una única cadena (Fig. 5D). Pertenecen a esta familia las enzimas responsables de la síntesis de celulosa y quitina. Los dos primeros pasos se asemejan a los de la vía ABC dependiente. Las sintetetasas son proteínas integrales de membrana con topologías similares y se supone que llevan a cabo la reacción de polimerización (en forma vectorial) en simultáneo con el pasaje del polisacárido a través de la membrana (59). Del mecanismo de transporte y de la determinación del largo de la cadena nada se conoce.

Ensamblado

Independientemente de la vía de síntesis que se utilice, el ensamblado del polisacárido al lípido *A-core* es realizado por la misma reacción de ligación. La enzima/s responsables, denominadas **ligasas** (60), forman enlaces glicosídicos entre el donador, un oligosacárido-undecaprenil pirofosfato y el aceptor, lípido *A-core* (Fig. 5E). Según la vía de síntesis el donador diferirá en la composición del oligosacárido unido al poliprenol pirofosfato. Esta falta de discriminación entre los donadores sugiere que la enzima reconocería la porción lipídica del donador más que la porción sacarídica. Aunque el mecanismo de esta reacción se desconoce, la proteína **WaaL** es necesaria para este proceso. La comparación de su estructura primaria con otras proteínas no da ninguna pista sobre su función mientras que los análisis de predicción de estructura indican que se trataría de una proteína integral de membrana con 8 o más pasos transmembrana (61). Se especula estaría formando parte de un complejo con los demás componentes del sistema de exportación (62).

Exportación a la superficie celular

Este paso es uno de los más enigmáticos del proceso. ¿Cómo hacen los LPS una vez ensamblados en la membrana interna para atravesar el espacio periplásmico y la membrana externa? El transporte no discrimina entre las distintas composiciones de los polisacáridos O ya que aparentemente todos los tipos de LPS se translocan con la misma eficiencia (1). Un sistema de transporte especial debe mediar este paso. Los *loci* involucrados en la síntesis de CPS y EPS codifican proteínas relacionadas con la secreción, sin embargo no han sido descritas proteínas

homólogas en los *loci* que intervienen en la síntesis de LPS. Es probable entonces que intervengan sistemas de translocación que cumplen funciones generales de ensamblado de la membrana externa, como el sistema Tol (63).

1.2.4 Polisacáridos Capsulares

Están presentes en diversas bacterias, como *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* (64), *Klebsiella pneumoniae* (65), y *Erwinia amylovora* entre otros. Sin embargo los más estudiados son los llamados antígenos K de *E. coli* (64), de los cuales se han descrito cerca de 80 tipos de polisacáridos diferentes. De acuerdo con criterios biosintéticos y genéticos se los han clasificado en 4 grandes grupos (Tabla 4). En los grupos 1 y 4 se encuentran dos tipos diferentes de antígenos K, los K_{LPS} de bajo peso molecular unidos a un lípido *A-core* y los K_{CPS} , de alto peso molecular y que constituyen la cápsula propiamente dicha.

Tabla 4 Clasificación de los polisacáridos capsulares de *E. coli* (adaptado de (68))

	Grupo			
	1	2	3	4
Aceptor final	lípido <i>A-core</i> en K_{LPS} ; desconocido para K_{CPS}	α -glicerofosfato	$\zeta\alpha$ -glicerofosfato?	lípido <i>A-core</i> en K_{LPS} ; desconocido para K_{CPS}
Dirección de crecimiento del polisacárido	extremo reductor	extremo no reductor	extremo no reductor	extremo reductor
Transportador de MI	Wzx (PST)	ABC-2	ABC-2	Wzx (PST)
Sistema de polimerización	dependiente de Wzy	procesivo	procesivo	dependiente de Wzy
Sistema de secreción	Wza, Wzc	KpsD, KpsE (ζ KpsF?)	KpsD, ζ KpsE?	desconocido
Locus	<i>cps</i>	<i>kps</i>	<i>kps</i>	<i>rfb</i>
Sistema modelo	serotipo K30	serotipo K1, K5	serotipo K10, K54	serotipo K40, O111
Similar a	<i>Klebsiella</i> , <i>Erwinia</i>	<i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i>	<i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i>	varios géneros

Las vías de ensamblado y de exportación para los K_{LPS} son casi idénticas a las descritas en la sección 1.2.3 para los LPS (*wzy*-dependientes) y por lo tanto no los tendremos en cuenta en las siguientes secciones.

Síntesis y exportación del polisacárido

Se han descrito distintas vías de síntesis de polisacáridos capsulares, pero todas utilizan nucleótidos azucres como precursores citoplasmáticos y finalizan con el ensamblado del polímero en la cara periplasmática de la MI. Estas vías son esencialmente las mismas que para los LPS.

a. Polimerasa (Wzy) dependiente: grupos 1 y 4

Los antígenos K de los grupos 1 y 4 constituyen heteropolímeros de alto peso molecular (100 kDa o más), los cuales poseen una baja densidad de carga.

La síntesis de la subunidad de antígeno K involucra a un lípido poliprenol fosfato como aceptor y la actividad secuencial de distintas glicosiltransferasas. Luego el glicolípido será transportado hacia la cara periplasmática mediante la proteína Wzx (flipasa) donde se lleva a cabo la polimerización catalizada por la polimerasa Wzy. De esta forma el polímero crece por su extremo reductor una subunidad a la vez. (Fig. 6A)

Este mecanismo ha sido confirmado para los polímeros prototipo del grupo 1 (serotipo K30) y del grupo 4 (serotipo k40) (66; 67). La única diferencia entre ambos grupos está dada por la proteína involucrada en la reacción de iniciación. La síntesis del grupo 1 requiere de WbaP (que transfiere hexosas 1-P), mientras que en la síntesis del grupo 4 participa WecA (que transfiere GlcNAc 1-P o GalNAc 1-P).

El largo de cadena de los polisacáridos capsulares no está determinado por una proteína Wzz como en los LPS. Sin embargo un miembro de la familia MPA1, Wzc, con actividad tirosina autoquinasa, es indispensable para la exportación del CPS. La regulación del estado fosforilado de esta proteína depende de la actividad tirosina fosfatasa de la proteína Wzb (32).

En el ensamblado de los CPS están involucradas dos proteínas de ME, Wza, lipoproteína de la familia OMA la cual forma octámeros en la membrana y favorece la secreción del polímero (69; 70) y Wzi, proteína monomérica aparentemente involucrada en la asociación de los CPS a la superficie celular luego que son secretados (71).

b. Transportador ABC dependiente: grupos 2 y 3

La biosíntesis de los CPS del grupo 2 de *E. coli* es la que se ha estudiado en mayor detalle, en particular la de los polisacáridos K1 y K5 (68). Pueden ser homo o heteropolímeros, poseen una masa molecular que no supera los 50 kDa y una mayor densidad de carga que los de los grupos 1 y 4. La síntesis de estos CPS es llevada a cabo por un complejo hetero-oligomérico que se encuentra en la cara citoplasmática de la MI (Fig. 6B). En forma secuencial varias glicosiltransferasas elongan el

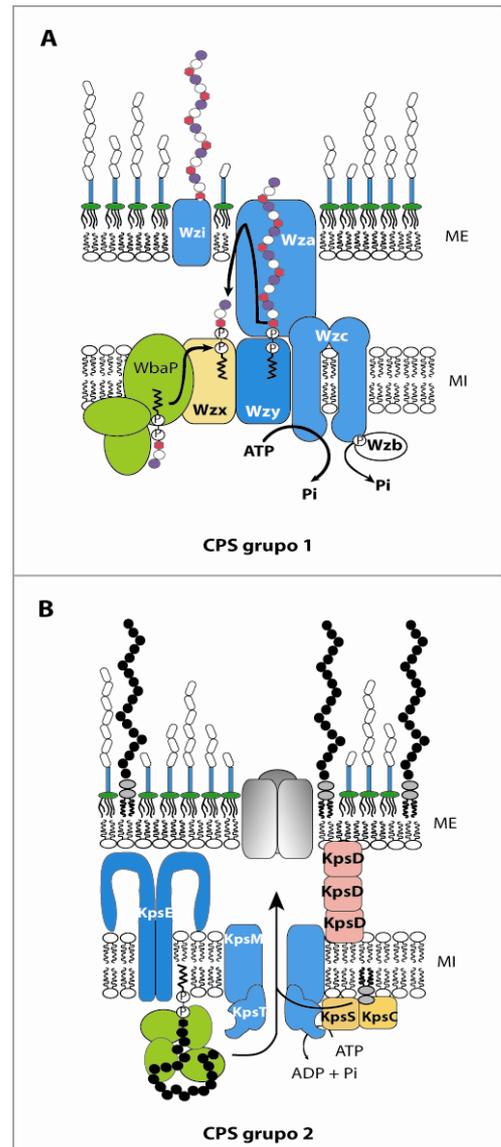


Fig. 6 Modelos de ensamblado de CPS en *E. coli*. A) CPS grupo 1 (serotipo K30) y B) CPS grupo 2 (serotipo K5).

polímero por su extremo no reductor (72). El sistema de exportación es común a todos los polisacáridos de este grupo, independientemente de la composición particular de cada uno. El polisacárido naciente atraviesa la MI por medio de un transportador ABC-2 el cual está compuesto por las proteínas KpsM (componente transmembrana) y KpsT (ATPasa) (35). Durante este proceso, las proteínas KpsC y KpsS adicionan al extremo reductor del polisacárido un grupo fosfatidil-KDO. Esta sustitución se supone permite la entrada al sistema de exportación (64). Para completar la exportación se necesitan dos proteínas auxiliares. KpsE pertenece a la familia MPA2, aunque presenta una topología peculiar (73). Está anclada a la membrana mediante un solo STM en su extremo N-terminal. El extremo C-terminal se encuentra en el periplasma e interacciona con la membrana sin atravesarla. El largo dominio periplasmático permite la dimerización de esta proteína (25). KpsD, presenta cierta homología con miembros de la familia OMA, sin embargo se localiza tanto en ME como periplasma y MI (25). Su localización subcelular depende de la presencia de KpsE, Lpp y el polímero.

Aparentemente no existe un componente específico del sistema que regule el largo de cadena del polímero. De la misma forma que en los LPS (ABC-2 dependientes), el largo de la cadena resultaría de la competencia entre los procesos de extensión y transporte (o sea, terminación). Esto dependería de la estequiometría entre los transportadores ABC-2 y las proteínas de elongación del polímero, y por lo tanto de la expresión diferencial de alguno de los genes involucrados (68).

1.2.5 Exopolisacáridos

Los polisacáridos limosos tienen la característica de ser secretados al exterior de la célula y no tener ningún tipo de ancla covalente a la envoltura celular. Como se mencionó anteriormente, los EPS pueden dividirse de acuerdo a su estructura química en homo y heteropolisacáridos, y pueden presentar varios sustituyentes no hidrocarbonados, como acetato, piruvato, hidroxibutirato y succinato (7) entre otros. Además, la composición y enlaces entre los monosacáridos definen tres clases de estructura polimérica: i) lineal como la celulosa, ii) ramificada, y iii) cíclica como algunos glucanos. En cuanto a su tamaño, las masas moleculares oscilan entre 2,5 kDa para los glucanos cíclicos de los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium* (que representan a los EPS más pequeños), hasta 10^6 - 10^7 Da, para los EPS de mayor peso molecular (10).

Debido a la gran diversidad de EPS nos referiremos en esta sección a los polímeros de alto peso molecular sintetizados con la formación previa de unidades repetitivas (ver sección 1.1.3). Algunos de estos polisacáridos poseen una gran importancia médica, como por ejemplo el alginato de *P. aeruginosa*, principal agente causal de trastornos pulmonares en pacientes con fibrosis quística (74) y también varias aplicaciones industriales, como por ejemplo el gelano de *Sphingomonas* sp. y el xantano de *X. campestris* (ver Tabla 1).

Al contrario de lo que ocurre con LPS y CPS, poco se conoce sobre la biosíntesis y exportación de este grupo de polisacáridos siendo el sistema de transporte del succinoglicano (EPS 1) de *Sinorhizobium meliloti* el que se conoce en mayor detalle. Este polímero es requerido por la bacteria para invadir nódulos de las raíces de *Medicago sativa* (7). El succinoglicano está compuesto por unidades repetitivas de ocho azúcares que consisten en una galactosa y siete glucosas, y pueden estar modificadas con grupos acetilo, succinilo, y cetil piruvato.

Se sintetizan dos formas del polisacárido, uno de baja masa molecular (LMW) y otro de alta masa molecular (HMW). El succinoglicano-LMW está compuesto por monómeros, dímeros y trímeros de la unidad repetitiva siendo el trímero la especie simbióticamente activa. El succinoglicano-HMW varía entre 10^6 y 10^7 Da. Su síntesis se ve influenciada por las condiciones osmóticas del medio de cultivo, de modo que un incremento en la presión osmótica lleva a un aumento de la producción la forma HMW a expensas de la LMW.

En la biosíntesis del succinoglicano participan 21 genes *exo* y *exs* localizados en una región de 30 kb del megaplásmido 2 (pSymB) (75). El grupo de González y col. determinó que las proteínas asociadas a membrana ExoP, ExoQ y ExoT están involucradas en la polimerización y secreción del polisacárido (38). Este sería un sistema polimerasa dependiente similar al descrito para LPS (ver sección 1.2.3). ExoQ es necesaria para la síntesis del succinoglicano-HMW mientras que ExoT lo es para la síntesis del succinoglicano-LMW. Ambas proteínas poseen varios pasos transmembrana y se postula que, por tamaño, topología y cierta homología de secuencia, ExoQ pertenecería a la familia de polimerasas procesivas homólogas a Wzy y ExoT a la familia de proteínas homólogas a Wzx (flipasa) aunque un rol adicional o distinto para esta proteína no puede ser descartado.

ExoP en cambio, afecta la síntesis de ambos tipos de succinoglicano ya que una mutante nula *exoP* solo es capaz de producir el octasacárido precursor. Becker y col. establecieron que se trata de un miembro de la familia MPA1-C con función de tirosina quinasa en el dominio carboxi-terminal (76). La eliminación de este dominio lleva a una disminución drástica de la cantidad total de EPS1 producido junto con un aumento en la relación de succinoglicano-LMW a HMW (31). Mutaciones puntuales en la secuencia rica en prolinas ubicada antes del segundo STM en el dominio amino-terminal tienen las mismas consecuencias (77). Por lo tanto, el dominio citoplasmático no sería esencial para la producción del polisacárido sino que tendría una función regulatoria. En particular, la regulación estaría dada por los niveles y posición de la fosforilación en este dominio (76). El reemplazo del residuo Y505S lleva a una disminución del EPS1-HMW lo que sugiere que ExoP podría regular el grado de polimerización del succinoglicano controlando la actividad polimerasa de otras proteínas, como ExoQ y ExoT.

Por último, en la membrana externa se encontraría ExoF, un miembro de la familia OMA (29).

1.3 Xantano

El xantano o goma xántica, es un exopolisacárido producido por varios patovares del género *Xanthomonas*, bacterias Gram-negativas que pertenecen a la familia *Xanthomonadaceae*, una rama del grupo gamma de las proteobacterias. Este otorga el aspecto mucoso característico de estas colonias y fue descubierto en 1950 por un grupo de investigación del Departamento de Agricultura de USA en el curso de un estudio para la identificación de microorganismos que sintetizaran polisacáridos solubles de interés comercial. Entre otras, se aisló la cepa NRRL B-1459 de *X. campestris* pv. *campestris*, la cual se ha usado desde entonces como modelo para el estudio de la síntesis del xantano (16).

1.3.1 Estructura química y superestructura

El xantano es un heteropolisacárido aniónico formado por unidades repetitivas de cinco azúcares, compuestas por dos D-glucosas, dos D-manosas y un D-ácido glucurónico. (2; 78). Las glucosas, unidas por un enlace β -1,4, forman un esqueleto de celulosa. Están sustituidas en forma alternada, mediante un enlace α -1-3, por cadenas laterales de tres azúcares (Man-(β -1,4)-GlcA-(β -1,2)-Man) (Fig. 7). Ambas manosas pueden estar O-acetiladas en el C6, sin embargo, la mayoría de las manosas externas se encuentran unidas a un grupo cetil piruvato en las posiciones 4 y 6. El grado de sustitución de la cadena lateral es variable, dependiendo de la cepa y las condiciones de cultivo. Esta variabilidad es la que confiere cierta irregularidad a las moléculas de xantano.

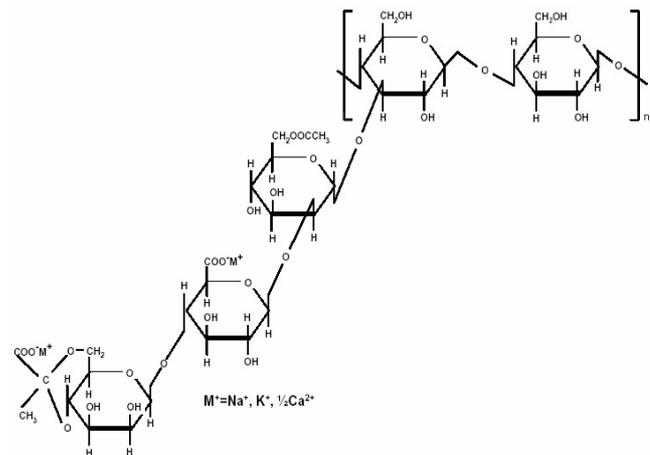


Fig. 7 Estructura química de la unidad repetitiva del xantano (2) modificada por Ielpi y col. (4)

Peso molecular

Según los datos que se encuentran en la literatura, el peso molecular del xantano sería aproximadamente 2×10^6 Da, lo que implica, en promedio, 2000 unidades repetitivas por molécula de polímero (79). Sin embargo, existen reportes en donde el PM sería hasta veinticinco veces mayor (50×10^6 Da) (80). La dificultad que se presenta para determinar en forma precisa el peso molecular del xantano se debe a: i) el alto peso molecular de este polímero, ii) la rigidez que tienen las moléculas y iii) la presencia de agregados intermoleculares (3). Entre las técnicas que se utilizaron para este fin se encuentran GPC-MALLS (cromatografía por filtración en gel combinada con detección por dispersión

de luz en ángulos múltiples), AFFF-MALLS (fraccionamiento en campo de flujo asimétrico combinada con detección por dispersión de luz en ángulos múltiples) y microscopía electrónica. Algunas de estas dificultades fueron superadas por una técnica relativamente nueva, la microscopía de fuerza atómica (AFM), que permite la visualización de la superficie de la muestra con una resolución cercana a la escala atómica (81).

Estructura secundaria

Estudios de difracción de rayos-X indican que el xantano adopta una conformación de hélice (82) (Fig. 8A). Por otro lado, estudios en solución sugieren que las moléculas de xantano tienen una estructura tipo varilla con cierto grado de flexibilidad (83). Sobre esta base se han propuesto varios modelos estructurales. Sin embargo la mayoría de los estudios apoyan el modelo en el cual las moléculas formarían una doble hélice cuyas cadenas son antiparalelas (84; 85) (Fig. 8B y C). La doble hélice está estabilizada por uniones no covalentes, como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y efectos estéricos. Hasta el momento, ninguno de los estudios realizados permitió dilucidar si las hebras se encuentran entrelazadas o solo en contacto una con otra (86).

La estructura secundaria del xantano depende de las condiciones en las cuales se lleva a cabo la determinación. En soluciones acuosas, las moléculas de xantano sufren una transición conformacional en función de los cambios en la temperatura y fuerza iónica del medio (86). Esta transición depende del grado de ionización de los grupos carboxilo y el contenido de grupos acetato de las moléculas del xantano. En soluciones con baja fuerza iónica o a altas temperaturas, las moléculas de xantano adoptan una conformación desordenada ya que las cadenas laterales se repelen entre sí. El agregado de pequeñas cantidades de electrolitos reduce las repulsiones electrostáticas entre las cadenas laterales y permite que se alineen con el esqueleto de glucosas,

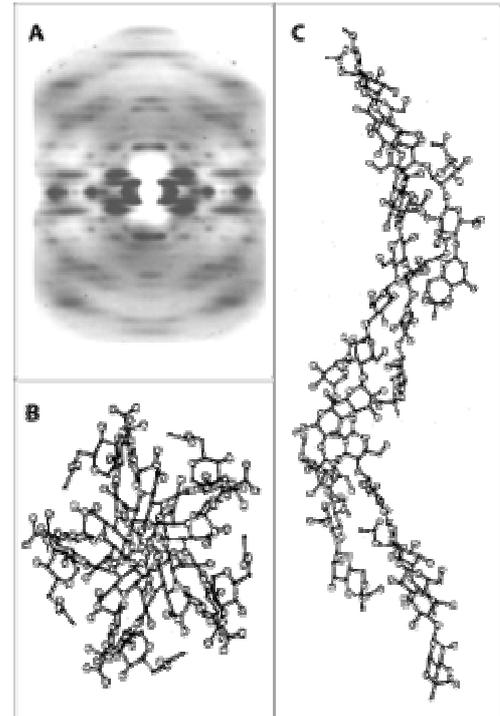


Fig. 8 Estructura del xantano. A) Patrón de difracción de rayos X típico de una estructura helicoidal. Modelado de una molécula de xantano vista axial (B) y lateral (C).

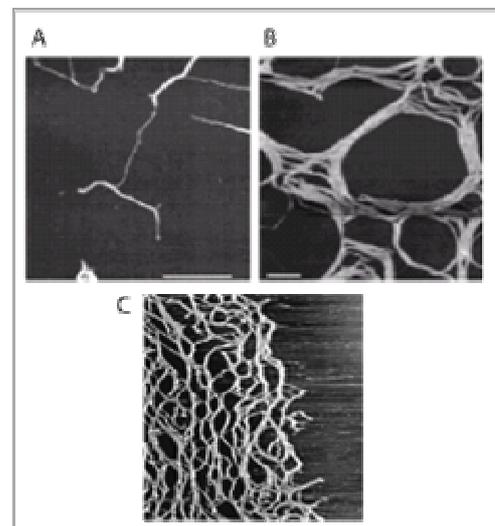


Fig. 9 Imágenes de AFM del xantano. Moléculas individuales (A), detalle de la estructura en doble hélice y punto de contacto intercatenario (B) y formación de una red (C). Vista de $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$. La barra representa 200 nm y 5 nm en la A y B.

adoptando la molécula una conformación ordenada tipo varilla. (Fig. 10).

Esta conformación está estabilizada por interacciones no covalentes, principalmente puentes de hidrógeno y por lo tanto el aumento de la temperatura o diluciones altas de la solución hacen que la conformación revierta al estado desordenado (87). Sin embargo, en concentraciones altas de electrolitos (0.15M), la estructura ordenada se mantiene aún a temperaturas altas (100°C).

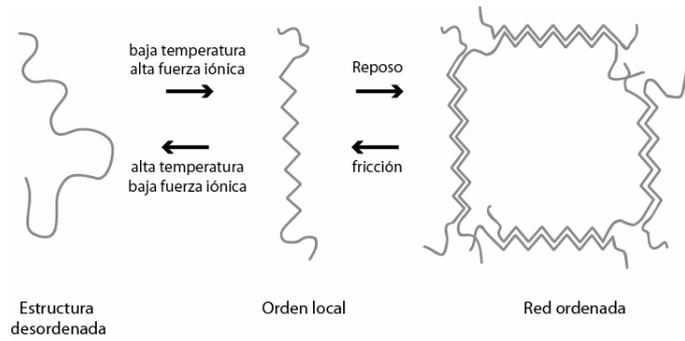


Fig. 10 Representación esquemática de las conformaciones el xantano

Las asociaciones intermoleculares débiles y el entrecruzamiento entre las cadenas de xantano llevan a la formación una compleja red coloidal (Fig. 9) (88).

Propiedades reológicas

Antes de continuar, es necesario definir algunos parámetros utilizados en reología que nos permitirán analizar las características inusuales del xantano (89).

a. Viscosidad

Cuando se aplica una fuerza a un volumen de líquido se produce un desplazamiento o deformación. Si consideramos que el líquido está contenido entre dos placas paralelas y aplicamos una fuerza F a la placa superior (de área A), el líquido empezará a fluir en la dirección de F (Fig. 11). Al esfuerzo que se produce en el plano del fluido se lo denomina *tensión de corte* o *esfuerzo de cizalla* (τ). (ecuación 1)

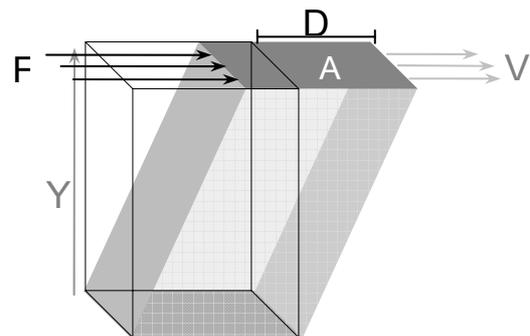


Fig. 11 Fuerzas que actúan sobre dos placas de líquido paralelas. D: desplazamiento; V: velocidad; A: área; F: fuerza; Y: separación.

$$\tau = \frac{F}{A} = \frac{N \text{ (Newton)}}{m^2} = \text{Pa (Pascal)} \quad (1)$$

La velocidad (V) a la que fluye el líquido entre ambas placas no es constante, sino que es máxima en la placa superior y disminuye hacia la placa estacionaria. Esto genera un *gradiente de velocidad* (γ) que depende de la distancia entre ambas placas (Y) y es diferente según el líquido (ecuación 2).

$$\gamma = \frac{V}{Y} = \frac{D/t}{Y} = s^{-1} \quad (2)$$

Por otro lado, la velocidad de flujo que se obtiene por medio de la tensión de corte está

$$\tau = \gamma \cdot \eta \quad \Rightarrow \quad \eta = \frac{\tau}{\gamma} = \text{Pa} \cdot \text{s} \quad (3)$$

determinada por la resistencia interna que oponga el líquido a fluir y que se define como *viscosidad (dinámica)*, η . La relación entre estos parámetros está dada por **la ley de Newton** (ecuación 3) que describe el comportamiento de un líquido ideal y establece que la tensión de corte es directamente proporcional al gradiente de velocidad y a la viscosidad. Podemos medir experimentalmente la viscosidad η utilizando un viscosímetro de rotación (sistema Searle de cilindros coaxiales). En general, la unidad que más se utiliza es el mili Pascal . s (mPa . s) o centipoise (cP).

Las soluciones de polisacáridos son consideradas hidrocoloides, sistemas dispersos en los cuales la viscosidad depende del gradiente de velocidad (líquidos no newtonianos) y en la mayoría de los casos, η disminuye al aumentar γ (fluidos pseudoplásticos). La viscosidad en cada punto no permite predecir el comportamiento en gradientes de velocidad menores y mayores y por lo tanto se la considera aparente.

Los polímeros lineales, en soluciones diluidas, poseen una relación entre viscosidad y estructura/conformación que depende del volumen hidrodinámico que tienen las moléculas en la solución. A bajas concentraciones, casi no existe interacción entre las moléculas y se hallan en la conformación más extendida, de manera que la viscosidad no es muy diferente a la del agua. La diferencia esta dada por el volumen esférico que tienen las moléculas al girar libremente.

La relación de la viscosidad con la concentración es generalmente lineal hasta valores de viscosidad dos veces la del agua. Esta dependencia implica que las moléculas extendidas en bajas concentraciones incrementan la viscosidad en mayor medida que moléculas del mismo tamaño pero más compactas.

La estructura extendida tiene un efecto importante en la dependencia de la viscosidad con respecto al peso molecular ya que el volumen hidrodinámico de las moléculas compactas (más flexibles) aumenta aproximadamente como la raíz cúbica de su peso molecular, mientras que en las moléculas con forma de varilla lo hace en forma lineal. Esta relación está dada por la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (90):

$$[\eta] = K \cdot PM^a \quad \text{donde } K \text{ y } a \text{ son constantes}$$

Un aumento en la concentración de la molécula disuelta en la solución o el peso molecular del soluto generalmente llevan a un aumento en la viscosidad (por ej, espesamiento).

c. Viscoelasticidad

Muchos hidrocoloides son capaces de formar geles con diferente consistencia dependiendo de su estructura, concentración y factores tales como fuerza iónica, temperatura y pH. La combinación entre esta propiedad elástica (tipo sólido) y la viscosidad (tipo líquido) se denomina *viscoelasticidad*. Los materiales elásticos se deforman bajo un determinado esfuerzo y se recuperan completamente luego que el esfuerzo es removido. Por el contrario, un material viscoso no puede recuperarse luego de la deformación.

Propiedades del xantano

La estructura y conformación del xantano determinan varias de las propiedades de este polímero en solución (Tabla 5). Algunas de ellas son:

Punto de flujo alto, este valor refleja la fuerza mínima que debe aplicarse para desarmar la red de polímero. En términos prácticos, sólidos, gases u otras sustancias pueden quedar atrapados en la red y no serán liberados hasta que esta se desarme. Cuanto más alto sea el valor de fluencia, más estable será la suspensión o emulsión.

Pseudoplasticidad, la disgregación de la red una vez superada la fuerza de corte hace que las moléculas se alineen en la dirección de la fuerza y vuelvan a agregarse inmediatamente después de que esta desaparece.

Alta viscosidad a bajas concentraciones; espesante eficiente

No presenta tixotropía, o sea que para una dada tensión de corte la viscosidad no disminuye con el tiempo. Esto es importante debido a que la principal función del xantano es mantener estable y en suspensión sólidos, líquidos no miscibles y gases en sistemas acuosos.

Tolerancia a un amplio rango de temperaturas (20 a 60°C) y pH (2 a 12).

Alta estabilidad frente a álcalis, ácidos y enzimas. Se debe a la protección del esqueleto por las cadenas laterales

Tabla 5. Relación entre las propiedades del xantano y su estructura (adaptado de (79))

Características estructurales	Propiedades conferidas
Formación de agregados (por uniones débiles intermoleculares)	Alta viscosidad a bajas fuerzas de corte (función estabilizante o de suspensión). Pseudoplasticidad.
Conformación rígida en forma de hélice (estabilizada por puentes de hidrógeno y carga aniónica en cadenas laterales)	Insensibilidad a la temperatura y compatibilidad con sales.
Esqueleto protegido por las cadenas laterales	Estabilidad frente a ácidos, álcalis y enzimas.

Estas sobresalientes propiedades reológicas hacen del xantano uno de los biopolímeros más utilizados. Se calcula que durante el año 2001 se produjeron 35000 toneladas de xantano en todo el mundo.

1.3.2 Función fisiológica

El género *Xanthomonas* es, sin duda, uno de los grupos de bacterias asociados a plantas más ubicuo. Se han detectado más de 124 especies de plantas monocotiledoneas y 268 especies de dicotiledoneas infectadas con miembros este género (91), mientras que otros miembros son capaces de vivir asintóticamente en asociación con tejidos vegetales o como epífitas (92).

El proceso de infección de estas bacterias se inicia con el ingreso de las células a la planta a través de heridas y aberturas naturales (estomas e hidatodes) (91). Una vez dentro, se multiplican en los espacios intercelulares hasta que estén repletos de bacterias y EPS (93). Este paso está asociado con la pérdida de agua y el aumento de la permeabilidad de las células vegetales. En algunos casos, las bacterias pueden invadir el sistema vascular y diseminarse por toda la planta (94). Con el tiempo, las células vegetales adyacentes a las bacterias comienzan a degradarse y finalmente, las bacterias entran y se multiplican dentro de ellas.

El desarrollo de cada uno de estos pasos depende de la susceptibilidad de la planta hospedadora a la infección. En las plantas resistentes se lleva a cabo la respuesta de hipersensibilidad, una pequeña defensa local acompañada por una rápida necrosis del tejido infectado. Mientras que en las plantas susceptibles, la infección da lugar a diversas patologías, tales como clorosis, necrosis, hipertrofia, enfermedades vasculares, y parenquimatososis en las hojas, tallos y frutos (93).

Dentro del género *Xanthomonas*, *X. campestris* es la especie preponderante, de la cual se han identificado al menos 141 patovarietades (95). Por ejemplo, la especie *X. campestris* pv. *campestris* es el agente causal de la llamada *peste negra* de la familia *Brassicaceae* (crucíferas como el repollo, coliflor y brócoli). Los hospedadores infectados presentan lesiones amarillas en los márgenes de las hojas y a medida que las lesiones se agrandan las nervaduras se tornan negras (96).

El **rol fisiológico** del xantano ha sido poco estudiado y su función se dedujo por analogía con otros exopolisacáridos (97; 91). Las células de *X. campestris* no forman esporas, por lo tanto la inclusión en el EPS durante la etapa de vida libre prolongaría su supervivencia al incrementarse la resistencia a la desecación, a las temperaturas no permisivas y la luz ultravioleta (3). Aunque su gran abundancia y fácil acceso hacen del xantano una potencial fuente energética de reserva, la bacteria no puede utilizarlo porque carece de las enzimas necesarias para degradarlo.

La función que cumple el EPS en la patogénesis es un tema de discusión y controversia. Algunos autores han encontrado un correlato entre la virulencia de distintas cepas y la cantidad de EPS producido (más EPS mayor virulencia) (98) Por otro lado, Katzen y colaboradores, demostraron que cepas deficientes en la síntesis de xantano son capaces de infectar y producir los mismos síntomas que la cepa salvaje, aunque en menor grado (99). Estos resultados sugieren que el xantano no es absolutamente esencial para la virulencia, aunque jugaría un rol en la agresividad por parte de *Xanthomonas* contra su hospedador. Esta hipótesis se ve reforzada por el rol que juegan los polisacáridos bacterianos en la pérdida de agua del espacio intercelular del tejido vegetal, evento necesario para la colonización. Es posible que el xantano forme un gel en este espacio al interaccionar con polisacáridos de la planta, y de esta forma, las bacterias incluías en él, quedarían protegidas contra la desecación y la acción de compuestos bacteriostáticos y otras reacciones de defensa primaria de la planta. (94)

1.3.3 Biosíntesis

Análisis genéticos de mutantes deficientes en la síntesis de xantano obtenidas por mutagénesis con EMS, NTG o inserciones de transposones, permitieron identificar ocho regiones cromosomales físicamente separadas entre sí, a las que se denominaron *xps* (por *xanthan polysaccharide synthesis*). La región *xpsVIII* contiene la actividad glucoquinasa necesaria para la

importación de glucosa (100), las regiones *xpsIII*, *xpsIV* y *xpsVI*, están involucradas en la biosíntesis de los nucleótido-azúcares precursores de la unidad repetitiva, mientras que los genes responsables de las etapas posteriores de la síntesis están codificados exclusivamente en la región *xpsI* (101). Se desconocen las funciones de las tres regiones restantes, *xps II*, *V* y *VII*, aunque se especula que podrían estar relacionadas con la síntesis del lípido aceptor, o bien, con mecanismos de regulación.

La región *xpsI*, también conocida como región *gum*, se extiende a lo largo de 16 kb del cromosoma de *X. campestris*. El análisis de la secuencia nucleotídica predice la existencia de 12 marcos abiertos de lectura, denominados de *gumB* a *gumM* (GenBank U22511). La región *gum* completa se expresa a partir de un único promotor localizado río arriba del primer gen (*gumB*) y de un promotor secundario, río arriba de *gumK*. (102) (Fig. 12).

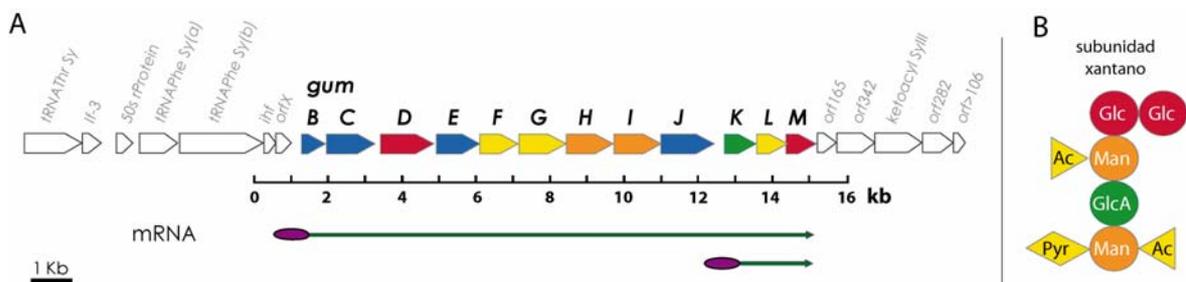


Fig. 12 Genes involucrados en la biosíntesis del xantano. A) Región *gum*, se indican los mensajeros derivados del promotor principal y secundario. B) esquema de la subunidad repetitiva, los colores representan los productos de los genes *gum* involucrados en cada paso: rojo, glucosiltransferasas; naranja, manosiltransferasas; verde, glucuroniltransferasas; amarillo, piruvil y acetil transferasas. En azul se indican los genes involucrados en la polimerización/secreción del xantano. B) Representación esquemática de la subunidad del xantano. *Glc*, glucosa; *Man*, manosa, *GlcA*, ácido glucurónico; *Pyr*, piruvato; *Ac*, acetato.

La biosíntesis del xantano comienza con la formación de la unidad repetitiva sobre un lípido fosfato por adición secuencial de Glc-1-P, Glc, Man, GlcA y Man a partir de los nucleótido-azúcares precursores (UDP-Glc, GDP-Man y UDP-GlcA) (103; 4). Los sustituyentes acetilo y cetil piruvato son adicionados al lípido-PP-pentasacárido utilizando como dadores Ac-CoA y PEP respectivamente (104; 4). Estudios realizados con células permeabilizadas de *X. campestris* revelaron que, en esta etapa, están involucradas cinco glicosiltransferasas (*GumD*, *GumH*, *GumI*, *GumK* y *GumM*); dos acetil y una piruvil transferasas (*GumF*, *GumG*, y *GumL*) (99) (Fig 12).

La polimerización se produce por transferencia del polímero naciente a la posición 4 de la glucosa no reductora de la unidad repetitiva recientemente sintetizada (4). El reciclado del lip-P, la liberación de la cadena de xantano del lípido pirofosfato y la secreción al medio extracelular, son procesos aún desconocidos.

La inactivación de cualquiera de los genes *gumB*, *gumC*, *gumE* y *gumJ*, en la cepa silvestre, resulta letal. Solo puede llevarse a cabo en cepas que contienen una segunda mutación en alguno de los genes relacionados con formación de los precursores nucleotídicos. En ensayos *in vitro*, las mutantes *gumB*, *gumC* y *gumE* sintetizan las subunidades repetitivas completas pero son incapaces de ensamblar el polisacárido. Por lo tanto, aunque su función se desconoce, estos genes estarían

relacionados con los procesos de polimerización y exportación del xantano. En cambio, la mutante *gumJ*, es capaz de sintetizar *in vitro* tanto la unidad repetitiva como el polisacárido. Aunque su función no puede relacionarse con ninguno de los pasos biosintéticos no podemos descartar que posea un rol en la secreción del xantano *in vivo* (99).

1.3.4 Regulación de la síntesis de xantano

En *Xanthomonas*, al igual que en otros patógenos de animales y plantas, los factores involucrados en la virulencia se encuentran regulados de manera coordinada. Estos factores incluyen, además del xantano (ver sección 1.3.2), enzimas extracelulares tales como endoglucanasas, pectinasas y proteasas (91). En *X. campestris pv. campestris*, al menos 8 genes denominados *rpf* (*regulation of pathogenicity factors*) median la secreción de las enzimas y el EPS (105). De estos genes, *rpfC* y *rpfG*, forman parte de un sistema de dos componentes, involucrado en la regulación positiva del sistema (106), mientras que el gen *rpfN* es el responsable de la regulación negativa del mismo (107). Participan, además, otros elementos regulatorios como los factores difusibles sintetizados por *rpfB* y *rpfF* (108) o el codificado por *pigB* (109; 110); así como también la proteína Clp, la cual conserva un 45% de homología con el factor de activación catabólica CAP de *E. coli* (97).

Aunque la participación de cada uno de estos elementos en la regulación de los factores de virulencia se ha podido probar a nivel genético, las funciones bioquímicas individuales todavía permanecen sin elucidar debido al efecto pleiotrópico que tienen en el sistema.

En el caso del EPS, además, hay que tener en cuenta que la síntesis de xantano y LPS tienen precursores en común (111; 112; 113) y por lo tanto, su regulación puede estar bajo un control diferente.

2.

Objetivos

En vista de la importancia tanto económica como básica de los exopolisacáridos bacterianos, y la falta de información sobre los procesos que rigen la polimerización y exportación de estos polímeros, es que en esta tesis se trabajó bajo los siguientes objetivos:

- Establecer la existencia de un complejo transmembrana encargado de la polimerización y/o exportación del xantano en *Xanthomonas campestris*.
- Caracterizar bioquímica y funcionalmente el rol de las proteínas GumB y GumC en la exportación del xanano.
- Determinar el modo en el que se regula el tamaño del polímero durante la polimerización.

3.

Resultados

3.1 Homología de las proteínas GumB y GumC con componentes de sistemas de transporte

3.1.1 GumB

El gen *gumB* es el primer marco de lectura abierto del operón *gum* (Fig. 12) y codificaría para una proteína de 213 aa. La búsqueda de secuencias homólogas en los bancos de datos y en particular en el TC-DB (*transport classification-data base*), revela que esta proteína presenta distintos grados de identidad con algunos miembros de la familia OMA involucrados en el ensamblado y exportación de polisacáridos extracelulares, destacándose entre ellos KpsD de *E. coli* (Tabla 6).

Tabla 6 Homología de GumB con proteínas de la familia OMA

Proteína	Organismo	Función	Tamaño (aa)	%Identidad (Similitud)	N° acceso (GB)
KpsD	<i>Escherichia coli K1</i>	Exportación de CPS 1	558	25 (47)	AAD21562
ExoF	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Exportación de EPS	421	24 (41)	Q02728
Wza	<i>Escherichia coli K30</i>	Exportación de CPS 2	379	24 (42)	AAD21562
AmsH	<i>Erwinia amylovora</i>	Exportación de EPS	377	27 (44)	S61892
EpsA	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Exportación de EPS	377	24 (40)	Q45407
BexD	<i>Haemophilus influenzae</i>	Exportación de CPS	394	15 (33)	P22236
CtrA	<i>Neisseria meningitidis</i>	Exportación de CPS 1	387	18 (37)	CAB83512
VexA	<i>Salmonella typhi</i>	Exportación de CPS	355	23 (38)	D14156

GumB N° acceso U22511.

GB: Gene bank, base de datos de proteínas

Para la comparación de secuencias se utilizó el programa MultiAlign (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin>)

La secuencia de aminoácidos contiene, al igual que varios miembros de la familia OMA, un *lipobox* ó sitio de corte para la Peptidasa Señal II (PSII) característico de las lipoproteínas, aunque modificado, y carece del péptido señal presente en estas proteínas de ME (Fig. 13A y B).

Para descartar que estas diferencias se debieran a un error en la secuencia publicada en 1987 (U22511), se secuenció el gen *gumB* y la región río arriba del mismo. Se encontró la delección de una base y la inversión de otras dos en la posición 1299 de la región *gum* secuenciada:

gumB (U22511) < GACTC GTCG CAAGGCC >
nueva secuencia < GACTC -TGC CAAGGCC >

Esto origina dos nuevos ATG río arriba del anteriormente reportado: uno a 55 pb y cercano al RBS, y el segundo a 232 pb. Este segundo sitio fue descartado por encontrarse antes del sitio descrito para el comienzo de la transcripción del operón *gum* (102).

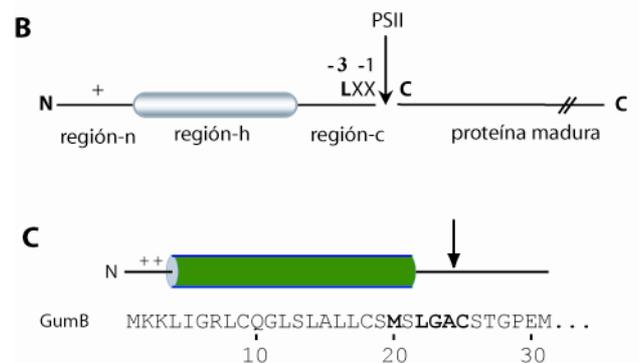
A

GumB	1MSLGCSTGPE
KpsD1	1MKLFKSILLIAACHAAQSAIDIN
Wza	1MMKSKMKLPLLVSVTLSGCTVLP.
AmsH	1MIIIKTKLIPLMVPAAALSGCTIVPG
VexA	1MKKIIILLTFFLLSGCTIPRA
BexD	1MRNYPLKAVCAVLMGLSACSSLPT
CtrA	1MLKLKFCIVISFLILG.SACSAIPS
EpsA	1MFVSIPIRKTVMSTLCAVPLM
ExoF	1MQSNRRSGKSAGSRVSCFTRLA

LxxC

Fig. 13 Características de la proteína GumB.

A) alineamiento del extremo N-terminal de GumB (U225111) con miembros de la familia OMA. Se destaca la posición de la secuencia consenso de corte de la peptidasa señal II (*lipobox*). **B)** Detalle del péptido señal característico de lipoproteínas bacterianas. La *Región-n* o amino terminal contiene aa con carga positiva en las primeras posiciones; la *región-h* o hidrofóbica, atraviesa la MI en forma de hélice- α dejando el sitio de corte hacia el periplasma y la *región-c* o carboxi terminal, contiene en las posiciones -1 y -3 residuos pequeños y sin carga. **C)** detalle del extremo N-terminal de la nueva secuencia de GumB (AAL28080). Se indican en negrita el posible *lipobox* y la metionina inicial de la secuencia anterior (U22511).



La nueva secuencia de la proteína, de 232 aa y PM estimado de 25,3 kDa, contiene un posible péptido señal de 19 aminoácidos en su extremo N-terminal similar al característico de lipoproteínas bacterianas (Fig 13B y C) sugiriendo que esta proteína se traduciría como un precursor que sería procesado por la PSII con la adición de un lípido para su anclaje a membrana.

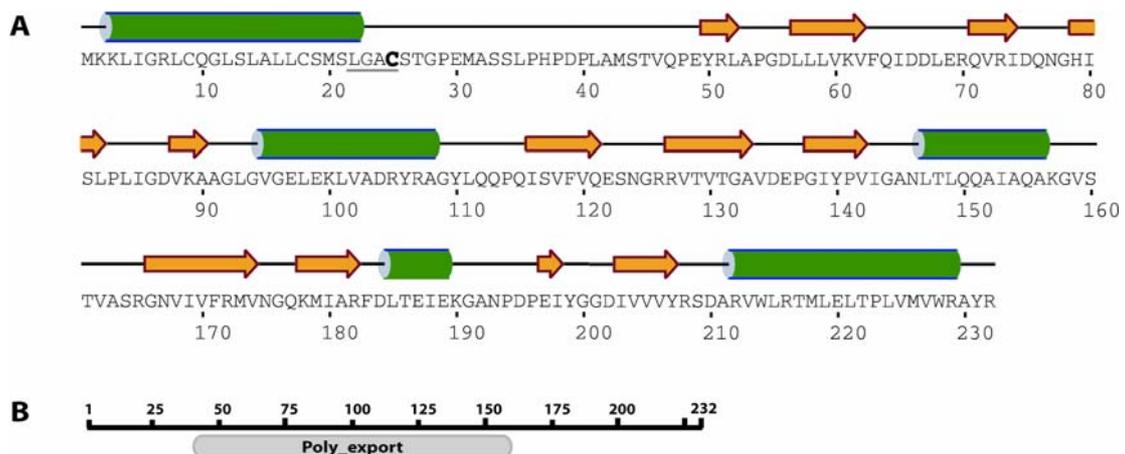


Fig. 14 Análisis de la secuencia de GumB **A)** Hipotética estructura secundaria de GumB. Se utilizó el PsiPred (*Protein structure prediction server*; <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psiform.html>). Los cilindros representan las hélices- α , las flechas las hojas- β y las líneas las estructuras *coil*. En negrita y subrayado se resalta la secuencia y la cisteína del *lipobox*. En la posición 20 se encuentra la metionina inicial de la secuencia U22511, **B)** Esquema de GumB que representa la posición relativa del dominio *Poly_export*. Se utilizó el programa *Conserved Domain Search del* NCBI para la búsqueda de dominios conservados (114). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)

Tabla 7 Homología de la GumC con proteínas de la familia MPA

Proteína	Organismo	Función	Tamaño (aa)	%Identidad	N° acceso (GB)
MPA2					
KpsE	<i>Escherichia coli K1</i>	Exportación de CPS	382	16.9	AAAB5624
BexC	<i>Haemophilus influenzae</i>	Exportación de CPS	377	21	P22930
CtrB	<i>Neisseria meningitidis</i>	Exportación de CPS	387	17.3	AAA25451
VexD	<i>Salmonella typhi</i>	Exportación de CPS	434	18.7	I36892
MPA1					
SpsC/SpsE	<i>Sphingomonas S88</i>	Exportación de CPS	447 / 235	18.3	AAC44065
ExoP	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Exportación de EPS	786	24	P33698
Wzc_cps	<i>Escherichia coli K30</i>	Exportación de CPS	721	16.8	AAD21564
AmsA	<i>Erwinia amylovora</i>	Exportación de EPS	726	16.7	Q46631
EpsB	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Exportación de EPS	750	17.6	AAA91625

GumC N° acceso AAL28079.

GB: Gene bank, base de datos de proteínas

Para la comparación de secuencias se utilizó el programa MultiAlign (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin>)

diversas tirosina- quinasas bacterianas como EpsB de *P. solanacearum*. Además presenta, antes del STM2, el motivo rico en prolinas “Px₂Px₄SPKx₁₁GGMxGAG” compartido por varios miembros de la familia MPA (Fig. 16B) (77).

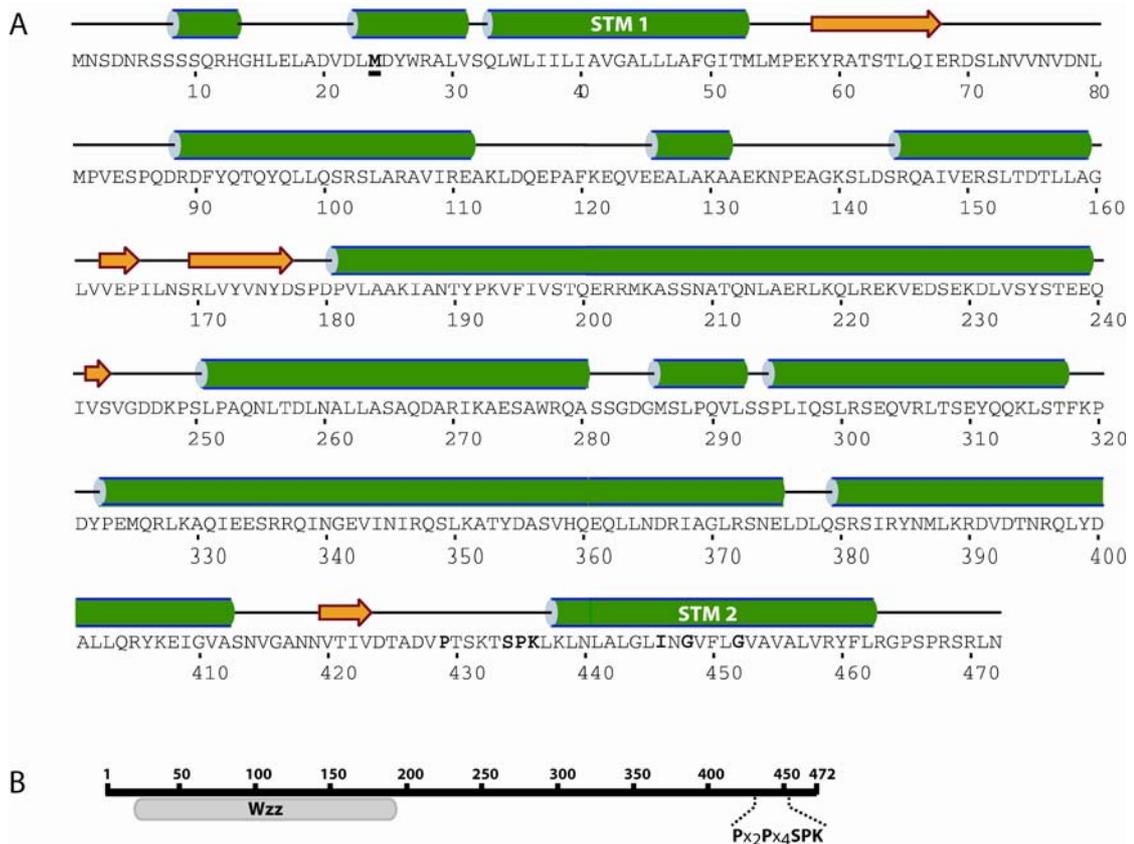


Fig. 16 Análisis de la secuencia de GumC **A)** Hipotética estructura secundaria de GumC. Los cilindros representan las hélices-α, las flechas las hojas-β y las líneas las estructuras coil. STM1 (aa 34-55) y STM2 (aa 439-458) representan los segmentos transmembrana predichos. En negrita y subrayado se resalta la metionina inicial de la secuencia U22511, **B)** Esquema de GumC que representa la posición relativa del dominio Wzz y el motivo conservado rico en prolinas.

Tomando en conjunto todos estos datos, las proteínas GumC y GumB son buenas candidatas para representar los roles tanto de proteína auxiliar de membrana interna (MPA) como de proteína auxiliar de membrana externa (OMA) en el hipotético sistema de transporte del xantano.

3.2 Localización de GumB y GumC en la envoltura celular

Para poder considerar a GumB y GumC como componentes de un sistema de transporte necesitamos conocer la localización subcelular de ambas proteínas. Con el objetivo de obtener anticuerpos policlonales específicos las proteínas se clonaron en vectores de expresión para *E. coli* (GumC, sin las regiones transmembrana N-terminal y C-terminal, y GumB, en la hipotética forma madura).

Se prepararon extractos de proteínas totales de la cepa silvestre de *X. campestris* (XcFC2) y se los separó en proteínas solubles (citoplasma y periplasma) y de membrana. Mediante *Western blots* se localizó tanto a GumB como a GumC en la fracción de membranas (Fig. 17A). Esta fracción se analizó por sedimentación en gradientes isopícnicos (sacarosa 40-70%) revelando que estas proteínas se distribuyen diferencialmente a lo largo del gradiente (Fig. 17B). Las fracciones se agruparon en base al perfil de absorbancia a 280nm en 4 grupos (1-4). Se utilizó el contenido de KDO

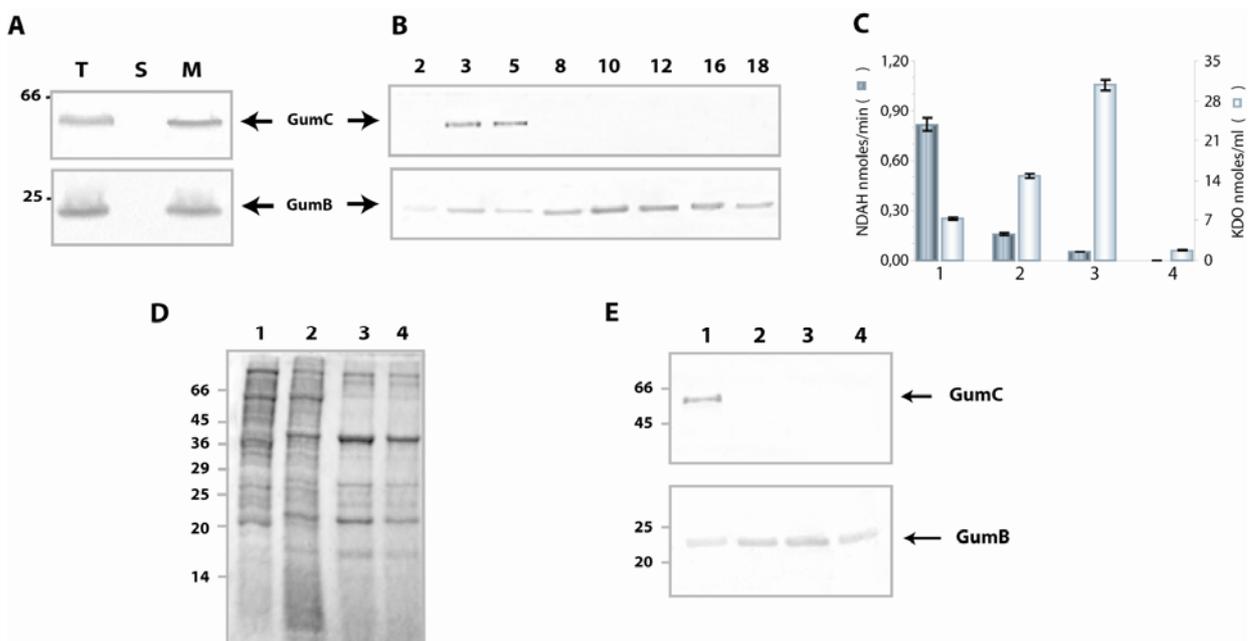


Fig. 17 Localización subcelular de GumB y GumC en *X. campestris* FC2. Inmunodetección de ambas proteínas en **A)** las fracciones obtenidas luego de la ruptura mediante *French-press* y centrifugación diferencial. *T*, proteínas totales, *S*, solubles (citoplasma + periplasma) y *M*, de membrana y en **B)** las fracciones de gradientes isopícnicos de sacarosa de membranas totales de FC2. **C)** Eficiencia de la separación de las membranas interna y externa en el gradiente isopícnico. Las fracciones del gradiente se agruparon según su perfil de A280nm en cuatro grupos (1 a 4). En cada uno se midió la actividad NADH oxidasa (marcador de MI) y presencia de KDO (marcador de ME). **D)** Perfil de las proteínas de los grupos 1 a 4 en un gel 10% SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue*. **E)** Inmunodetección de las proteínas GumB y GumC en los grupos 1 a 4. Los estándares de peso molecular se expresan en kDa. Se utilizaron anticuerpos policlonales anti-GumB y anti-GumC en dil 1:3000 y 1:5000 respectivamente.

(2-keto-3-deoioctanato) y la actividad de NADH oxidasa como marcadores de membrana externa e interna respectivamente. El grupo 1 se encuentra enriquecido en membrana interna mientras que los grupos 3 y 4 lo están en membrana externa, y el grupo 2 contiene una mezcla de ambas (Fig. 17C y D).

La presencia de GumC exclusivamente en el grupo 1 y de GumB en los grupos 2, 3 y 4 indica que GumC está presente solo en la membrana interna, mientras que GumB se encuentra principalmente en la membrana externa (Fig. 17E). Por solubilización diferencial de las membranas en Tritón X100-MgCl₂ y EDTA (115) se obtuvieron resultados similares (no presentados). Estos resultados confirman las predicciones hechas sobre la base de la secuencia de estas proteínas.

3.3 Caracterización topológica y estructural de las proteínas GumB y GumC

3.3.1 GumB

Como se describió previamente, GumB está localizada preferentemente en la membrana externa aunque un porcentaje importante también se halla en MI. Por homología pertenecería a la familia OMA cuyos miembros en general son lipoproteínas.

a. GumB es una lipoproteína

Las lipoproteínas bacterianas se sintetizan como precursores que son transportados a través de la MI por el sistema de secreción Sec. Las siguientes reacciones tienen lugar en la cara periplasmática de la MI: formación de una unión tioeter entre la cisteína del *lipobox* y diacilglicerol mediante la fosfatidilglicerol:prolipoproteína diacilgliceril transferasa; corte del péptido señal por la prolipoprotein-péptido señal peptidasa (peptidasa señal II) y aminoacilación del grupo NH₂ de la cisteína por la N-aminoacil transferasa (116). De esta manera las lipoproteínas maduras poseen un residuo cisteína N-terminal modificado con lípidos.

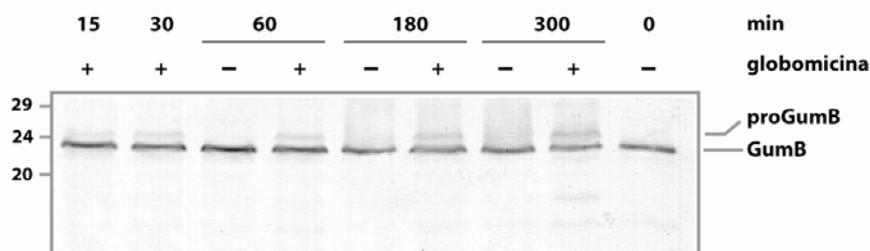


Fig. 18 Inhibición del procesamiento de GumB por globomicina. Las bacterias se incubaron 16 h en medio YM en presencia (+) o ausencia (-) de 180 µg/ml de globomicina a distintos tiempos. Las proteínas totales se analizaron por SDS-PAGE 14% e inmunodetección con el anticuerpo anti-GumB 1:3000. Los estándares de peso molecular se expresan en kDa.

Para determinar si GumB es una lipoproteína se incubaron bacterias de la cepa XcFC2 con globomicina, inhibidor específico de la Peptidasa señal II que lleva a la acumulación de diacilglicerol prolipoproteínas en la MI (117). El crecimiento de las bacterias se vio afectado por la presencia del

inhibidor (Fig. 18A). Altas concentraciones de globomicina inhibían por completo el crecimiento cuando eran incorporadas desde el comienzo del cultivo. Sin embargo, se obtuvo una situación de compromiso cuando el inhibidor se incorporó en una concentración de 180 µg/ml a un cultivo en fase logarítmica tardía (DO_{600} 0,8) que permitió el crecimiento celular y observar el efecto inhibitorio.

Ensayos de inmunodetección de muestras tomadas a distintos tiempos luego del agregado de globomicina revelaron la presencia de una banda de 23 kDa de peso molecular aparente en todas las muestras y la acumulación de una proteína de 25 kDa de peso molecular aparente en las muestras tratadas con el inhibidor (Fig. 18B). Las bandas corresponderían a la proteína GumB madura (con un PM teórico de 22,8 kDa) y a su diacilgliceril precursor el cual se detecta aún a tiempos muy cortos de incubación (por ej. 15 min).

Estos resultados nos permiten afirmar que el *lipobox* presente en GumB es funcional, ya que la globomicina inhibe el procesamiento del péptido señal del precursor de GumB. Por otro lado, la peptidasa señal II solo procesa proteínas que poseen un enlace tioeter entre el grupo sulfidrilo de la Cys del *lipobox* y el diacilglicerol. Si GumB fue procesada por PSII implica que esta unión ha tenido lugar y por lo tanto que es una lipoproteína. Lo cual confirmaría que la nueva secuencia propuesta para GumB es la correcta (ver sección 3.1.1).

El último paso anterior a la localización definitiva de una lipoproteína en ME o MI es la aminoacilación de la Cys N-terminal de la proteína madura luego del corte de la PSII. En bacterias la unión amida se forma generalmente con ácido palmítico. Para determinar si GumB sufre esta modificación se realizó la marcación *in vivo* de células de *X. campestris* con [9,10,³H]-ácido palmítico. Para aumentar la señal de GumB se utilizó la cepa XcFC2(pBBR-B). Esta cepa sobreexpresa GumB a partir de un plásmido pBBR1-MCS5 en el que se clonó un fragmento de la región *gum* de 1,2 kb que contiene el gen *gumB* y su promotor. En la fracción de proteínas totales de las células incubadas se

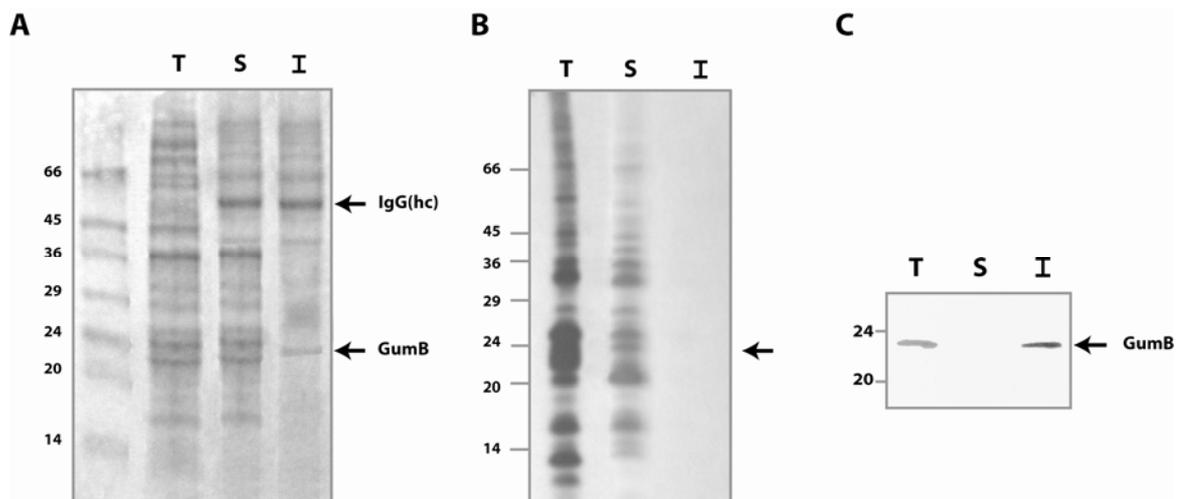


Fig. 19 Marcación *in vivo* de *X. campestris* con [9,10,³H]-ácido palmítico. **A)** Las proteínas marcadas de XcFC2(pBBR5-B) se analizaron en SDS-PAGE 10% antes y después de la inmunoprecipitación con anticuerpos anti-gumB (1:600), **B)** autoradiografía del gel tratado con salicilato de Na (20 días de exposición), la flecha marca la posición esperada de GumB, **C)** inmunodetección de GumB en las distintas fracciones. T, extracto celular total, S, sobrenadante de la inmunoprecipitación, I, inmunoprecipitado. Los estándares de peso molecular se expresan en kDa. *IgG(hc)* cadena pesada de la inmunoglobulina G de conejo. La cadena liviana de ~22 kDa no se detecta por tinción con Coomassie blue [Page, 1996 #24].

detectaron una gran cantidad de bandas con señal radiactiva lo cual indica que la marcación de proteínas

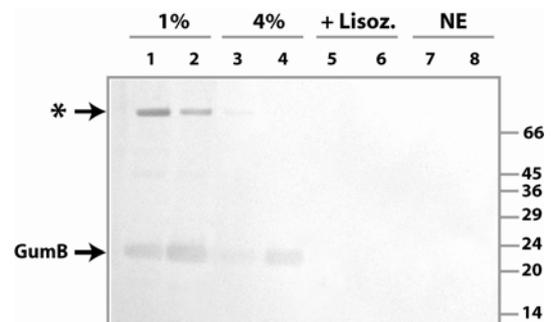
con [^3H]palmitato fue exitosa (Fig. 19B). Los extractos proteicos se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-GumB. En la fracción inmunoprecipitada se detectó una banda de 23 kDa de peso molecular aparente (Fig. 19A), sin embargo no se encontró señal radiactiva asociada a ella. Esta banda corresponde a la proteína GumB tal como se verificó mediante *Western blot*. (Fig. 19C). Este resultado sugiere que la Cys1 de la proteína madura formaría una unión amida con un tipo de ácido graso diferente de palmitato.

El péptido señal de GumB además de participar en la posterior modificación de la proteína estabilizaría la estructura de la proteína antes de su localización en la membrana. Cuando la proteína sin el péptido señal fue expresada en la cepa Xc1231(pBBR $_{promB_{mad}}$), no pudo ser detectada mediante *Western blot* en extractos de proteínas totales. Esta cepa se caracteriza por tener una delección total de la región *gum*. Para descartar que la inestabilidad la proteína GumB $_{mad}$ se debiera a la ausencia de otras proteínas del operón se expresó en la cepa Xc405A con idénticos resultados. En ambos casos la presencia de los mensajeros respectivos fue confirmada por RT-PCR (datos no presentados).

b. GumB no está asociada a la mureína y forma multímeros

Varias lipoproteínas de ME también se encuentran unidas al péptidoglicano, como por ejemplo Lpp de *E. coli* (118). Esta proteína forma trímeros que interaccionan con el péptidoglicano de dos formas, una covalente a través de su extremo C-terminal y otra no covalente. Se postula que la interacción entre el péptidoglicano y otras proteínas de ME, como por ej OmpA, OmpC y OmpF, contribuye a la asociación de la MI con la ME en ciertos puntos de la pared (119). El tratamiento con lisozima es insuficiente para romper esta unión (120). El análisis en gradiente de sacarosa de estas proteínas presenta un perfil similar al encontrado para GumB (Fig. 17B). Para determinar si la presencia de GumB a lo largo de todo el gradiente se debía a su interacción con el péptidoglicano, se purificó el sáculo de mureína de las cepas XcFC2 y XcFC2(pBBR5-B). En ambos casos GumB se detectó en la fracción de proteínas de membrana solubles al detergente, por lo tanto no se encontraría asociada covalentemente a la mureína (Fig. 20).

Fig. 20 Extracción de proteínas unidas al sáculo de mureína. Las proteínas de la envoltura celular de XcFC2 (calles pares) y XcFC2(pBBR-B) (calles impares) se extrajeron sucesivamente con 1% y 4% de SDS durante 10 min a 100°C. La fracción insoluble correspondiente al sáculo de mureína se trató con lisozima. Las proteínas se separaron en SDS-PAGE y se revelaron por inmunodetección. NE, fracción no extraíble con lisozima. * , agregados de alto peso molecular.



Además de la banda de 23 kDa de GumB, los anticuerpos reconocen una banda de alto peso molecular (>100 kDa). Esta banda se caracteriza por su resistencia al tratamiento con SDS y calor. Se ha reportado que varias proteínas de ME forman agregados con similares características denominados HMM (*high molecular mass*). Ejemplos son XpsD de *X. campestris* componente del

sistema de secreción de proteínas tipo II, Wza_{cps} de *E. coli* K30 involucrada el transporte del polisacárido capsular de tipo I y PilQ de *N. gonorrhoeae* involucrada en la formación del pili del sistema de secreción de proteínas tipo IV (121, 69, Drake, 1995 #21). La incubación de HMM-XpsD y HMM-Wza a temperaturas mayores de 50°C y 25°C causa la disgregación de estos agregados, mientras que HMM-PilQ es estable aún a 100°C. En el caso de XpsD y PilQ se demostró que estas estructuras corresponden a homo-multímeros de 10-12 subunidades (122; 123).

En el caso de GumB, también se observaron multímeros de alto peso molecular cuando la proteína fue expresada en *E. coli* (pQE30-XpsB#6). Luego de la ruptura celular, las proteínas de membrana recuperadas por extracción con Tritón X-100 se purificaron mediante una columna de exclusión molecular Superdex HR200. La proteína eluyó mayoritariamente en las fracciones cuyo peso molecular aparente va de los 40-80 kDa y en menor proporción en las fracciones cuyo peso molecular aparente va de los 120-160 kDa (no mostrados). Los pesos moleculares se corresponden con los esperados para dímeros y multímeros de GumB. Esto indicaría que GumB tiene la capacidad de formar agregados en ausencia del resto de las proteínas *gum*. La naturaleza de estas estructuras de alto peso molecular será descripta en mayor detalle en la sección 3.4.1.

3.3.2 GumC

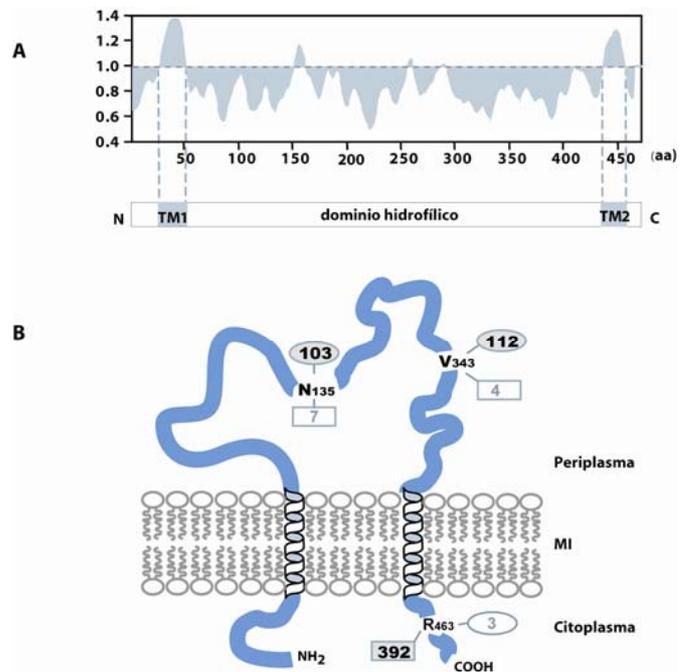
Como se describió previamente, GumC está localizada en la membrana interna y pertenecería por homología a la familia MPA, cuyos miembros poseen una particular topología en la membrana.

a. Topología de la proteína GumC

El análisis del momento hidrofóbico y del perfil hidropático de la secuencia aminoacídica de esta proteína indica la presencia de dos probables hélices- α transmembrana, STM1 y STM2, localizadas entre los aminoácidos L34-M55 y L439-V458 respectivamente (Fig. 21). Dichos segmentos se encontrarían separados por un gran dominio hidrofílico de 384 aminoácidos, el cual contendría por lo menos 3 regiones *coiled-coil* (28) (Fig. 16). Para corroborar estas predicciones se construyeron varias fusiones traduccionales del gen *gumC* con los genes de *E. coli lacZ* y *phoA* que codifican para la β -galactosidasa y la fosfatasa alcalina truncada (sin el péptido señal), respectivamente. La actividad enzimática de estas proteínas depende del compartimento celular donde se encuentren. Así la β -galactosidasa es activa exclusivamente en el citoplasma mientras que la fosfatasa alcalina solo lo es en el periplasma ya que requiere de la formación de enlaces disulfuro (124). Estos dos tipos de fusiones son complementarios entre sí y permiten el mapeo de la ubicación en la membrana de los distintos segmentos de la proteína. Para que pueda realizarse este ensayo la actividad enzimática endógena de ambos genes marcadores debe ser casi nula en la cepa a analizar. Para *X. campestris* esta premisa se cumple en el caso de la β -galactosidasa, no así para la fosfatasa alcalina. Mediante mutagénesis química con EMS se obtuvo una cepa deficiente en esta actividad enzimática en el entorno Xc405, denominada Xc405phoA.

Las construcciones resultantes de la fusión de gen *gumC* en varias posiciones con los genes de *E. coli lacZ* y *phoA* fueron transferidas a la cepa de Xc405phoA e integradas en el genoma mediante un solo evento de recombinación.

Se detectaron dos niveles de actividad de fosfatasa alcalina a partir de las proteínas híbridas GumC-PhoA: en las cepas cuyos sitios de fusión se encuentran entre los dos segmentos transmembrana (N135 y V343) la actividad fosfatasa alcalina fue 10 veces superior al de la cepa Xc405phoA, mientras que las cepas cuyo sitio de fusión se encuentra después del STM2 (R463) no mostraron diferencias con respecto a la cepa parental (Fig. 21B).



Por el contrario, las actividades de β -galactosidasa son bajas y comparables con los de la cepa Xc405phoA en aquellas fusiones que presentan altos niveles de actividad de fosfatasa alcalina (N135 y V343) y dos ordenes de magnitud superiores en las cepas que expresan las proteínas híbridas GumC-LacZ cuyos sitios de fusión se encuentran después del STM2 (R463).

Estos resultados son consistentes con una localización periplasmática del dominio que se encuentra entre los dos segmentos transmembrana y una localización citoplasmática del segmento C-terminal de la proteína como se muestra en el esquema de la Fig. 21. Sin embargo hay que remarcar que la localización citoplasmática del extremo N-terminal se basa en las predicciones informáticas y por analogía con otras proteínas homólogas, ya que no pudo demostrarse experimentalmente mediante fusiones traduccionales (ver siguiente sección).

b. Mutantes por delección N- y C-terminal, importancia de los STMs

Para determinar con más detalle el rol que juegan los segmentos transmembrana en la localización de GumC, se analizaron cepas de *X. campestris* que expresan distintas mutantes truncadas de esta proteína (Fig. 22A). Para poder expresar las proteínas en *X. campestris* se construyó un vector de expresión, *pBBRprom*. Al plásmido de amplio espectro pBBR1-MCS5 (125) se le adicionó río arriba del sitio de clonado múltiple la región promotora del operón *gum* que contiene un sitio de corte para la enzima de restricción *NdeI* en su extremo 3' a 12 pb del sitio de unión al ribosoma.

Las distintas construcciones se introdujeron en la cepa Xc1231 (Fig. 22B, panel superior). Esta cepa por carecer de toda la región *gum* nos permite analizar la localización de la proteína en ausencia de otros componentes del sistema *gum*. La proteína expresada en la membrana de la cepa Xc1231(pBBRpromC) coincide con la expresada a partir del cromosoma en la cepa silvestre (FC2) o a partir de un plásmido que contiene un fragmento de la región *gum* que incluye los genes *gumB* y *gumC* (pBBR5-BC). De las mutantes analizadas, solo se detectó la expresada en la cepa Xc1231(pBBRpromC₂₄₋₄₇₂) aunque en menor proporción que la proteína completa. Esta proteína carece de los primeros 23 aa (representa la secuencia U22511 reportada originalmente).

La inestabilidad de estas mutantes en la cepa Xc1231 podría deberse a la ausencia de otras proteínas del operón *gum*. Para verificar esta hipótesis se introdujeron los plásmidos en dos entornos genéticos diferentes. La cepa XcFC2 que contiene una copia cromosomal del operón, y la cepa Xc401C, mutante por delección total del gen *gumC* y que carece de la actividad fosfoglucomutasa y fosfomanomutasa (ver sección 3.5.2).

Los resultados obtenidos al expresar las proteínas truncadas en estas cepas son similares a los anteriores con excepción de la proteína GumC₅₃₋₄₇₂, la cual carece del STM1 (Fig. 22B, paneles medio e inferior). Tanto en XcFC2 como en Xc401C hay una expresión baja de esta proteína en las membranas. Esto indicaría que la presencia de otras proteínas del operón estabiliza o ayuda a la localización de GumC en membrana. Un indicio que apunta en esa dirección es lo que sucede en la cepa Xc1231(pBBR5-BC) donde la co-expresión de las proteínas GumB y GumC parece favorecer la presencia de GumC en la membrana. Lo mismo se observa en las cepas XcFC2(pBBR5-BC) y Xc401C(pBBR5-BC). Por otro lado la correcta localización requeriría principalmente del segundo segmento transmembrana sobre todo cuando la proteína GumC es expresada en *trans* con respecto al resto de las proteínas *gum*.

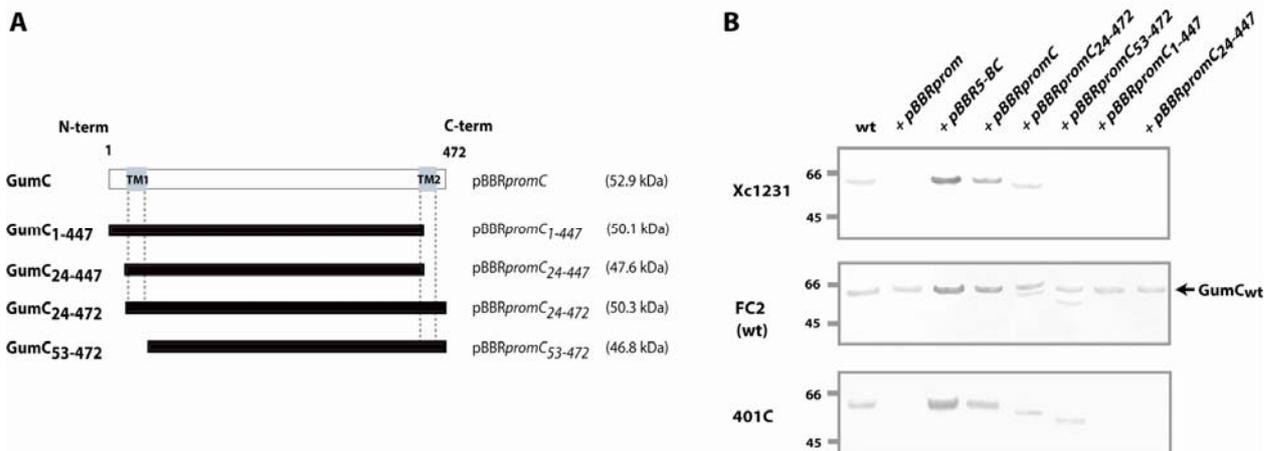


Fig. 22 Localización de proteínas truncadas de GumC. **A)** Representación esquemática de las distintas proteínas GumC mutantes. La proteína silvestre está representada en la parte superior y las dos hélices transmembrana están indicadas como TM1 y TM2. Las distintas mutantes GumC se designaron según la numeración de los aminoácidos presentes en la proteína silvestre (izquierda). A la derecha se indican los plásmidos que codifican estas proteínas así como también el tamaño esperado para cada una de ellas. **B)** Presencia de las formas truncadas de GumC en membrana. Calle 1: *wt*, proteínas de la cepa silvestre (FC2). Calles 2-7: la cepa indicada a la izquierda fue transformada con el plásmido especificado en la parte superior. La fracción de membranas (10 µg) de cada una se aisló y separó por SDS-PAGE 10%. *Western blots* de estas fracciones se revelaron con el anticuerpo anti GumC.

En la cepa XcFC2 transformada con el plásmido pBBRpromC₂₄₋₄₇₂, que contiene la secuencia de la proteína reportada anteriormente (U22511), coexisten dos formas que son reconocidas por el anticuerpo anti-GumC. La diferencia en el peso molecular aparente entre ambas no supera los 2-3 kDa lo cual confirmaría que la nueva secuencia propuesta para GumC es la correcta (ver sección 3.1.2).

3.4 GumB y GumC son parte de un complejo transmembrana

Podemos inferir que, al igual que lo que se predice para otros polisacáridos, las proteínas responsables del transporte del xantano formarían un complejo transmembrana. Teniendo en cuenta las propiedades estructurales, su localización subcelular y que ambas proteínas son necesarias para la exportación del xantano, los candidatos más probables para formar parte de un posible complejo son GumB y GumC.

3.4.1 GumB y GumC forman oligómeros en la bacteria

Para determinar la existencia de alguna asociación entre ambas proteínas se realizaron ensayos de entrecruzamiento con formaldehído en células enteras de *X. campestris*. Este reactivo es una molécula pequeña capaz de formar polímeros de diferente largo (126) y por lo tanto, puede unir polipéptidos que se encuentran a distancias variables unos de otros. Además, la unión entre las proteínas puede ser revertida calentado las muestras a 100°C.

Para estos experimentos se utilizaron células de la cepa Xc1231(pBBR5-BC) que sobreexpresa ambas proteínas en ausencia de las otras proteínas del operón *gum*. En los *immunoblots* revelados con el anticuerpo anti-GumB (Fig. 23A) se observan 2 bandas de peso molecular aparente de ~ 47 kDa y ~90 kDa que desaparecen al calentar las muestras a 100°C sugiriendo que son el resultado del entrecruzamiento por formaldehído. En las mismas muestras reveladas con el anticuerpo anti-GumC (Fig. 23B) se observan por lo menos 2 bandas de peso molecular aparente de ~120 kDa y ~140 kDa. Ninguna se corresponde con las detectadas por el anticuerpo anti-GumB lo que indicaría que en estas condiciones experimentales tanto GumB como GumC pueden formar multímeros pero en ellos no participan las dos proteínas a la vez.

Para determinar la naturaleza de estos multímeros se realizaron ensayos en la cepa Xc1231 transformada con plásmidos que expresan cada proteína por separado. En la cepa Xc1231(pBBR5-B) solo se observa la banda de ~47 kDa que correspondería al dímero de GumB mientras que en la cepa Xc1231(pBBpromC) se detectan las mismas bandas de ~120 kDa y ~140 kDa aunque con menor intensidad. Estas especies corresponden aproximadamente a dos y tres veces el peso molecular de GumC. Estos resultados sugieren que ambas proteínas pueden entrecruzarse para formar por lo menos homodímeros mientras que GumB podría formar tetrámeros (banda ~90 kDa) siempre y cuando GumC esté presente.

Dado que el éxito en la unión entre dos proteínas en estos ensayos se debe en parte a la distancia que las separa, se utilizó glutaraldehído (HOC CH₂ CH₂ CH₂ COH) cuya cadena carbonada permite el entrecruzamiento de proteínas que se encuentran a una mayor distancia. En las condiciones ensayadas, los resultados para GumC son similares a los obtenidos con formaldehído

(Fig. 23D). Sin embargo, en el caso de GumB solo se detectó la banda de ~90 kDa tanto cuando la proteína se expresa sola o se co-exprime con GumC (Fig. 23C).

Los resultados del entrecruzamiento sugieren que la oligomerización de GumB y GumC no depende de la síntesis del polisacárido o de la presencia de otras proteínas Gum. Cuando estos experimentos se realizaron en la cepa silvestre XcFC2 o en la cepa no productora de xantano XC405A los anticuerpos no detectaron bandas definidas sino agregados de peso molecular > 205 kDa que apenas entraban en el gel separador (datos no mostrados). Por lo tanto, aunque no parece existir una interacción entre GumB y GumC, la capacidad de asociarse a agregados muy grandes (>205kDa) sugiere la posibilidad que participen de complejos con otras proteínas Gum, como por ejemplo GumE y GumJ.

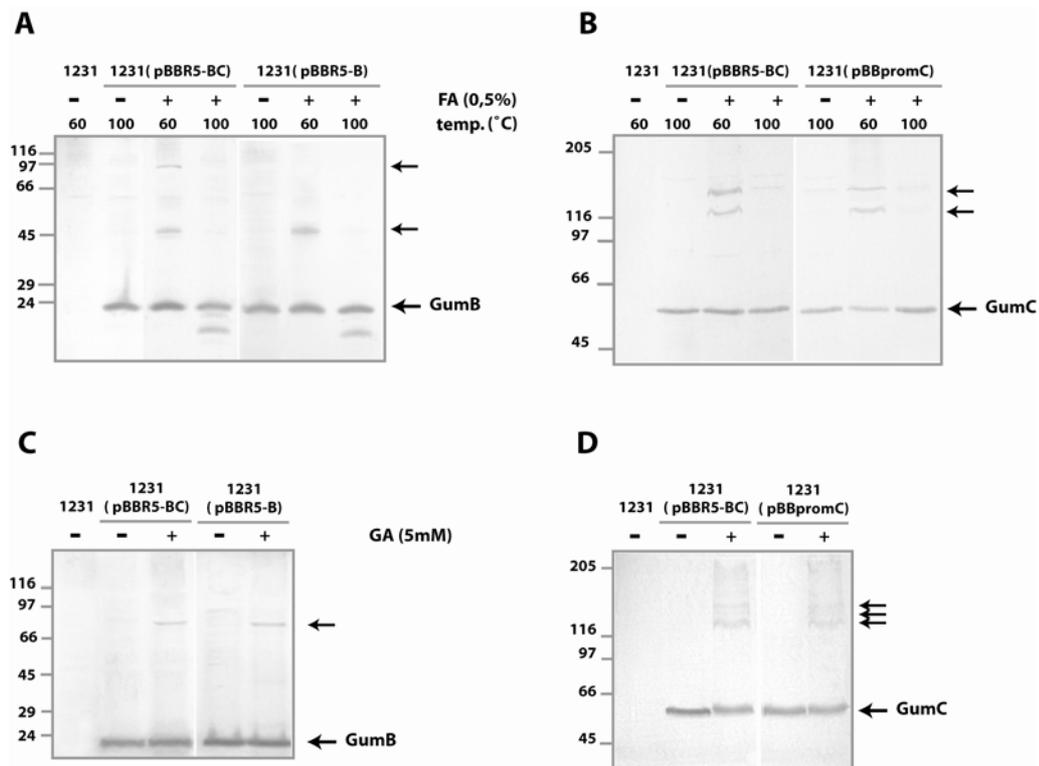


Fig. 23 Ensayos de entrecruzamiento químico *in vivo*. Se incubaron células enteras de *X. campestris* con dos agentes químicos: *FA*, formaldehído 0,5% durante 2h a 28°C (A y B) y *GA*, glutaraldehído 5mM durante 10 min (C y D). Las proteínas totales de $1-2 \times 10^8$ células tratadas (+) o no tratadas(-) se separaron en geles SDS-PAGE 7,5% y se analizaron por inmunodetección con anticuerpos anti-GumB (A y C) y anti-GumC (B y D). Las muestras tratadas con FA se separaron en dos partes las cuales se incubaron a 60°C y 100°C. Las flechas indican la posición de complejos específicos reconocidos por cada tipo de anticuerpo. La primera calle de cada gel (1231) corresponde a la cepa parental Xc1231 sin tratar.

Para verificar la existencia de estos multímeros de > 205kDa las proteínas de membrana de la cepa XcFC2 se extrajeron con Tritón X-100. Este tratamiento ha permitido purificar en *X. campestris* complejos de proteínas que atraviesan ambas membranas como por ejemplo el sistema de secreción tipo II (127). Se purificaron mediante cromatografía de intercambio aniónico utilizando un pH en el cual ambas proteínas quedan retenidas. La proteína GumB eluye entre 0,2 y 0,53 M NaCl (máximo despegado se observó con 0,27 M NaCl) mientras que GumC lo hace entre 0,2 y 0,4 M NaCl (máximo despegado se observó con 0,20 M NaCl) (Fig. 24A). Las fracciones en las que co-eluyen estas proteínas se analizaron por cromatografía de exclusión molecular en presencia de deoxicolato (Fig. 24B). Utilizamos este detergente debido al tamaño reducido de sus micelas y a que no interfiere con

las mediciones de absorbancia a 280 nm durante la corrida cromatográfica (128). El mismo perfil de elusión se observó para ambas proteínas, las cuales eluyen en el volumen muerto (>669kDa) y con un peso molecular aparente de ~276 kDa y ~175 kDa. Estos resultados sugieren que se forman en la membrana complejos multiméricos estables en los que participarían GumB y GumC.

En este punto no podemos diferenciar si se tratan de homomultímeros con características y estructuras similares o son heteromultímeros.

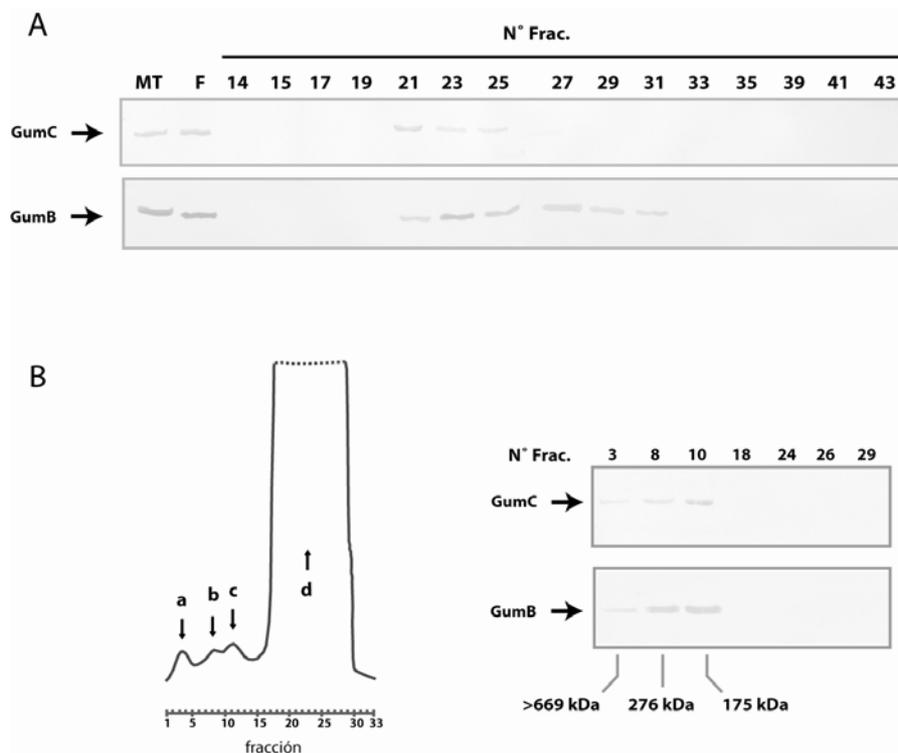


Fig. 24 Análisis cromatográfico de los oligómeros de alto peso molecular de GumB y GumC. **A)** Análisis por FPLC utilizando una columna de intercambio iónico QHiperD de las proteínas de membrana de XcFC2 en presencia de 1%(v/v) de Tritón X-100. Las proteínas se eluyeron con un gradiente de 0-1 M NaCl (fracciones 14-43). Las muestras se analizaron por SDS-PAGE 10% e inmunodetectaron con anticuerpos anti-GmB y anti-GumC. *MT*, proteínas de membrana totales, *F*, proteínas no retenidas. **B)** las fracciones de la columna donde co-eluyeron GumB y GumC (21-25) se precipitaron con sulfato de amonio y purificaron mediante FPLC en una columna de exclusión molecular Superdex HR-200 en presencia de 1% de DOC (0,5 ml/min). Fracciones representativas de los 4 picos observados en el perfil de A280nm (a-d) se analizaron por SDS-PAGE 10% e inmunodetectaron con anticuerpos anti-GumB y anti-GumC.

Cuando estos experimentos se realizaron en las cepas mutantes *gumC* (Xc405AC) y *GumB* (Xc405AB) se observó que el perfil de elusión de la columna de intercambio iónico de cada una variaba en ausencia de la otra. Así GumC eluyó a un máximo de 0,27 M NaCl mientras que GumB lo hizo a 0,53M NaCl sin solapamiento de las fracciones de elusión. El hecho de que la interacción de ambas proteínas con la columna se modifica con la presencia o ausencia de la otra y que además co-eluyan de dos columnas con principios de separación diferentes nos permite especular que se trata de heteromultímeros.

3.4.2 Estabilidad de GumB y GumC en ausencia de otras proteínas gum

La presencia en membrana de heteromultímeros de alto peso molecular apoya la idea de que las proteínas involucradas en la síntesis y exportación del xantano forman un complejo transportador. Por otro lado la incapacidad de varias de las mutantes *gum* de formar el polímero (*gumB*, *gumC*, *gumE*) podría explicarse si los procesos de polimerización y transporte estuvieran ligados a un complejo proteico, ya que la deficiencia de cualquiera de los componentes del sistema impediría la ejecución de estos procesos.

Para identificar posibles componentes de este sistema se estudió la estabilidad de las proteínas GumB y GumC en las diferentes mutantes del operón *gum* (Fig. 25). Como era de esperarse las mutantes *gumB* y *gumC* afectan, aunque parcialmente, la estabilidad de la otra. Las mutaciones en las glicosiltransferasas GumM, GumK y GumI o en las acetiltransferasas GumF y GumG no parecen afectar la estabilidad de GumB y GumC en las células. En cambio la ausencia de GumE reduce los niveles de ambas proteínas siendo casi nulo para GumC. Se propuso a GumE como posible polimerasa del sistema (129), por lo tanto este dato refuerza la teoría del complejo de polimerización/exportación. En el caso de GumC otras dos mutantes afectan parcialmente los niveles de proteína detectados. Estas son la glicosiltransferasa I GumD y la piruviltransferasa GumL.

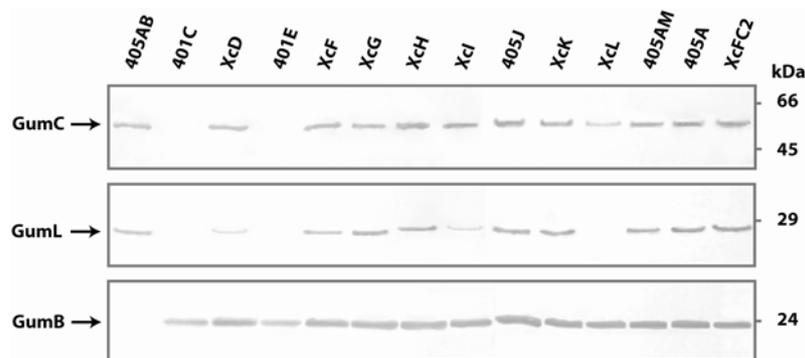


Fig. 25 Presencia de GumB y GumC en mutantes *gum* de *X. campestris* (Tabla 10, materiales y métodos). Cantidades iguales de lisados de células mutantes en cada uno de los genes del operón *gum* se separaron por SDS-PAGE 10% y se analizaron por *Westernblot* utilizando anticuerpos anti-GumC (panel superior), anti-GumL (panel medio) y anti -GumB (panel inferior)

Este último dato es llamativo puesto que se ha demostrado que la piruvilación de la unidad repetitiva no es indispensable para la polimerización del xantano (111). Sin embargo, observamos que la estabilidad de esta proteína en las demás mutantes *gum* se ve afectada por la ausencia de GumC, GumE, GumD y GumI, la glicosiltransferasa V.

En otros sistemas de transporte, como por ejemplo el CPS tipo II de *E. coli*, la localización subcelular de uno de sus componentes está determinada por la presencia de otras proteínas (25). KpsD se localiza en ME, MI y periplasma en la cepa silvestre y la ausencia de KpsE, Lpp (lipoproteína mayoritaria de ME) o el polisacárido a transportar modifica la proporción de KpsD en cada compartimiento. Dadas las similitudes entre GumB y KpsD y los resultados obtenidos anteriormente, se analizó la localización subcelular de GumB en ausencia de los otros posibles componentes del sistema de transporte del xantano. Para ello se purificaron las fracciones subcelulares de membrana, citoplasma y periplasma de las cepas Xc401C y Xc401E (Fig. 26A) por extracción con buffer TEX

(130). Este método es igual de efectivo que los métodos tradicionales (shock osmótico o tratamiento con lisozima-EDTA) pero con la ventaja de ser más rápido y fácil de realizar. En las tres cepas analizadas GumB se detectó en las fracciones de periplasma y preferentemente en la de membranas. Sin embargo la ausencia de GumC y particularmente GumE favorece la localización en membranas. Al contrario de lo que ocurre con KpsD, la falta de polímero a transportar no parece influir en la distribución subcelular de GumB tal como se ve en la cepa Xc401.

La localización de GumB tanto en periplasma como en MI y ME sugiere que esta proteína podría actuar de nexo entre ambas membranas. Proteínas de la familia de las pseudopilinas, como por ejemplo PulG de *Klebsiella oxytoca*, forman estructuras tipo pilus las cuales se ha propuesto que conectan las MI con la ME de forma que las proteínas son secretadas al medio extracelular (131).

Una posible explicación para la función de GumB es la formación una estructura periplasmática que conecte ambas membranas. Para determinar si GumB puede formar una estructura similar, se analizó la fracción de periplasma extraída por TEX de la cepa XcFC2 (Fig. 26B).

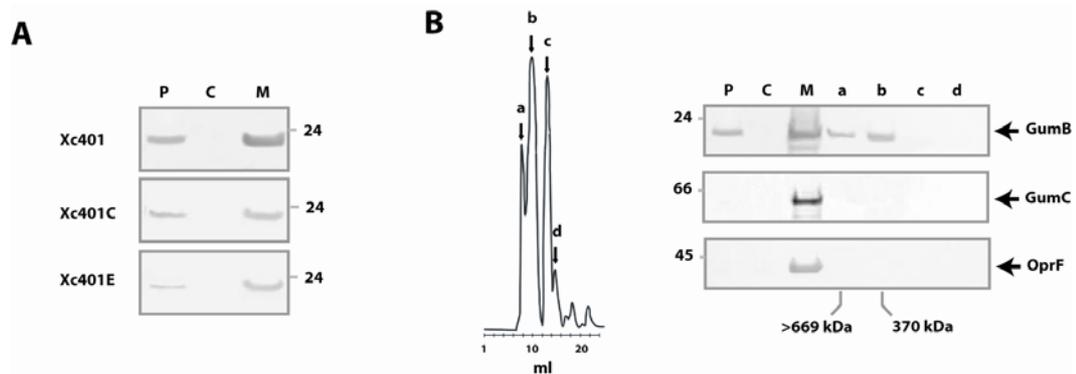


Fig. 26 Localización subcelular de GumB en ausencia de otras proteínas Gum. **A)** las fracciones subcelulares obtenidas por extracción con buffer TEX de la cepa XcFC2, Xc401C y Xc401E se analizaron por SDS-PAGE 10% e inmunodetección con anticuerpos anti-GumB. *P*, periplasma (fracción con el 75% de actividad de fosfatasa alcalina), *C*, citoplasma y *M*, membranas totales. **B)** La fracción periplasmática de la cepa XcFC2 se analizó por FPLC utilizando una columna de exclusión molecular Superdex S-200 equilibrada con buffer TEX (0,5 ml/min). Fracciones representativas de los 4 picos observados en el perfil de A280nm (a-d) se analizaron por SDS-PAGE 10% e inmunodetectaron con anticuerpos anti-GumB, anti-GumC y anti-OprF (marcador de ME).

GumB eluye de la columna con el volumen muerto (pico a, > 669 kDa) y como un oligomero de ~370 kDa. En estas estructuras no participa GumC por lo tanto son el resultado de la interacción con otras proteínas del periplasma o bien se trata de homomultímeros de 16 unidades de GumB.

En conjunto los datos presentados en esta sección, evidencian la interacción de las proteínas responsables de la polimerización y exportación (GumB, C y E) y aún más, indican la existencia de una interacción entre el sistema de transporte y el sistema de síntesis de la unidad repetitiva a través de GumD, GumI y GumL.

3.5 Función de GumB y GumC

3.5.1 Expresión de GumB y GumC durante el crecimiento

La síntesis del xantano en la cepa silvestre se produce a lo largo de todo el ciclo de crecimiento, siendo máxima en la fase exponencial tardía (Fig. 27A). Se han reportado trabajos que postulan que solo aquellas células que han dejado de dividirse sintetizan xantano (132). Esta suposición se basa en el hecho de que los lípidos aceptores para la síntesis de la unidad repetitiva son también utilizados en la síntesis de LPS, componentes principales de la ME.

A partir de estos datos nos preguntamos si alguno de los componentes del sistema de transporte/polimerización posee una expresión transiente o si su expresión es constitutiva. Los dos primeros genes del operón *gum* son los que codifican para GumB y GumC. Los niveles de ambas proteínas se analizaron durante el crecimiento de XcFC2. La Fig. 27 muestra que mientras la síntesis del xantano llega a un máximo a las 21 h de iniciado el cultivo (Fig 27A), las proteínas GumB y GumC están presentes a lo largo de toda la curva de crecimiento, a niveles casi constantes (Fig 27B).

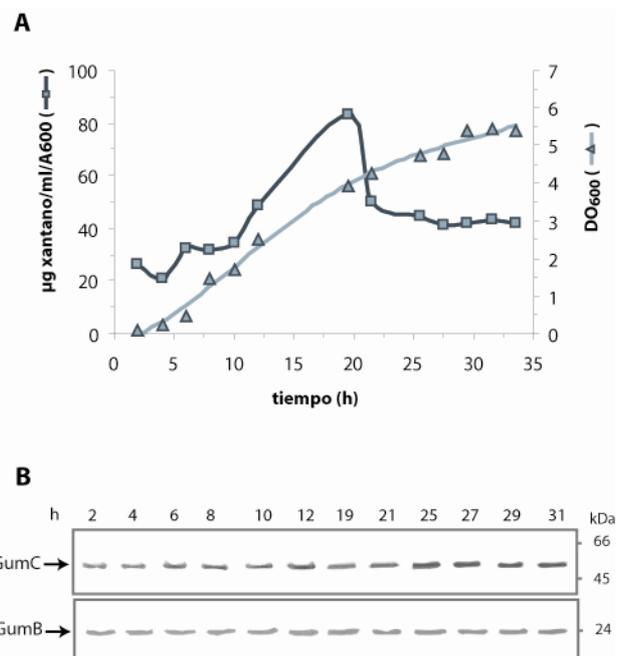


Fig. 27 Expresión de GumB y GumC durante el crecimiento. La cepa XcFC2 fue cultivada en medio XOL a 28°C. Se tomaron muestras a intervalos de tiempo regulares para la determinación de **A)** curva de crecimiento y concentración de xantano (medido por el método colorimétrico de los ác. urónicos y normalizado por DO), y **B)** expresión de GumB y GumC. Los extractos totales de proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunodetección con anticuerpos policlonales específicos para cada proteína (en cada calle se sembró igual cantidad de proteínas).

3.5.2 Complementación de mutantes *gumB* y *gumC* en *X. campestris*

La inactivación no polar de los genes *gumB* y *gumC* solo puede llevarse a cabo sin resultar letal en cepas con deficiencias en la síntesis de los nucleótido-azúcares precursores (99). La acumulación de los intermediarios biosintéticos del xantano sería la causa de esta letalidad (99)(133). Las mutantes con las que contábamos en el laboratorio fueron construidas en una cepa deficientes en la actividad uridina 5'-difosfoglucosa pirofosforilasa (Xc3192). Sin embargo, estas mutantes resultaron tener una tercera mutación en el gen *gumD*, lo que hacía necesario complementar la cepa con tres

plásmidos distintos. Por esta razón se construyeron dos nuevas mutantes en un entorno genético donde la glucosiltransferasa I (*gumD*) se encontrara intacta (*Xc405A*, *UDP-Glc pirofosforilasa*).

Se interrumpieron los genes *gumB* y *gumC* por integración plasmídica dando origen a las cepas *Xc405AB* y *Xc405AC* (Tabla 10, capítulo 5). Dado que estas cepas tienen bloqueada la síntesis de las unidades repetitivas *in vivo*, la capacidad de cada una de ellas de producir xantano se evaluó mediante un análisis *in vitro*. Células permeabilizadas de cada mutante fueron incubadas con UDP-Glc, GDP-Man y UDP-[¹⁴C]GlcA. Se eligió como dador caliente el UDP-GlcA porque es el único que no es utilizado en *X. campestris* para la síntesis de otros polisacáridos. Se analizó tanto la formación de unidades repetitivas pentasacáridicas como la producción de polímero *in vitro*. Estudios previos demostraron que las unidades repetitivas pentasacáridicas corresponden al pico que migra entre maltopentosa y maltohexosa en una cromatografía en papel descendente mientras que el xantano queda excluido de la columna Bio-Gel A-5m (4). Los resultados muestran que ambas cepas mutantes acumulan las unidades repetitivas completas pero son incapaces de producir xantano en los mismos niveles que la cepa parental (Fig. 28A y B).

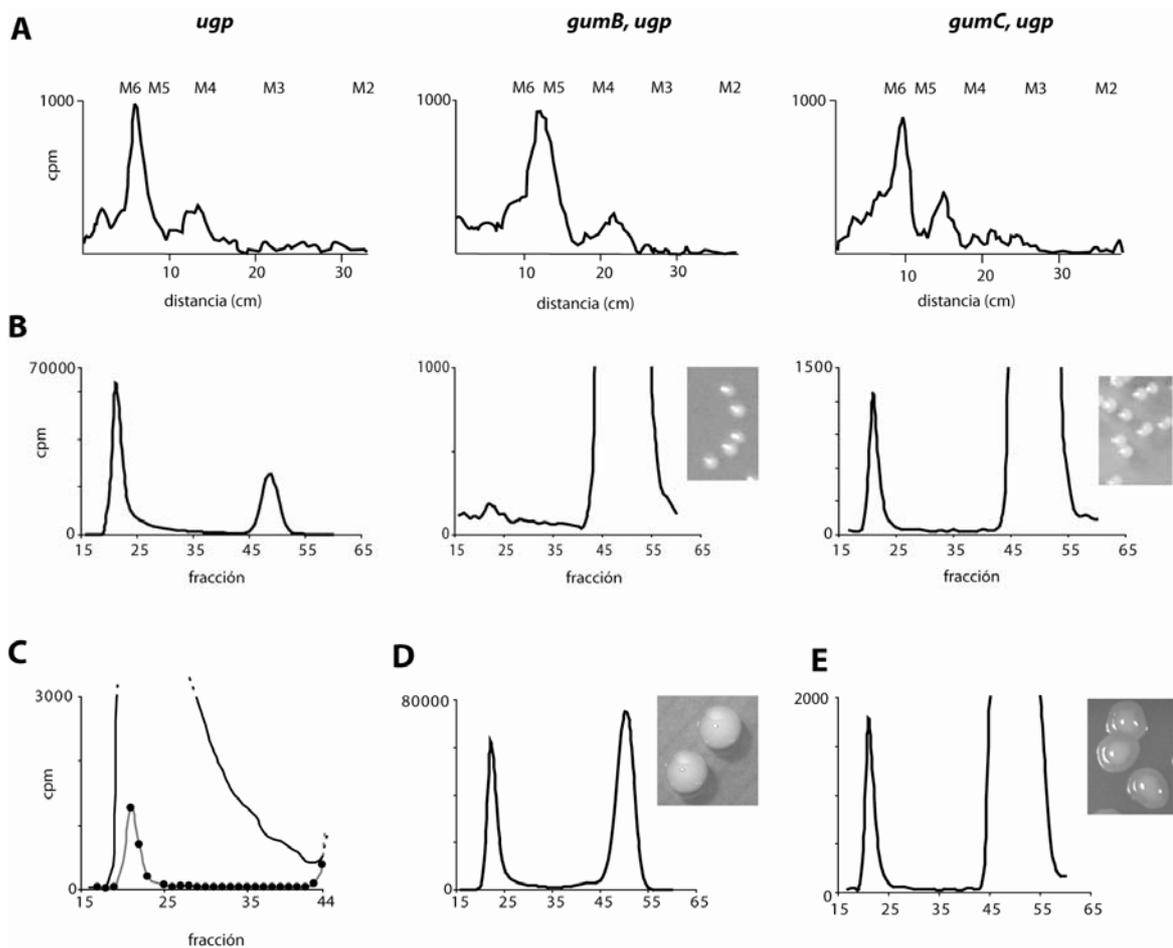


Fig. 28 Caracterización de las mutantes *Xc405AB* y *Xc405AC*. Células permeabilizadas de cada cepa fueron marcadas con UDP-[¹⁴C]GlcA en presencia de UDP-Glc y GDP-Man. En la parte superior se indican los genotipos de las cepas. **A)** Los extractos 1203 (lípidos-azúcares intermediarios) fueron sometidos a una hidrólisis suave y posteriormente a una cromatografía descendente en papel en solvente A como se indica en materiales y métodos. Se utilizaron como estándares internos maltooligosacáridos (M2-M6). **B)** Filtración por gel de los polímeros sintetizados *in vitro*. Los sobrenadantes acuosos fueron filtrados a través de una columna de Bio-Gel A-5m con un flujo de 0,25 ml min⁻¹. La radiactividad fue determinada por centelleo líquido. **C)** detalle del pico de elusión del xantano en las cepas *Xc405A* (línea continua) y *Xc405AC* (●). Filtración por gel de los polímeros sintetizados *in vitro* por las cepas *Xc405AB*(pBBR5-B) **(D)** y *Xc405AC*(pBBRpromC) **(E)**. *Insets*, morfología de las colonias mutantes *gumC* y *gumB* (B) y de las mutantes complementadas con los plásmidos pJC440, pBBR5-B (D) y pJC440, pBBRpromC crecidas en placas YM-agar a 28°C durante 4 días. Todas se hallan en la misma escala.

Como se explico en la sección 1.3.1, las moléculas de xantano presentan un rango de tamaño cuyo peso molecular promedio sería 4×10^6 Da, lo cual explica que eluyan de la columna Bio-Gel A-5m con un perfil particular. Este perfil se caracteriza por tener un pico máximo de elusión cercano al volumen muerto seguido por una “cola” que se extiende a lo largo de la columna igual al que se observa para la cepa Xc405A. La mutante *gumC* sintetiza un polímero que co-eluye en la misma posición que la cepa Xc405A, pero no presenta la cola posterior (Fig. 28C). En ensayos *in vitro*, el plásmido pBBR5-B complementa a la mutante Xc405AB en niveles similares a los de la cepa parental (Fig. 28D). En cambio, la complementación de la cepa Xc405AC con el plásmido pBBRpromC no restituye la síntesis de xantano a los niveles parentales (Fig. 28E). Para evaluar la complementación de estas cepas *in vivo*, se co-transformaron las mutantes con el plásmido pJC440 que codifica para la UDP-Glc pirofosforilasa.

La cantidad de polímero secretado al medio de cultivo luego de 4 días se cuantificó por el método gravimétrico. Al igual que en los ensayos *in vitro*, solo el plásmido pBBR5-B fue capaz de restituir la síntesis de xantano. El análisis morfológico de las cepas complementadas crecidas en medio sólido reveló algunas particularidades. Las colonias de Xc405AB(pBBR5-B, pJC440) son semiesféricas, brillantes y con un tamaño de entre 6-8 mm, morfología típica de una cepa de *X. campestris* productora de xantano. Mientras que las colonias de Xc405AC(pBBRpromC, pJC440) presentan un halo mucoso rodeando la colonia (*insets* de la Fig. 28D y E). Teniendo en cuenta que esta cepa es capaz de polimerizar el polisacárido *in vitro* podemos decir que el halo observado es xantano cuya acumulación se ve favorecida por el crecimiento estático de las bacterias.

Si bien por *Western blot* no se detectó proteína GumC en la cepa Xc405AC, el interposón que interrumpe el gen deja intactos los primeros 350 aa de la proteína. Es probable que si las proteínas de exportación/secreción forman un complejo, esta proteína truncada de origen cromosómico ejerza una dominancia negativa sobre la copia plasmídica, suficiente como para interferir en la formación de complejos funcionales. Este tipo de interferencia ha sido reportado para varias proteínas involucradas en sistemas de transporte (123).

Para corroborar esta hipótesis se construyó una mutante *gumC* por delección cromosómica del gen completo. Se utilizó la cepa Xc401 la cual carece de actividad fosfomano-fosfoglucomutasa (*xanA*) (112). La cepa generada, Xc401C, acumula las unidades repetitivas completas (dato no mostrado) pero es incapaz de producir xantano (Fig. 29). Este entorno genético era óptimo para el estudio de la función de GumC.

Se complementó la cepa Xc401C con las construcciones que codifican las distintas mutantes truncadas de GumC (Fig. 22) y se analizó la capacidad de polimerización *in vivo* e *in vitro*. Los primeros ensayos realizados mostraban una gran variabilidad y hasta contradicciones en los resultados obtenidos para una misma cepa. Cuando se realizó un análisis morfológico más detallado se observó que para ciertos plásmidos un mismo evento de complementación generaba dos tipos de colonias que por su tamaño se denominaron chicas (S) y grandes (L). Las diferencias entre ambas eran más notables en los primeros días de incubación (fase logarítmica media) lo que llevó al error de utilizar poblaciones heterogéneas en los primeros ensayos. En algunos casos se pudo comprobar que la diferencia entre ambas residía en rearrreglos genéticos que sufría el plásmido introducido. En la Fig. 29 se muestran los resultados obtenidos al estudiar las complementaciones de las distintas proteínas truncadas teniendo en cuenta las características morfológicas de las colonias.

(continuación leyenda Figura 29) Se analizó la morfología de las colonias resultantes crecidas en medio sólido por tipo y tamaño, mucosidad relativa (+++, muy mucosa; - seca) y forma. Células permeabilizadas de esta cepas se incubaron con UDP-[¹⁴C]GlcA en presencia de UDP-Glc y GDP-Man. Los polímeros sintetizados *in vitro* fueron filtrados a través de una columna de Bio-Gel A-5m con un flujo de 0,25 ml min⁻¹. La radiactividad fue determinada por centelleo líquido. En las complementaciones con las distintas mutantes de la proteína GumC, el plásmido base es el pBBRprom. Se acortaron los nombres para facilitar la comprensión de la figura (por ej, *p_{prom}C*, corresponde al plásmido pBBRpromC).

En este caso, el plásmido pBBRpromC fue capaz de complementar la mutante tanto *in vitro* como *in vivo* aunque no a los mismos niveles que la cepa parental. Estos datos corroboran que los resultados de la complementación de la cepa Xc405AC se deben a la interferencia de la proteína cromosomal truncada. La falta de cualquiera de los dominios transmembrana hace que la complementación sea parcial como se observa con las proteínas GumC₁₋₄₄₇, GumC₂₄₋₄₄₇ y GumC₅₃₋₄₇₂. Los primeros 23 aa (GumC₂₄₋₄₇₂) no parecen afectar la complementación *in vitro* pero si lo hacen *in vivo*. Una posible explicación es que en el sistema de células permeabilizadas utilizadas para la polimerización *in vitro*, la integridad de alguno de los compartimentos subcelulares esté afectada facilitando la interacción de moléculas que en la célula intacta no sucede (como por ejemplo entre proteínas mal localizadas).

Un caso singular presenta la complementación con el plásmido pBBR5-BC. Si analizamos la complementación mediante la polimerización *in vitro* observamos que la formación de polímero es mayor o igual que al complementar con la proteína GumC únicamente, y además se restituye el perfil de elusión característico de la cepa silvestre (Fig. 30C). Sin embargo, el análisis de la polimerización *in vivo* muestra una complementación pobre; esto, según resultados previos, parece favorecer la estabilidad de GumC y su localización en membrana. El tiempo de duplicación de esta cepa es mayor que la de las otras cepas complementadas. Dado que la acumulación de xantano alrededor de la bacteria es función del tiempo, incubando las colonias por períodos más largos se esperarían resultados similares. Ya que en los ensayos *in vitro* se parte de células casi en estado estacionario esta variable no influye en la síntesis del polímero.

Aparentemente la heterogeneidad morfológica está ligada a la presencia de la proteína GumC completa o la presencia del segundo STM2. El rearrreglo que sufren los plásmidos que las codifican podría indicar que la sobre-expresión de estas proteínas afecta la viabilidad de la bacteria, probablemente por tratarse de proteínas de membrana.

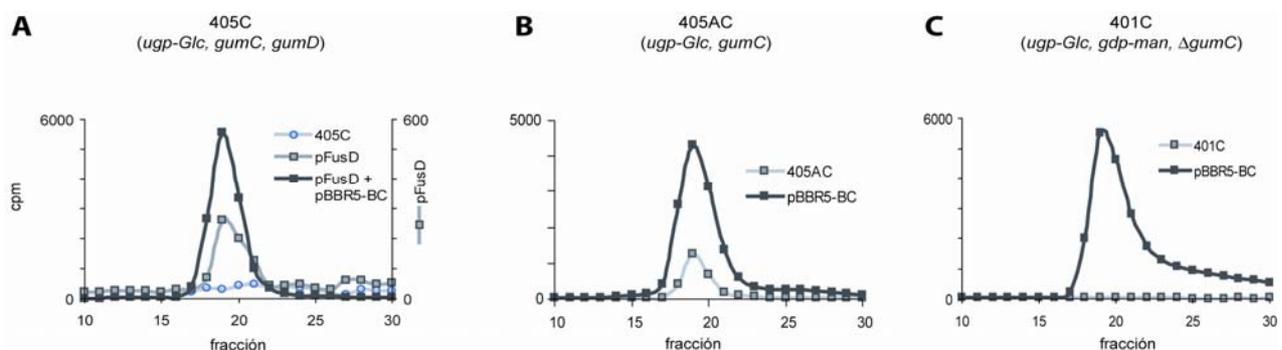


Fig. 30 Interacción funcional entre las proteínas GumC y GumD. Filtración por gel de los polímeros sintetizados *in vitro* por las cepas **A)** Xc405, Xc405(pFusD) y Xc405(pFusD, pBBR5-BC), **B)** Xc405AC y Xc405AC(pBBR5-BC) y **C)** Xc401C y Xc401C(pBBR5-BC). Las células permeabilizadas fueron incubadas con UDP-[¹⁴C]JaLCA, UDP-Glc y GDP-Man.

La mutante Xc405C(pCD2) es incapaz de sintetizar polímero *in vitro* (99), aún en presencia del plásmido que complementa la mutación *gumC* (pBBRpromC o pBBR5-BC) (datos no mostrados). El interposón que interrumpe el gen en esta cepa deja intactos los primeros 117 aa de la proteína por lo que es posible que suceda lo mismo que en la cepa Xc405A. Sin embargo, cuando la misma mutante fue complementada con el gen *gumD* completo (pFusD) se observó síntesis de polímero, que aumentó con la complementación adicional de *gumC* (Fig. 30A) de la misma forma que con la copia cromosomal de *gumD* (Fig. 30B).

Estos resultados sugieren que GumD, en particular el dominio amino terminal, interacciona de alguna manera con los primeros 120 aa de GumC. Y además que la región amino terminal de GumC parece ser suficiente para que se produzca la polimerización del xantano *in vitro* aunque se necesita de la proteína completa para que la síntesis del polímero presente su perfil de elusión característico (Fig. 30C) y se produzca la síntesis *in vivo*.

La modulación del perfil de elusión por parte de GumC estaría indicando un rol en la determinación del largo de cadena del xantano o de una actividad de co-polimerasa. La interacción con la polimerasa del sistema se produciría en la región amino terminal de GumC mientras que la regulación del largo de cadena del polímero se encontraría en la región carboxilo terminal.

3.5.3 Regulación del largo de cadena del xantano

Se ha demostrado que la amplificación de los genes que participan en la biosíntesis de EPS afecta tanto la síntesis como el rendimiento de los polímeros. En *X. campestris* el proceso de síntesis es muy eficiente, con el 60-80% de la glucosa del medio de cultivo convertida a EPS. Sin embargo Harding y colaboradores obtuvieron un 10-15% de aumento en la productividad del xantano mediante la transformación de la cepa silvestre con un plásmido que contiene parte de la región *gum* (135). En *Sphingomonas* S-7 la amplificación de los genes *sps* produjo un 20 % de aumento en el rendimiento del esfingano y en la viscosidad del medio de cultivo. Este cambio en la viscosidad se vió acompañado por un cambio en la composición del polímero secretado (136).

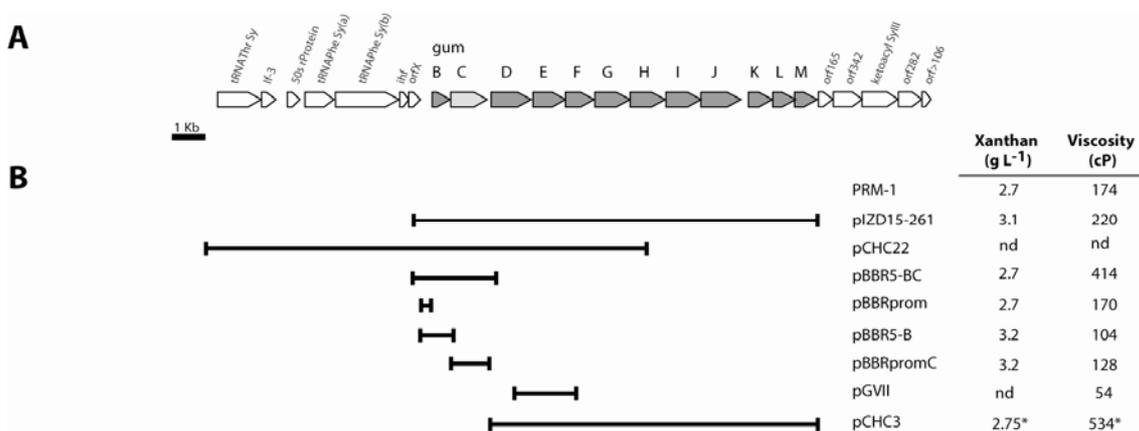


Fig. 31 Efecto de la amplificación génica en la producción de xantano. A) Mapa físico de la región *gum* (gris) y las regiones cromosomales lindantes en *X. campestris*. **B)** Plásmidos utilizados para evaluar la contribución del dosaje génico. A la derecha, determinación de la producción y viscosidad aparente del xantano producido por cada cepa en el medio SSF luego de 72 h. * En este caso se utilizó como cepa control a XcRCM-1 (2.6 g L⁻¹; 270 cP)

Si GumC posee una actividad de co-polimerasa e interacciona con otras proteínas del operón, la estequiometría sería importante para la función del complejo. Un desbalance en la expresión de las proteínas involucradas podría causar alguna alteración en la producción del polímero.

Para corroborar esta hipótesis se introdujeron en la cepa silvestre PRM-1 distintas construcciones que contienen el gen *gumC* solo o acompañado por otros genes de la región *gum* (Fig. 31). Se evaluó la producción y la viscosidad aparente del polímero producido por estas cepas *in vivo* en un medio de cultivo definido optimizado para la máxima producción de polímero. Ninguno de los plásmidos introducidos afectó los parámetros estudiados con excepción de pBBR5-BC. Este plásmido aumenta la viscosidad casi 2,5 veces mientras que la cantidad de polímero producido permanece como el control. La co-expresión de las proteínas GumB y GumC parecería necesaria, ya que cada una de las proteínas por separado no fue suficiente para generar el incremento observado.

Tabla 8 Análisis de la composición del xantano

	Glucosa %	Manosa %	Piruvato ^a %	Acetato ^b %	Mr (g/mol) ^c
PRM-1	22	15	3,9	4,7	4,76x10 ⁶
PRM-1/ pIZD15-261	25	15	4,8**	4,1**	4,61x10 ⁶
PRM-1/ pBBR5-BC	23	14	2,5**	4,9	6,27x10 ⁶ **

^a Calculado como ácido pirúvico (M.W. 88.1); ^b Calculado como ácido acético (M.W. 60.1)

^c El peso molecular promedio se calculó a partir de la viscosidad intrínseca utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada, donde $K = 1.70 \times 10^{-4}$ ml/g y $a = 1.14$.

** Diferencia significativa con respecto a la cepa silvestre (*t*-test de Student, $P < 0.05$)

Como se detalló en la sección 1.3.1 la viscosidad de una solución de polisacárido depende tanto de la concentración como de las características estructurales del polímero. Por lo tanto, si la cantidad de xantano producido no varía, el incremento en la viscosidad obtenido con pBBR5-BC podría deberse a un cambio en la estructura del xantano. Se analizó entonces la composición del polisacárido (Tabla 8).

Tabla 9 Tamaño de las moléculas de xantano

	Cadenas totales (n)	Largo de cadena (L)		Índice de dispersión L_w/L_n
		media numérica L_n (μm)	media pesada L_w (μm)	
PRM-1	437	0.91	1.28	1,40
PRM-1/pBBR5-BC	528	1.49**	2.59**	1,74

$$L_n = \frac{\sum n_i L_i}{\sum n_i} \quad \text{y} \quad L_w = \frac{\sum n_i L_i^2}{\sum n_i L_i}$$

** Diferencia significativa con respecto al control (*t*-test de Student, $P < 0.05$)

La relación glucosa/manosa y el contenido de acetato no variaron con respecto al control, mientras que el contenido de piruvato disminuyó un 30% aproximadamente. La influencia del contenido de grupos cetil piruvato y acetato en la capacidad viscosificante del xantano es

controversial (16). Sin embargo, estudios recientes (137; 138), sugieren que no existe una correlación entre ambas de modo que las diferencias podrían atribuirse a un cambio a nivel molecular.

El peso molecular de un polímero es proporcional a la viscosidad intrínseca $[\eta]$ de la solución cuando se mide a la misma temperatura y con el mismo solvente. La viscosidad intrínseca del xantano de la cepa PRM-1(pBBR5-BC) es mayor que la de la cepa control (Fig. 31) lo cual se correlaciona con moléculas de mayor peso molecular (Tabla 8).

Uno de los factores que más influencia tiene sobre $[\eta]$ es el volumen hidrodinámico efectivo de los polímeros en solución (139). Este significa que el xantano producido por la cepa PRM-1(pBBR5-BC) tiene una masa molecular mayor o bien en solución asume una conformación espacial diferente a la del control. Para diferenciar entre estas dos posibilidades se analizaron las moléculas de xantano por microscopía de fuerza atómica (AFM). Como se observa en la Fig. 32 las moléculas de la cepa control parecen varillas rígidas mientras que en la cepa PRM-1(pBBR5-BC) son más flexibles, se enrollan y hay una proporción de moléculas más largas. En una solución salina el xantano adopta una estructura de doble hélice (Camerano, 2001). Sin embargo las moléculas de de la cepa PRM-1(pBBR-BC) son más delgadas, como una hebra simple.

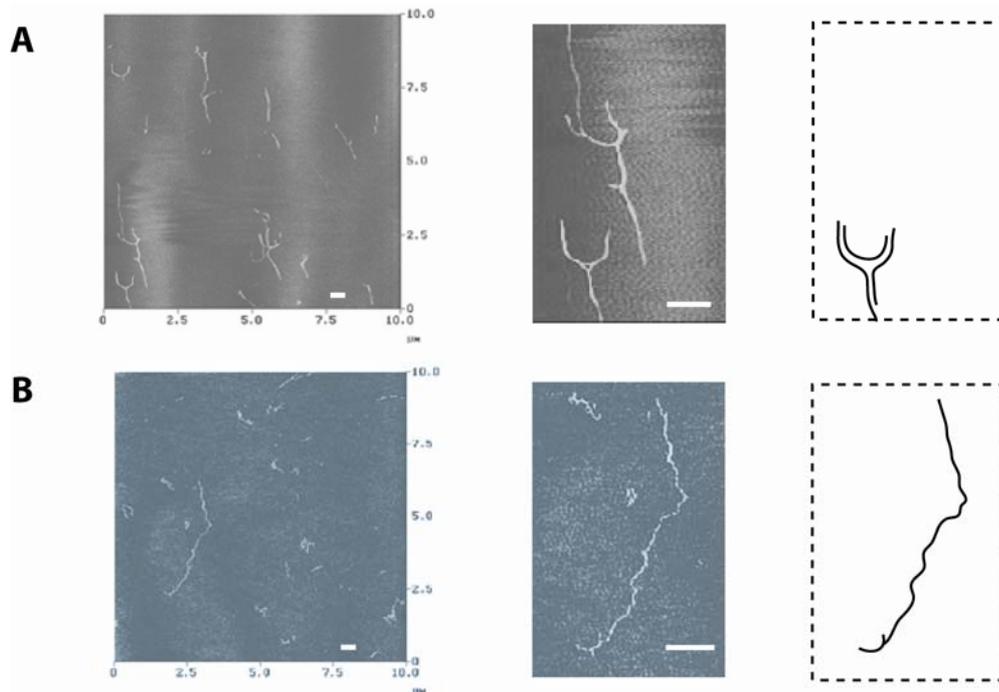


Fig. 32 Análisis de las moléculas de xantano por AFM. Imágenes representativas de **A)** PRM-1 y **B)** PRM-1(pBBR5-BC) en 0,1M AcNH₄ absorbidas en mica. *Izquierda*, vista general de varias moléculas, *medio*, ampliación de una molécula de xantano, *derecha*, esquema de la molécula ampliada. Las barras representan 0,5 μm.

Existen varias maneras de caracterizar el tamaño de la cadena de un polímero en forma cuantitativa. Si consideramos que el polímero está formado por N vectores rígidos cada uno con una longitud b, una de ellas se denomina largo de cadena, L (*contour length*), donde $L = N \times b$. Este parámetro tiene un valor fijo independientemente de la conformación de la cadena (138). El xantano en la cepa que contiene el plásmido pBBR5-BC resultó un 50% más largo que el control (Tabla 9). El aumento del índice de dispersión indica que la distribución del tamaño de las moléculas ha cambiado tal con se ve en la Figura 33.

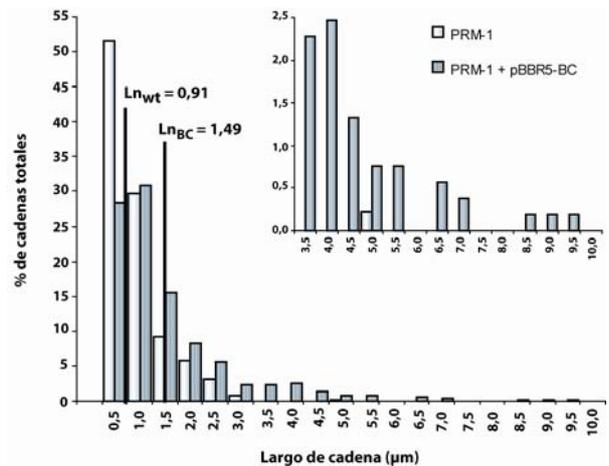


Fig.33 Distribución del largo de cadena de las moléculas de xantano. Las soluciones se prepararon en 0.1M AcNH₄. Las categorías incluyen moléculas con una longitud menor o igual a la indicada. *Inset*, ampliación de las categorías 3,5-10.

Bajo estas condiciones experimentales en la cepa control el 51% de las moléculas presenta un tamaño \leq a 500 nm. En la cepa PRM-1(pBBR5-BC) solo el 28 % de las moléculas pertenece a esta categoría mientras que aumenta la proporción (8%) de moléculas más largas, de entre 3000-4500nm y aparecen otras cuyo tamaño es 9 veces el del promedio de la cepa control.

La variación en la distribución del largo de cadena de las moléculas de xantano, con la aparición de una proporción importante de moléculas de mayor tamaño solo se observó cuando se co-expresaron únicamente las proteínas GumB y GumC, más aún, solo se obtuvo con el plásmido pBBR5-BC. Ningún otro plásmido que codificara para ambas proteínas, pZD15-261 y pCHC22, fue capaz de reproducirlo. Los plásmidos utilizados en esta serie de experimentos fueron diseñados o elegidos de tal forma que los genes a estudiar se encontraran bajo el mismo promotor, el promotor de la región *gum*. De esta manera evitamos diferencias en la transcripción de cada construcción.

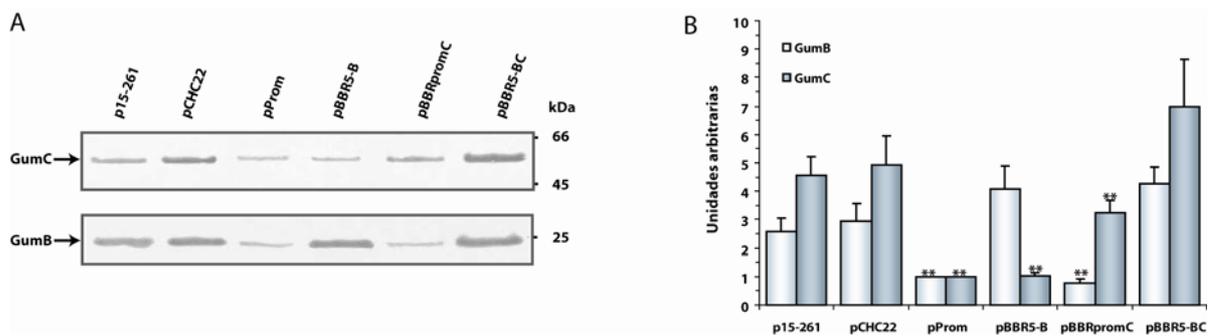


Fig. 34 Expresión de GumB y GumC plasmídicas en *X. campestris*. La cepa PRM-1 se transformó con los plásmidos indicados. Los *immunoblots* de proteínas totales (30 µg) revelados con anticuerpos anti-GumB y anti-GumC (A) se cuantificaron y los valores se normalizaron con respecto a la cepa PRM-1(pBBRprom) (B). La barra de error representa la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. ** diferencias significativas con respecto a las otras categorías de la misma serie (ANOVA, t-test de Student $P=0.05$).

Sin embargo el número de copias de los plásmidos utilizados es variable por lo que los niveles de expresión de las proteínas podrían ser diferentes en cada caso. Para determinar si existe una diferencia de expresión de cada una de las proteínas a partir de los distintos plásmidos, se cuantificaron *immunoblots* de las proteínas totales de estas cepas (Fig. 34). Los resultados muestran

que no existen diferencias significativas entre las cantidades de proteína expresadas por cada plásmido, así como tampoco en la relación GumC/GumB en aquellos que co-expresan ambas proteínas (varía entre 1,65 para pCHC22 y 1,82 para pBBR5-BC). Por otro lado del análisis de estos datos también surge que GumB efectivamente afecta la estabilidad de GumC. Cuando estas proteínas se co-expresan (pBBR5-BC) la cantidad de GumC detectada es casi el doble que cuando se expresa sola (pBBRpromC).

Por lo tanto las variaciones observadas en el tamaño del polímero no pueden atribuirse a una expresión diferencial de las proteínas GumB y GumC a partir del plásmido pBBR5-BC sino a un desbalance con respecto al resto de las proteínas Gum, en particular GumE. Si las 3 proteínas se co-expresan (pCHC22) no se observan cambios en las propiedades del polímero, mientras que la expresión de GumE sola (pGVII) o acompañada por parte de las proteínas Gum (pCHC3, *gum* D - M) influye en la calidad del polímero producido. Estos resultados se complementan con los obtenidos en la sección 3.4.2 donde se analizó el comportamiento de estas proteínas en las distintas mutantes *gum*.

3.5.4 Energía del sistema

Como se detalló en la sección 1.2.2, en todos los tipos de sistemas de exportación de polisacáridos extracelulares hay involucrada una actividad ATPasa. Esta actividad asociada al transporte de macromoléculas tanto en células eucariotas como procariontas puede estudiarse mediante la incubación con vanadato (140; 141). El ión vanadato (ortovanadato, VO_4^{3-}) posee una geometría, tamaño y carga análogos al ión fosfato e induce la no liberación de los nucleótidos que quedan atrapados en el sitio activo de la enzima (142). Para determinar si existe una actividad ATPasa asociada con el proceso de polimerización/exportación de xantano se incubaron con vanadato células permeabilizadas y se analizó la capacidad para producir el xantano *in vitro*.

La presencia de vanadato durante la producción de xantano en la cepa silvestre XcFc2 solo parece afectar parcialmente la síntesis de moléculas más pequeñas (Fig. 35A), mientras que en la cepa Xc401 se produce una disminución de aproximadamente el 66% en las moléculas de mayor

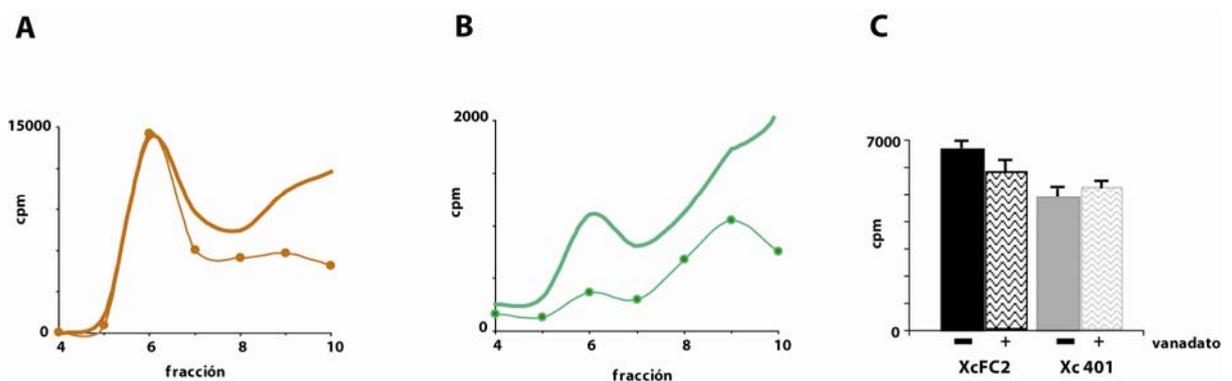


Fig. 35 Polimerización *in vitro* de xantano en presencia de vanadato. Células permeabilizadas de las cepas XcFC2 (A) y Xc401 (B) se incubaron con UDP- ^{14}C GlcA en presencia de UDP-Glc y GDP-Man con (●) o sin (-) vanadato. Los polímeros sintetizados *in vitro* fueron filtrados a través de una columna de Bio-Gel A-5m con un flujo de $0,25 \text{ ml min}^{-1}$. C) cuantificación de los lípido-azúcares intermediarios de las cepas analizadas. La radiactividad fue determinada por centelleo líquido.

tamaño (Fig. 35B). Esta cepa no puede sintetizar dos de los nucleótido-azúcares precursores, por lo tanto toda la maquinaria de síntesis del xantano se encontraría “descargada” en el momento de empezar los ensayos cosa que no ocurre en la cepa XcFC2. La presencia de vanadato en la incubación no parece afectar significativamente los niveles de lípido-azúcares intermediarios (Fig. 35C) en ninguna de las dos cepas. Las diferencias observadas podrían deberse a problemas en el ensamblado/transporte del xantano. Los resultados de estos ensayos sugieren que la hidrólisis de ATP participaría en el ensamblado del complejo de transporte más que en la reacción de polimerización propiamente dicha.

La regulación del largo de cadena en algunos sistemas de transporte de EPS está dada por la autofosforilación del dominio carboxi-terminal de la proteína MPA-1C en bacterias Gram-negativas (ExoP de *S. meliloti*) o bien en un polipéptido que contiene a este dominio en las proteínas MPA1 +C en bacterias Gram-positivas (CpsD de *S. pneumoniae*) (76, 28]. En el caso del operón *gum*, la proteína GumC está considerada como miembro de la familia MPA1 (29) sin embargo carece del dominio carboxi-terminal citoplasmático y tampoco existiría una proteína dentro del operón que complemente esta función (ver Fig 3). Dado que se observó una actividad ATPasa asociada al proceso de síntesis del xantano, se decidió buscar una proteína codificada fuera del operón con las mismas características del dominio C-terminal. Como primera aproximación se buscaron genes homólogos por PCR utilizando oligonucleótidos degenerados complementarios a las zonas más conservadas de ExoP de *S. meliloti*, Wzc_{K30} de *E. coli* y SpsE de *Sphingomonas S88*. Las secuencias de las pocas bandas amplificadas se compararon con los genomas de *X. campestris* pv. *campestris* 33913 *X. campestris* pv. *citri* 306 y *Xylella fastidiosa* 9a5c. Los resultados no fueron satisfactorios (no mostrados) ya que pertenecían a proteínas cuya función fue establecida bioquímicamente o a ORFs de operones cuya homología con otras bacterias no dejaba lugar a dudas de su posible participación en caminos metabólicos varios.

La búsqueda de proteínas homólogas a SpsE en los bancos genómicos llevó a encontrar el ORF XF2301 de *X. fastidiosa*, posible proteína involucrada en la exportación de polisacáridos. Este ORF presenta un 82% de identidad con el ORF XCC2571 de *X. campestris* el cual está ubicado a 130 kb de la región *gum* y no formaría parte de un operón. La secuencia aminoacídica presenta los motivos Walker A y B de unión a ATP, la región rica en tirosinas en el carboxi-terminal y una hélice- α conservada entre ambos característico del dominio C de las proteínas MPA1. Dadas sus características se decidió estudiar si estaría relacionada con la síntesis del xantano. Para ello se generó una mutante por delección total del gen en el entorno salvaje, Xc2571. Esta mutante es viable y sus colonias presentan un aspecto mucoso. Cuando se analizó la producción de xantano *in vivo* no se encontraron diferencias en el rendimiento ni en la viscosidad del polímero con respecto la cepa control. Por lo tanto se descartó su participación en la biosíntesis del xantano.

4.

Discusión general

4.1 Las proteínas GumB y GumC son componentes del sistema de transporte del xantano

Como se mencionó en la introducción (sección 1.3.3) el operón *gum* es el responsable del ensamblado final del exopolisacárido xantano. De las doce proteínas codificadas por este operón solo cuatro, GumB, GumC, GumE y GumJ permanecen sin asignárseles una función bioquímica. Mutantes de estos genes son capaces de acumular la subunidad lípido-azúcar completa *in vitro* pero no pueden sintetizar el polisacárido, lo que sugiere su intervención en los procesos de polimerización o exportación del xantano [Katzen, 1998 #6].

GumB es un miembro de la familia OMA (proteínas auxiliares de ME) [Paulsen, 1997 #119]. Las proteínas de esta familia están codificadas en *loci* genéticos involucrados en la producción de polisacáridos extracelulares, tales como AmsH de *E. amylovora*, EpsA de *R. solanacearum*, VexA de *Salmonella thypi* y Wza_{k30} de *E. coli*. En todos los casos, las mutaciones de estas proteínas llevan a la no expresión del polisacárido en superficie. Muchos de los miembros esta de familia poseen un péptido señal que contiene la secuencia consenso [L,V]-[A,S,T,VI]-[G,A,S]-C-[S, D] característica de lipoproteínas denominado *lipobox* [Badu, 2002 #7]. La cisteína es invariable y debe encontrarse en la posición 15 a 35 de la secuencia. Este residuo es modificado con diacilglicerol por la prolipoproteín-diacilglicerol transferasa y luego el péptido señal es cortado por la peptidasa señal II dejando a la cisteína como el primer aa de la proteína madura (Cys1). La localización de la proteína dependerá del residuo que se encuentra en la posición +2: un aspartato retiene la proteína en la MI y una serina le permite ir a la ME [Yamaguchi, 1988 #11].

La nueva secuencia de GumB reportada en esta tesis posee de un péptido señal con las características antes mencionadas el cual es procesado por la PSII dando origen a una lipoproteína de 23 kDa que no es acilada por ácido palmítico. La función de la acilación N-terminal en otros miembros de la familia OMA es controversial. No es requerida para la localización en la ME de XpsD en *X. campestris* o Wza_{cps} de *E. coli* K30. Sin embargo aunque no resulta esencial para el rol de XpsD en la secreción de proteínas si lo es para la formación de multímeros de Wza involucrados en el ensamblado de CPS [Hu, 1995 #18, Nesper, 2003 #113]. En el caso de GumB no podemos descartar que se encuentre modificada por otro tipo de ácido graso.

Aunque el residuo Ser en la posición +2 sugería una localización en membrana externa, GumB se localizó tanto en ME y periplasma como en MI. Esta distribución inusual es compartida por otras proteínas que participan en el transporte de moléculas tan diversas como el T-ADN en *A. tumefaciens* (VirB7), factores de patogenicidad en *S. thyphimurium* (InvH) o polisacáridos capsulares en *E. coli* (KpsD) [Fernandez, 1996 #41, Daefler, 1998 #12, Arrecubieta, 2001 #115]. La forma de membrana puede ser aislada como oligómeros de alto peso molecular (>100 kDa) estables en presencia de SDS y alta temperatura. Hace falta la incubación con urea para disociarlos a la forma monomérica. La formación de estos agregados no depende de la presencia del polisacárido o de otras

proteínas Gum. Agregados similares se han reportado para algunos miembros de la familia de las secretinas involucrados en el sistema de exportación de proteínas tipo II [Pugsley, 1993 #19] como por ejemplo PilQ de *N. gonorrhoeae* la cual forman estructuras anulares de 12 unidades, cuyo tamaño es de 16,5 nm de diámetro total y un poro de 6.5 nm [Collins, 2001 #21]. La lipoproteína Wzak30 de *E. coli* del sistema de transporte de CPS también forma multímeros en membrana resistentes al SDS [Drummel-Smith, 2000 #127]. Estudios de cristalización en dos dimensiones sugieren que los anillos poseen un diámetro promedio de 8.84 nm, están compuestos por 8 unidades idénticas y una cavidad central de 2.8 nm [Nesper, 2003 #113]. La diferencia en el tamaño del poro de estos complejos podría deberse al tipo de molécula a transportar. Por analogía con estas proteínas es posible que también GumB forme estructuras similares en la membrana, las cuales servirían de canales por los cuales el polímero atraviesa la membrana.

La forma periplasmática de la proteína no se halla unida covalentemente al péptidoglicano y también se encuentra agregada en multímeros de alto peso molecular. En este caso de mayor tamaño que los observados en la membrana (~370 kDa). Su formación no depende de la presencia del polisacárido y se ve disminuida en ausencia de GumC y fundamentalmente GumE. Podría tratarse de homomultímeros de 16 unidades de GumB aunque no podemos descartar la interacción con otras proteínas del periplasma. Proteínas de la familia de las pseudopilinas, como por ejemplo PulG de *Klebsiella oxytoca* y XpsD de *X. campestris*, forman estas estructuras tipo *pilus* las cuales se ha propuesto que conectan la MI con la ME [Hu, 2002 #25]. La idea de que GumB forme estos agregados en el espacio periplásmico y en la membrana es atractiva porque podría definir su función en el transporte del xantano. Por microscopía electrónica se ha podido demostrar que el polímero naciente de CPS tipo 1 es secretado en sitios donde las membranas se unen, denominados uniones de Bayer [Bayer, 1991 #22]. Por lo tanto cabe la posibilidad de que la función de GumB sea la de acercar ambas membranas para permitir la secreción del polímero. La posibilidad de producir xantano a partir de esferoplastos en células de *X. campestris* sería una evidencia fuerte a favor de esta hipótesis [Diao, 2001 #26].

GumC, es un miembro de la familia MPA (proteínas auxiliares de MI) [Paulsen, 1997 #119]. Se encuentra localizada exclusivamente en la MI con la mayor parte de la proteína expuesta al periplasma (M₅₃-K₄₃₆). A diferencia del resto de las proteínas MPA1 descritas hasta el momento no posee el dominio C que les confiere actividad tirosina quinasa. El único miembro de esta familia con el que comparte esta característica es OtnB de *V. cholerae* el cual está involucrado en la síntesis de CPS de esta bacteria Gram-positiva [Bik, 1995 #13].

La incapacidad de varias de las mutantes *gum* para formar el polímero (*gumB*, *gumC*, *gumE*) podría explicarse si los procesos de polimerización y transporte estuvieran ligados a un complejo proteico, ya que la deficiencia de cualquiera de los componentes del sistema impediría la ejecución de los pasos posteriores. La existencia de estos complejos se ha demostrado para varios sistemas entre ellos el sistema de secreción de tipo II en *X. campestris*, el sistema de secreción tipo IV de *H. pylori* y el sistema de transporte de CPS tipo II de *E. coli* K5 [Rigg, 1998 #128, Hofreuter, 2001 #17, Tsai, 2002 #22]

Los datos obtenidos por entrecruzamiento revelan que tanto GumB como GumC son capaces de formar dímeros y tetrámeros en las membranas independientemente de la presencia de otras proteínas *gum* o de la síntesis del polisacárido. No fue posible encontrar evidencia de una interacción directa entre ambas proteínas. Los mismos resultados se obtuvieron en *E. coli* K5 con el par homólogo KpsD-KpsE y en *E. coli* K12 con el par Wza_{ca}-Wzc_{ca} [Arrecubieta, 2001 #115, Doublet, 2002 #14]. Este hecho podría reflejar una interacción transiente entre ambos tipos de proteínas que no puede ser detectado por el entrecruzamiento químico y/o estar mediado por otras proteínas o el polisacárido a transportar. Sin embargo en la cepa salvaje GumB y GumC forman parte de oligómeros de alto peso molecular que pueden ser purificados de las membranas tal como se vio en los ensayos de solubilización con Tritón X-100. Si bien estos datos son consistentes con una interacción mediada por otras proteínas *gum* y/o el polisacárido no podemos descartar la existencia de una interacción transiente entre ellas. La estabilidad de ambas proteínas se ve afectada por la ausencia de la otra, especialmente GumC. La localización en membrana tanto de la forma nativa como de las mutantes truncadas se ve favorecida por la presencia de GumB.

La estabilidad de GumB y GumC depende además de otras proteínas Gum como surge del análisis en las diferentes mutantes de operón *gum*. En particular de GumE, potencial polimerasa del sistema. El gen *gumE* codificaría para una proteína integral de MI de 432 aminoácidos. Según la predicción de estructura secundaria contendría 12 STM y dos pequeñas regiones hidrofílicas (~50 y 40aa). Otras dos proteínas, GumD y GumL, afectan parcialmente los niveles de GumC. GumD es una glucosil 1-P transferasa que media la adición de una glucosa 1-P al poliprenol fosfato aceptor [Katzen, 1998 #25]. Perteneció a una gran familia de glucosil 1-P transferasas junto con SpsB de *Sphingomonas* S88 y PssA de *R. leguminosarum* ubicadas preferentemente en la membrana. La localización subcelular estaría determinada por su dominio N-terminal [Pollock, 1998 #2] y su actividad por el dominio C-terminal [Ferreiro, 1997 #38]. GumL, es una cetil piruvato transferasa que cataliza la adición del grupo piruvato a la manosa externa de la unidad repetitiva del xantano [Marzocca, 1991 #61]. Esta modificación no es indispensable para la polimerización del xantano ya que la mutante *gumL* (XcL) produce niveles normales de polímero [Katzen, 1998 #11]. Sin embargo la estabilidad de la proteína se ve afectada por la ausencia de GumC, GumD, GumE y GumI, manosiltransferasa que adiciona el último azúcar de la unidad repetitiva.

En conjunto los datos de estabilidad, entrecruzamiento sugieren la existencia de un complejo transmembrana formado por las proteínas responsables de la polimerización/secreción del xantano y la síntesis la unidad repetitiva. Ensayos de co-inmunoprecipitación y cromatografía de afinidad han demostrado que en varios sistemas de secreción tipo II la formación del complejo se produce de una manera ordenada o jerárquica [Létófflé, 1996 #18]: En *X. campestris* las proteínas XpsL, XpsM y XpsN de MI forman un complejo ternario en el cual XpsN se une preferentemente a XpsL-XpsM más que a XpsM sola mientras que XpsL y XpsN no co-inmunoprecipitan en ausencia de XpsM [Tsai, 2002 #22]. Esta jerarquía de asociación podría verse reflejada en la incidencia que cada proteína Gum tiene sobre los niveles de proteína de los componentes del sistema.

Los datos bioquímicos obtenidos a partir de las complementaciones *in vivo* e *in vitro* de las distintas mutantes *gumB* y *gumC* apoyan esta hipótesis. Para la polimerización del xantano se necesita tanto de GumB, GumC como GumE, si embargo

El hecho de que las proteínas en trans (plásmidicas) no puedan complementar completamente las mutaciones revela la importancia de la formación del complejo a medida que es co-traducciona. Estos resultados sugieren que GumD, en particular el dominio amino terminal, interacciona de alguna manera con los primeros 120 aa de GumC. Y además que la región amino terminal de GumC parece ser suficiente para que se produzca la polimerización del xantano *in vitro* aunque se necesita de la proteína completa para que la síntesis del polímero presente su perfil de elusión característico (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**30C) y se produzca la síntesis *in vivo*.

La modulación del perfil de elusión por parte de GumC estaría indicando un rol en la determinación del largo de cadena del xantano o de una actividad de co-polimerasa. La interacción con la polimerasa del sistema se produciría en la región amino terminal de GumC mientras que la regulación del largo de cadena del polímero se encontraría en la región carboxilo terminal.

Primera evidencia de que GumE es la polimerasa del sistema y de que el N-terminal de gumD intervendría en la interacción con otras proteínas. La mutante 401E expresaría 500 pb del 1er loop (periplasmático) podría expresar el y la interacción con B Y C se da en depuse del loop 1/3 de la proteína.

4.2 Regulación del largo de cadena del xantano

Se ha demostrado que la amplificación de los genes que participan en la biosíntesis de EPS afecta tanto la síntesis como el rendimiento de los polímeros. En *X. campestris* el proceso de síntesis es muy eficiente, con el 60-80% de la glucosa del medio de cultivo convertida a EPS. Sin embargo Harding y colaboradores obtuvieron un 10-15% de aumento en la productividad del xantano mediante la transformación de la cepa silvestre con un plásmido que contiene parte de la región *gum* (135). En *Sphingomonas* S-7 la amplificación de los genes *sps* produjo un 20 % de aumento en el rendimiento del esfingano y en la viscosidad del medio de cultivo. Este cambio en la viscosidad se vió acompañado por un cambio en la composición del polímero secretado (136).

La capacidad de interactuar con otras proteínas esta dada por las regiones *coiled-coil*, (D180-L350) Esta región presenta por lo menos 3 potenciales estructuras *coiled-coil* las cuales estarían relacionadas con las interacciones proteína-proteína [Morona, 2000 #54], la secuencia leucine zipper del STM1 (L30-L55) y el motivo GxxxG en el STM2. Estos resultados se completan con los observados por complementación de las distintas mutante *gumC*. los primeros 117 aa son suficientes para interactuar con GumD y GumE y para dimerizar (efecto de dominancia negativa).

La variación en la distribución del largo de cadena de las moléculas de xantano, con la aparición de una proporción importante de moléculas de mayor tamaño solo se observó cuando se co-expresaron unicamente las proteínas GumB y GumC, más aún, solo se obtuvo con el plásmido pBBR5-BC. Ningún otro plásmido que codificara para ambas proteínas, pZD15-261 y pCHC22, fue capaz de reproducirlo. Los plásmidos utilizados en esta serie de experimentos fueron diseñados o elegidos de tal forma que los genes a estudiar se encontraran bajo el mismo promotor, el promotor de la región *gum*. De esta manera evitamos diferencias en la transcripción de cada construcción.

que no existen diferencias significativas entre las cantidades de proteína expresadas por cada plásmido, así como tampoco en la relación GumC/GumB en aquellos que co-expresan ambas proteínas (varía entre 1,65 para pCHC22 y 1,82 para pBBR5-BC). Por otro lado del análisis de estos datos también surge que GumB efectivamente afecta la estabilidad de GumC. Cuando estas proteínas se co-expresan (pBBR5-BC) la cantidad de GumC detectada es casi el doble que cuando se expresa sola (pBBRpromC).

Por lo tanto las variaciones observadas en el tamaño del polímero no pueden atribuirse a una expresión diferencial de las proteínas GumB y GumC a partir del plásmido pBBR5-BC sino a un desbalance con respecto al resto de las proteínas Gum, en particular GumE. Si las 3 proteínas se co-expresan (pCHC22) no se observan cambios en las propiedades del polímero, mientras que la expresión de GumE sola (pGVII) o acompañada por parte de las proteínas Gum (pCHC3, *gum* D - M) influye en la calidad del polímero producido. Estos resultados se complementan con los obtenidos en la sección **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** donde se analizó el comportamiento de estas proteínas en las distintas mutantes *gum*.

La relación glucosa/manosa y el contenido de acetato no variaron con respecto al control, mientras que el contenido de piruvato disminuyó un 30% aproximadamente. La influencia del contenido de grupos cetil piruvato y acetato en la capacidad viscosificante del xantano es

controversial (16). Sin embargo, estudios recientes (137; 138), sugieren que no existe una correlación entre ambas de modo que las diferencias podrían atribuirse a un cambio a nivel molecular.

4.3 Energía del sistema

Como se detalló en la sección 1.2.2, en todos los tipos de sistemas de exportación de polisacáridos extracelulares hay involucrada una actividad ATPasa. Esta actividad asociada al transporte de macromoléculas tanto en células eucariotas como procariontas puede estudiarse mediante la incubación con vanadato (140; 141). El ión vanadato (ortovanadato, VO_4^{3-}) posee una geometría, tamaño y carga análogos al ión fosfato e induce la no liberación de los nucleótidos que quedan atrapados en el sitio activo de la enzima (142). Para determinar si existe una actividad ATPasa asociada con el proceso de polimerización/exportación de xantano se incubaron con vanadato células permeabilizadas y se analizó la capacidad para producir el xantano *in vitro*.

Los esfuerzos por encontrar una posible proteína que contenga el dominio C fueron infructuosos. Si bien no podemos concluir taxativamente que en el sistema de transporte del xantano no participa una proteína con esas características, varias evidencias apuntan en esa dirección. Pollock y col. encontraron que la expresión heteróloga del operón *gum* es suficiente para que *Sphingomonas* sintetice un polisacárido indistinguible en cuanto a estructura del xantano nativo [Pollock, 1997 #4]. La fosforilación de este dominio en varias tirosin-proteína quinasas bacterianas no es requerida para la síntesis de polisacárido sino para la regulación de la misma. En *S. pneumoniae* (CpsD) y *E. coli* K12 (Wzc_{ca}) regula negativamente la producción de CPS y ácido colánico [Morona, 2000 #34, Vincent, 2000 #37] mientras que en *E. coli* K30 (Wzc_{cps}) regula positivamente la producción de CPS grupo 1 [Wugeditsch, 2001 #111], en *S. meliloti* (ExoP) favorece la síntesis de succinoglicano de alto peso molecular [Niemeyer, 2001 #134] y en *A. lwoffii* RAG-1 (Wzc) favorece la síntesis de emulsano de bajo peso molecular [Nakar, 2003 #38].

La regulación del largo de cadena en algunos sistemas de transporte de EPS está dada por la autofosforilación del dominio carboxi-terminal de la proteína MPA-1C en bacterias Gram-negativas (ExoP de *S. meliloti*) o bien en un polipéptido que contiene a este dominio en las proteínas MPA1 +C en bacterias Gram-positivas (CpsD de *S. pneumoniae*) (76, 28]. En el caso del operón *gum*, la proteína GumC está considerada como miembro de la familia MPA1 (29) sin embargo carece del dominio carboxi-terminal citoplasmático y tampoco existiría una proteína dentro del operón que complemente esta función (ver Fig 3). Dado que se observó una actividad ATPasa asociada al proceso de síntesis del xantano, se decidió buscar una proteína codificada fuera del operón con las mismas características del dominio C-terminal. Como primera aproximación se buscaron genes homólogos por PCR utilizando oligonucleótidos degenerados complementarios a las zonas más conservadas de ExoP de *S. meliloti*, Wzc_{K30} de *E. coli* y SpsE de *Sphingomonas S88*. Las secuencias de las pocas bandas amplificadas se compararon con los genomas de *X. campestris* pv. *campestris* 33913 *X. campestris* pv. *citri* 306 y *Xylella fastidiosa* 9a5c. Los resultados no fueron satisfactorios (no mostrados) ya que pertenecían a proteínas cuya función fue establecida bioquímicamente o a ORFs de operones cuya homología con otras bacterias no dejaba lugar a dudas de su posible participación en caminos metabólicos varios.

La búsqueda de proteínas homólogas a SpsE en los bancos genómicos llevó a encontrar el ORF XF2301 de *X. fastidiosa*, posible proteína involucrada en la exportación de polisacáridos. Este ORF presenta un 82% de identidad con el ORF XCC2571 de *X. campestris* el cual está ubicado a 130

kb de la región *gum* y no formaría parte de un operón. La secuencia aminoacídica presenta los motivos Walker A y B de unión a ATP, la región rica en tirosinas en el carboxi-terminal y una hélice- α conservada entre ambos característico del dominio C de las proteínas MPA1. Dadas sus características se decidió estudiar si estaría relacionada con la síntesis del xantano. Para ello se generó una mutante por delección total del gen en el entorno salvaje, Xc2571. Esta mutante es viable y sus colonias presentan un aspecto mucoso. Cuando se analizó la producción de xantano *in vivo* no se encontraron diferencias en el rendimiento ni en la viscosidad del polímero con respecto la cepa control. Por lo tanto se descartó su participación en la biosíntesis del xantano.

En *X. campestris* no se han encontrado dos poblaciones de polímero como en *S. meliloti* (succinoglicano-HMW y -LMW) ni tampoco una producción diferencial durante el crecimiento. Estos datos sumados a los resultados obtenidos en esta sección permiten concluir que para la síntesis del xantano no sería necesaria una regulación fina del sistema a través de la fosforilación de uno de sus componentes. Por lo tanto la actividad ATPasa encontrada se relacionaría con el ensamblado del complejo de una forma aún desconocida.

La formación de un complejo de biosíntesis/exportación centralizaría la maquinaria de ensamblado y síntesis del xantano en ciertos puntos de la membrana lo que favorecería la eficiencia de la producción del xantano. Además el acoplamiento de la síntesis con el ensamblado y secreción sería necesario si tenemos en cuenta el tamaño la bacteria ($\sim 2 \times 1 \mu\text{m}$), la estructura rígida y el tamaño promedio de las moléculas de xantano ($0.9 \mu\text{m}$) Los resultados obtenidos en esta tesis permiten proponer un modelo para el sistema de polimerización/exportación del xantano como se muestra en la Fig. 40.

5.

Materiales y Métodos

5.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas y plásmidos utilizados en esta tesis se detallan en la Tabla 10.

Tabla 10. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Cepa o plásmido	Características relevantes	Referencias u Origen
Cepas		
<i>E. coli.</i>		
BL21(DE3)	<i>F ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)gal dcm</i> (DE3)	Novagen
S17-1	<i>E. coli</i> 294 RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7	(143)
DH5 α	<i>F- endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 ΔlacU169</i> (ϕ 80d/lacZ Δ M15)	Life Technologies
JM109	<i>F' traD36 proA⁺ B⁺ lac^f Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV44 e14⁻ gyrA96 ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal [dcm] [lon]</i>	New England Biolabs
<i>X. campestris</i>		
NRRL B-1459	Cepa silvestre.	(144)
FC2	NRRL B-1459 Rif ^r (mutante estable)	Nuestro laboratorio
PRM-1	NRRL B-1459 resistente a infección por fago	CP Kelco
3192	NRRL B-1459 <i>ugp gumD</i> Rif ^r	(101)
3332	NRRL B-1459 <i>pmi</i> Rif ^r	(101)
405A	NRRL B-1459 <i>ugp</i> Rif ^r	CP Kelco
405PhoA	3192 <i>phoA</i>	Esta tesis
1231	NRRL B-1459 Δ (<i>gum</i>) Tc ^r	CP Kelco
405AB	405A llevando el plásmido pGum57-18S integrado en el cromosoma	Esta tesis
405AC	405A llevando el plásmido pKC318 integrado en el cromosoma	Esta tesis
401C	3332 Δ (<i>gumC</i>)	Esta tesis
405C	3192 Φ (<i>gumC-lacZ-aacC1</i>) sitio de inserción: <i>XmnI</i> [2556] ^o	(99)
XcD	FC2 Φ (<i>gumD-lacZ-aacC1</i>) sitio de inserción: <i>SspI</i> [3705] ^o	(99)
401E	3332 Δ (<i>gumE</i>) 4526-6730 ^o	(129)
405E	3192 Φ (<i>gumE-lacZ-aacC1</i>) sitio de inserción: <i>XmnI</i> . [5633] ^o	(99)
XcF	FC2 Φ (<i>gumF-lacZ-aacC1</i>) sitio de inserción: <i>EcoRI</i> [7247] ^o	(99)
XcG	FC2 Φ (<i>gumG-lacZ-aacC1</i>) sitio de inserción: <i>BamHI</i> [7963] ^o	(99)
401H	FC2 llevando el plásmido pGum52-18S integrado en el cromosoma	(99)
XcI	FC2 Φ (<i>gumI-lacZ-aacC1</i>) sitio de inserción: <i>StuI</i> [10097] ^o	(99)
405J	3192 Φ (<i>gumJ-lacZ-aacC1</i>) sitio de inserción: <i>SpeI</i> [11716]	(99)
Xc234K	FC2 llevando el plásmido pGum36-18S integrado en el cromosoma	(99)
405K	3192 Φ (<i>gumK-lacZ-aacC1</i>) sitio de inserción: <i>StuI</i> [13176] ^o	(99)

Tabla 0 (continuación)

XcL	FC2 Φ (<i>gumL-lacZ-aacC1</i>) sitio de inserción: <i>PstI</i> [13708] ^a	(99)
405M	3192 Φ (<i>gumM-lacZ-aacC1</i>) sitio de inserción: <i>NotI</i> [14871] ^a	(99)
Plásmidos		
pRK404	<i>oriV</i> (RK2) Tc ^r <i>oriT</i> (<i>mob</i> ⁺) <i>tra</i>	(145)
pUC18	ColE1, <i>lacZ</i> α ⁺ Ap ^r	(146)
pUC19	ColE1, <i>lacZ</i> α ⁺ Ap ^r	(146)
pK18mob	derivado de pUC18, <i>mob</i> ⁺ ; <i>lacZ</i> α ⁺ Km ^r	(147)
pK19mob	derivado de pUC19, <i>mob</i> ⁺ ; <i>lacZ</i> α ⁺ Km ^r	(147)
pRK311	<i>oriV</i> (RK2) Tc ^r <i>oriT</i> (<i>mob</i> ⁺) <i>tra</i> λ . <i>cos lacZ</i> (α)	(145)
pRK293	Tc ^r Km ^r <i>Mob</i> ⁺ <i>Tra</i>	(145)
pGEM-T	Plásmido de clonado T, Ap ^r	Promega, Inc
pAB4001	Plásmido que contiene el interposón sin promotor <i>phoA-aacC1</i> .	(31)
pAB5001	Plásmido que contiene el interposón sin promotor <i>lacZ-aacC1</i>	(31)
pET22b(+)	Promotor T7; Ap ^r	Novagen
pET-C	Derivado del pET22b(+) que expresa la proteína truncada GumC ₅₃₋₄₄₇ ^b	Esta tesis
pQE30	Plásmidos de expresión; Ap ^r	Qiagen
pREP4	Contiene el gen del represor <i>lacI</i> ^f ; Km ^r	Qiagen
pQE-XpsB#6	Derivado del pQE30. Contiene un fragmento del gen <i>gumB</i> (1336-1971) ^a	CP Kelco
pTR213	Derivado del pK18mob. Contiene el gen <i>sacB</i>	CP Kelco
pTR213-BD	Derivado del pTR213. Contiene un fragmento de 1881 pb	Esta tesis
pIZD15-261	Derivado del pRK311. Contiene la región <i>gum</i> de <i>X. campestris</i>	(99)
pGum02-19AS	Derivado del pK19mob. Contiene un fragmento de 2618 de la región <i>gum</i> (771-4800) ^a	(99)
pGum57-18S	Derivado del pK18mob. Contiene un fragmento de 437 bp de la región <i>gum</i> (1372-1809) ^a	(99)
pJC440	Derivado del pRK293. Contiene la región <i>xpsIV</i> de <i>X. campestris</i>	(31)
pXanA	Derivado del pRK404. Contiene el gen <i>xanA</i>	(129)
pCD2	Derivado del pRK404. Contiene un fragmento de 744pb que codifica los últimos 198 aminoácidos de <i>gumD</i> (4500-5244) ^a	(134)
pKC112	Derivado del pK19mob. Contiene un fragmento de 590pb de la región <i>gum</i> (1817-2382) ^a	Esta tesis
pKC318	Derivado del pK19mob. Contiene un fragmento de 507pb de la región <i>gum</i> (2501-3006) ^a	Esta tesis
pKC440	Derivado del pK19mob. Contiene un fragmento de 382pb de la región <i>gum</i> (3007-3367) ^a	Esta tesis
pLac112	Derivado del pKC112. Contiene el cassette <i>lacZ-aacC1</i> insertado en el sitio XbaI	Esta tesis
pLac318	Derivado del pKC318. Contiene el cassette <i>lacZ-aacC1</i> insertado en el sitio BamHI	Esta tesis
pLac440	Derivado del pKC440. Contiene el cassette <i>lacZ-aacC1</i> insertado en el sitio BamHI	Esta tesis
pPhoA112	Derivado del pKC112. Contiene el cassette <i>phoA-aacC1</i> insertado en el sitio XbaI	Esta tesis
phoA318	Derivado del pKC318. Contiene el cassette <i>phoA-aacC1</i> insertado en el sitio BamHI	Esta tesis
pPhoA440	Derivado del pKC440. Contiene el cassette <i>phoA-aacC1</i> insertado en el sitio BamHI	Esta tesis
pUC18-BC_AS	Derivado del pUC18. Contiene un fragmento de 2855 pb de la región <i>gum</i> (771-3611) ^a	Esta tesis
pBBR1-MCS5	<i>mob</i> ⁺ <i>lacZ</i> α ⁺ Gm ^r	(125)
pBBR5-B	Derivado del pBBR1-MCS5. Contiene un fragmento de 1208 pb de la región <i>gum</i> (771-1979) ^a	Esta tesis
pBBR5-C	Derivado del pBBR1-MCS5. Contiene un fragmento de 1480 pb de la región <i>gum</i> (1979-3459) ^a	Esta tesis

Tabla 0 (continuación)

pBBR5-BC	Derivado del pBBR1-MCS5. Contiene un fragmento de 2840 pb de la región <i>gum</i> (771-3611) ^a	Esta tesis
pBBRprom	Derivado del pBBR1-MCS5. Contiene un fragmento de 276 pb de la región <i>gum</i> (1000-1276) ^a	Esta tesis
pBBRprom-Bmad	Derivado del pBBRprom. Contiene un fragmento de 642 pb <i>NdeI/KpnI</i> que codifica la proteína truncada GumB ₁₋₂₃₁ ^c	Esta tesis
pBBRpromC	Derivado del pBBRprom. Contiene un fragmento de 1419 pb <i>NdeI/KpnI</i> que codifica la proteína silvestre GumC ₁₋₄₇₂ ^b	Esta tesis
pBBRpromC ₁₋₄₄₇	Derivado del pBBRprom. Contiene un fragmento de 1343 pb <i>NdeI/BamHI</i> que codifica la proteína truncada GumC ₁₋₄₄₇	Esta tesis
pBBRpromC ₂₄₋₄₇₂	Derivado del pBBRprom. Contiene un fragmento de 1350 pb <i>NdeI/KpnI</i> que codifica la proteína truncada GumC ₂₄₋₄₇₂	Esta tesis
pBBRpromC ₅₃₋₄₇₂	Derivado del pBBRprom. Contiene un fragmento de 1260 pb <i>NdeI/KpnI</i> que codifica la proteína truncada GumC ₅₃₋₄₇₂	Esta tesis
pBBRpromC ₂₄₋₄₄₇	Derivado del pBBRprom. Contiene un fragmento de 1272 pb <i>BamHI/KpnI</i> que codifica la proteína truncada GumC ₂₄₋₄₄₇	Esta tesis
pCOS6	Derivado del pRK293. Contiene un fragmento <i>SalI</i> que incluye la región <i>gum</i> (1-14585) ^a y parte de la región río arriba del operón	CP Kelco
pH336	Derivado del pRK290. Contiene un fragmento de digestión parcial <i>BamHI</i> de la región <i>gum</i> (1-15052) ^a	CP kelco
pCHC22	Derivado del pRK293 Contiene un fragmento de digestión parcial <i>SalI</i> de la región <i>gum</i> (1-9223) ^a y parte de la región río arriba del operón	(135)
pFD5	Derivado del pRK404. Contiene un fragmento de digestión parcial <i>BamHI</i> (318-3464) ^a que incluye a <i>gumB</i> y <i>gumC</i>	Nuestro laboratorio

^a La numeración corresponde a la posición en la secuencia nucleotídica de la región *gum* (GenBank, número de acceso U22511).

^b La numeración corresponde a la posición en la secuencia de aminoácidos corregida de la proteína GumC (GenBank, número de acceso AAL28079).

^c La numeración corresponde a la posición en la secuencia de aminoácidos corregida de la proteína GumB (GenBank, número de acceso AAL28080).

5.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas a 37°C en medio LB, LB-agar o M9 (148). Cuando fue necesario se adicionaron los antibióticos (Sigma y Calbiochem) Tc, Km, Ap, Cb o Gm (10, 30, 200, 50, 10 µg/ml respectivamente).

Las células de *X. campestris* fueron cultivadas a 28°C, en medio TY (148), XOL (115), YM (135), TYE (8 g Bacto Triptona, 5 g Extracto de levadura, 5 g NaCl por litro) o M9 modificado (112). Según fueran necesarios se utilizaron los antibióticos Gm, Km, Rif o Tc (30, 50, 100, 5 µg/ml respectivamente).

5.3 Aislamiento, purificación, manipulación y análisis de ADN

5.3.1 Preparación rápida de ADN plasmídico

Las bacterias cultivadas en medio sólido (1 cm²) fueron resuspendidas en solución P1. Se le agregaron secuencialmente 0,2 ml de las soluciones P2 y P3, y se removió el debris celular por centrifugación (5 min, 14000 x g). El ADN plasmídico se precipitó agregando 0,5 ml de isopropanol, se incubó 10 min a T°amb y centrifugó 10 min, 14000 x g. Luego de lavar el ADN plasmídico con 75% de etanol, se lo resuspendió en 100 µl o 30 µl de agua estéril (plásmidos de alto número de copia o de bajo número de copia, respectivamente).

P1: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8,0

P2: 200 mM NaOH, 1% (p/v) SDS

P3: 2.55 M Acetato de Sodio, pH 4,8

5.3.2 Preparación de ADN plasmídico de alta pureza y ADN cromosómico

La preparación de ADN plasmídico para secuenciación u otros procedimientos se llevó a cabo utilizando el kit QIAprep Spin miniprep (QIAGEN, Hilden, Alemania) o el sistema Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison WI, USA). La preparación de ADN plasmídico a gran escala se realizó utilizando el sistema Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (Promega).

La preparación de ADN cromosómico para ensayos de hibridación o PCR se llevó a cabo utilizando el kit QIAmp (QIAGEN).

5.3.3 Procedimientos generales

Los procedimientos de restricción, desfosforilación o ligación del ADN, rellenado de extremos 5' protruyentes, electroforesis en geles de agarosa y ensayos de PCR se llevaron a cabo de acuerdo a protocolos ya establecidos (149). La recuperación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó con el sistema QIAEX (QIAGEN). Los productos de PCR se purificaron utilizando columnas S-400 (Pharmacia). Las enzimas de restricción, de modificación o polimerización del ADN y los marcadores de tamaño molecular fueron provistos por New England Biolabs (Beverly, MA, USA), Promega o Invitrogen Life Technologies (La Jolla, CA, USA). Los oligonucleótidos (Tabla 11) fueron sintetizados por Invitrogen Life Technologies.

Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados en esta tesis

Oligonucleótido	Secuencia de 5'a 3 ^a
B1	ggaattc <u>catat</u> gtcgtggcgcttgca
B2	cggaattc <u>atc</u> atcggttaagcgccacac
UKm	atgattgaacaagatggattgc
LKm	tcagaagaactcgtcaagaagc
Ureg-30_SphI	acatgcatgccttgcatgtgttcg
LregB_Sall	acgcgtcgactcatcggttaagcgccacac
LregD_Xmal	tcccccgggcaccagcttcacgttg
Uinter_Sall	acgcgtcgaccatcgtgatgtgcaaaacg
UC1_HindIII	cccaagcttggtcaacgggcaaaaatg
LC2_XbaI	tgct <u>ctaga</u> cttttcggcgctttg
UC3_HindIII	ccc <u>agctt</u> aattacgattgccagacc
LC4_BamHI	cgggatccacttcgcatgatctgacgac
UC5_HindIII	ccc <u>agctt</u> cgtcagatcaatggcgaagtc
LC6_BamHI	cgggatccgcaggaagtagcgaaccag
LC9_KpnI	cggggtacctc <u>agtt</u> caaccgacctc
UC12_NdeI	ggaattc <u>catat</u> gttgatgcccagaagtac
LC13_BamHI	cgggatcc <u>ctca</u> aaagatcaggcccaacgcgagg

Tabla 11 (continuación)

UC14_NdeI	ggaattc catatg gactactggcgcgcctg
UC18_NdeI	ggaattc catatg aattcagacaatcgttctc
Uprom_SphI	acatg catg cgctagagttcgtatgctgagaat
Lprom_SphI	acatg catg ccat atg tgtagctggctgcctctg
UBmad_NdeI	ggaattc catatg tcgctgggcgcttgacag
LBmad_EcoRI	cggaatt ctcat cggttaagcgcgccacac

^a Los codones de inicio y finalización de la traducción se encuentran en negrita y los sitios de corte para enzimas de restricción subrayados.

5.3.4 Ensayos de hibridización del ADN (*southern blot*)

La transferencia de geles de agarosa a filtros de nylon cargados positivamente (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) se realizó utilizando el sistema de vacío VacuGene XL Vacuum System (Amersham Pharmacia Biotech). La preparación de las sondas, la hibridización y la detección se llevaron a cabo utilizando el sistema Genius (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) siguiendo el protocolo provisto por el fabricante.

5.3.5 Secuenciación del ADN

Los insertos de ADN fueron secuenciados utilizando el sistema de secuencia AutoRead o Autocycle (Amersham Pharmacia Biotech). Los datos fueron procesados y analizados utilizando el secuenciador automático A.L.F.-*Express* (Amersham Pharmacia Biotech).

5.3.6 Análisis de secuencias nucleotídicas y de aminoácidos

Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos se analizaron empleando el sistema MacVector Sequences Analysis Software (Oxford Molecular Limited, Inglaterra) y el programa HCA (150). Las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas se compararon contra la base de datos no redundantes EMBL/GenBank usando los algoritmos Fasta (151) y Blast (152). Los perfiles hidropáticos se analizaron siguiendo los algoritmos descritos por Kyte y Doolittle (153) y Eisenberg y col. (154).

Las nuevas secuencias determinadas para los genes *gumB* y *gumC* se depositaron en el GenBank bajo los números de acceso AF427012 y AF427011 respectivamente.

5.4 Aislamiento y manipulación del ARN

5.4.1 Preparación del ARN total de *X. campestris*

Las células fueron cultivadas en medio YM y cosechadas a una DO_{600nm} entre 0,4-0,9. El ARN fue preparado mediante la utilización del reactivo "Trizol" (GIBCO BRL) y se purificó por extracción sucesiva en solventes orgánicos (fenol-cloroformo y cloroformo-isoamílico). El ARN se precipitó a partir de la fase acuosa agregando 2,5% de acrilamida, 1/10 vol. de 3M de acetato de sodio y 1 vol. de isopropanol, se incubó 15 min a -20°C y se centrifugó 10 min, 14000 x g a T° amb. Luego de lavar el pellet con 70% etanol se lo resuspendió en 20 µl de agua DPEC. El ARN (1 µg/ml)

fue tratado con DNasa I (libre de RNasa, RQ1, Promega) durante 1 h en las condiciones sugeridas por el proveedor de la enzima.

La integridad del ARN total se verificó utilizando un gel de agarosa 1,3%. La contaminación de la muestra con ADN (cromosómico o plasmídico) se verificó por la presencia de un producto de amplificación en un ensayo de PCR en las mismas condiciones que se utilizaran posteriormente en la RT-PCR.

5.4.2 Ensayos de retrotranscripción-PCR

Para este ensayo se utilizaron los oligonucleótidos B1 y B2 (Tabla 11)

Retrotranscripción

El ARN de las cepas de *X. campestris* (1 µg) tratado con Dnasa I se incubó 10 min a -70°C. La reacción de retrotranscripción (20 µl finales) se llevó a cabo a 42°C durante 1 h en presencia del oligonucleótido B2 (0,4 nmoles), 4 µl de First Strand Buffer 5x, DTT (4mM), dNTPs (0,5mM de cada uno) y 200 unidades de RT-SuperScript II (GIBCO BRL).

PCR

Los productos de la retrotranscripción fueron amplificados utilizando el par de oligonucleótidos B1-B2. La amplificación (30 ciclos de 30 s a 94°C; 45 s a 63°C; 45 s a 72°C) se llevó a cabo en presencia de MgCl₂ (2mM), dNTPs (0,2mM de cada uno), oligonucleótidos (0,1 mmoles de cada uno), 5 µl de Buffer Taq 10x y 2,5 unidades de Taq polimerasa (Promega) en 50 µl finales. El ARN fue digerido con RNasa A (Sigma) incubando las muestras 15 min, 37°C. Los productos de amplificación se resolvieron en un gel de agarosa 1,3%.

5.5 Introducción de material genético en bacterias

5.5.1 *E. coli*

La introducción de material genético se realizó mediante transformación (149) o electroporación. Para este último procedimiento se utilizó un electroporador Gene Pulser Transfection System (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). La preparación de las células electrocompetentes y las condiciones de electroporación (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω) utilizadas fueron las especificadas por el fabricante.

5.5.2 *X. campestris*

La introducción de material genético se realizó mediante electroporación (2,5 kV, 25 µF, 1000 Ω) o conjugación bacteriana. Los plásmidos fueron transferidos desde la cepa movilizadora de amplio rango de hospedador *E. coli* S17-1 a *X. campestris* siguiendo el protocolo de Simon y col. (155).

5.6 Procedimientos de mutagénesis en *X. campestris*

5.6.1 Mutagénesis química

La mutagénesis química se realizó con etil metano sulfonato. Se procedió según el método descrito por Thorne y col. (156) modificado sobre la base de Miller (148). Las células *X. campestris* 405A fueron cultivadas en medio TY a 28°C hasta fase logarítmica, se aislaron por centrifugación a 2000 rpm, 5 min, y se lavaron dos veces con medio M9 modificado. El cultivo se ajustó a una $DO_{600nm}=2$ (2×10^9 células/ml, aproximadamente) y 2 ml de esta suspensión se incubaron a 28°C, con 40 y 90 µg/ml del mutágeno, durante 1, 2 y 3 h. Muestras de 0,5 ml de cada tratamiento, se lavaron dos veces con medio M9, se resuspendieron en 2 ml de medio TY e incubaron a 28°C durante la noche, con agitación. Las mutantes *phoA*-se seleccionaron en medio sólido YM conteniendo 60 µg/ml de XP (5-Bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato, sal disódica). El mismo procedimiento, sin el agregado de EMS, fue realizado en paralelo como control.

5.6.2 Mutagénesis por integración plasmídica

El plásmido suicida pGum57-18S contiene un fragmento del gen *gumB* en la misma dirección del promotor del vector, permitiendo la transcripción de los genes río abajo del sitio de integración. El plásmido fue transferido a *X. campestris* 405A por electroporación. La integración del plásmido al genoma se seleccionó por la resistencia codificada por el vector (Km^r). La correcta integración plasmídica fue verificada por PCR (oligonucleótidos UKm y LKm). La mutante resultante se denominó 405AB.

El plásmido movilizable y suicida pKC318 (ver sección 5.7), fue transferido a *X. campestris* 405A desde la cepa movilizadora *E. coli* S17-1. La integración del plásmido al genoma se seleccionó por la resistencia codificada por el vector (Km^r). La correcta integración plasmídica fue verificada por PCR (oligonucleótidos UKm y LKm). Las mutantes obtenidas, 4 en total, se denominaron 405AC1 a 405AC4.

5.6.3 Mutagénesis por delección génica

Los fragmentos de ADN adyacentes al gen *gumC* se amplificaron por PCR (oligos UReg-30, LRegB, UInter y LRegD) y se clonaron en forma secuencial en el plásmido movilizable y suicida, pTR213. Este contiene el gen *sacB* que codifica para la enzima levansucrasa. Esta proteína cataliza la degradación de la sacarosa, liberando productos tóxicos para la bacteria portadora. El plásmido resultante, pTR213-BD, se transfirió a *X. campestris* 401 por electroporación y las transformantes se plaquearon en medio sólido TYE-km para seleccionar la integración del plásmido. Una colonia aislada fue cultivada en 10 ml de medio TYE a 30°C, durante 24 h. Del cultivo anterior 10 µl fueron transferidos a medio fresco y cultivados en las mismas condiciones. Este paso se repitió por lo menos una vez más (72 h de incubación total). En paralelo se realizó como control el mismo procedimiento utilizando TYE-Km. La selección de las células en las que haya tenido lugar un segundo evento de recombinación (con la consiguiente pérdida del plásmido) se llevó a cabo en medio sólido TYE con 10 % sacarosa. Las colonias obtenidas fueron analizadas por su sensibilidad a Km. La correcta eliminación cromosomal del gen fue analizada por PCR. La mutante obtenida se denominó 401C.

5.7 Construcción de fusiones traduccionales *gumC::phoA* y *gumC::lacZ*

Los sitios de inserción para los cassettes *phoA-aacC1* y *lacZ-aacC1* en el gen *gumC* se generaron por PCR mediante la amplificación de 3 fragmentos diferentes del gen denominados 112 (590 pb), 318 (507 pb) y 440 (382 pb). Se utilizaron oligonucleótidos (UC1, LC2, UC3, LC4, UC5 y LC6) en cuyos extremos se encuentran sitios de restricción específicos para el clonado de ambos cassettes (*XbaI* para el producto 112 y *BamHI* para 318 y 440). Los productos de amplificación se clonaron en el vector pGEM-T y luego se subclonaron en el vector movilizable y suicida pK19mob dando origen a los plásmidos pKC112, pKC 318 y pKC440. Los cassettes *phoA-aacC1* y *lacZ-aacC1* fueron liberados de los plásmidos pAB4001 y pAB5001, con las mismas enzimas de restricción y se insertaron en los sitios *BamHI* y *XbaI*, generándose seis construcciones en total: pLac112, pLac318, pLac440, pPhoA112, pPhoA318 y pPhoA440.

Los plásmidos resultantes fueron transferidos por conjugación desde *E. coli* S17-1 a *X. campestris* FC2 y 3392. Las construcciones integradas en el cromosoma debido a un único evento de recombinación fueron seleccionadas por la resistencia codificada en el vector (Km^r) y en el cassette (Gm^r). La correcta integración se verificó por *Southern blot* utilizando como sonda secuencias del vector.

5.8 Construcción de plásmidos que expresan GumB y GumC en *X. campestris*

Un fragmento de 2855 pb fue liberado del plásmido pGum02-19S por digestión con *SphI* y subclonado en el vector pUC18 (pUC18-BC_AS). De este plásmido, por restricción con *BamHI/EcoRI*, *HindIII/EcoRI* y *HindIII/XbaI*, se obtuvieron fragmentos de 1208pb, 1480 pb y 2840 pb, respectivamente. Estos fragmentos se clonaron en el plásmido pBBR1-MCS5 digerido con las mismas enzimas de restricción, generando los plásmidos pBBR5-B, pBBR5-C y pBBR5-BC.

Mediante la amplificación por PCR (oligos Uprom y Lprom) se obtuvo un fragmento de 276 pb que incluye la región promotora y el RBS del operón *gum*, y se generó un codón de iniciación ATG a 12 pb del RBS, por inclusión de un sitio de corte para *NdeI*. Este fragmento se clonó en el plásmido pBBR1-MCS5 por digestión con *SphI*, el plásmido resultante se denominó pBBRprom. Este plásmido se utilizó para clonar los fragmentos amplificados que codifican para las distintas proteínas truncadas de GumB y GumC. Se utilizó como templado ADN cromosómico de la cepa silvestre de *X. campestris* y una serie de oligos en los cuales se incluyó un sitio de restricción para *NdeI* en los oligos *forward* y diversos sitios de restricción en los oligos *reverse* (para GumC: desde LC9 a LC13 y para GumB: Ubmad/LBmad).

En todos los casos la correcta construcción de los plásmidos fue confirmada por secuenciación.

5.9 Preparación de anticuerpos policlonales antiGumB y anti GumC

El producto de amplificación de PCR de 1184 pb correspondiente a la proteína GumC sin las regiones transmembrana (53-447aa), se clonó en el vector de expresión pET22b(+). El plásmido resultante, pET-C, se transfirió a la cepa de *E. coli* BL21(DE3) y las células BL21(pET-C) fueron

cultivadas en medio líquido LB-cb (10 ml) hasta una $DO_{550nm} \sim 0,6$. La expresión de la proteína recombinante se indujo con 1mM de IPTG durante 3 h a 37°C. Las células se cosecharon e incubaron con buffer de lisis (50mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA, 100mM NaCl, 1mM PMSF, 1mg/ml de lisozima, 0.1 mg/ml de desoxirribonucleasa I y 0,5% de tritón X-100) en una proporción de 0,5 ml buffer/10ml de cultivo a 37°C durante 30 min. Las células se rompieron mediante sonicación en hielo, centrifugaron a 4000 x g, 5 min para remover el debris celular y luego se separaron las fracciones solubles e insolubles (cuerpos de inclusión) por centrifugación a 14000 x g, 10 min. La fracción insoluble se lavó dos veces con buffer de lisis en un volumen igual al del lisado original, una vez con DOC 2 mg/ml en buffer de lisis y por último se lavó tres veces con agua MQ (157). Las proteínas purificadas se separaron mediante SDS-PAGE. La proteína recombinante se eluyó de la banda mayoritaria (~45 kDa) y se utilizó para inmunizar conejos New Zealand según protocolo ya establecido (158).

Las células de *E. coli* JM109(pQE-XpsB#6, pREP4) fueron cultivadas en medio líquido LB Cb Km (10 ml) hasta una $DO_{550nm} \sim 0,6$. La expresión de la proteína GumB y el posterior lisado de las bacterias se llevó a cabo como se describió anteriormente. La fracción insoluble, luego de los lavados con buffer de lisis, se resuspendió en 6 M HCl guanidinio (en 100 mM buffer fosfato, pH 7,0; 5 mM DTT, 5 mM EGTA) e incubó a 37°C, 20 min. Las proteínas resuspendidas se separaron mediante una cromatografía por exclusión molecular en una columna Superdex S200 (Pharmacia Biotech) preequilibrada con buffer D (4M GdnHCl, 50 mM buffer fosfato, pH7,0 , 150 mM NaCl). Las fracciones eluidas se analizaron por SDS-PAGE y aquellas que contenían la proteína recombinante (de 24 kDa) se utilizaron para inmunizar ratones BALB/c según protocolo ya establecido (158).

Los anticuerpos policlonales se purificaron según Harlow y Lane (159) y los antisueros se guardaron a -70°C. Antes de ser utilizado, el antisuero anti-GumC fue preabsorbido con extractos proteicos preparados a partir de las cepas de *E. coli* BL21(pET22b+) y de *X. campestris* 1231 (159).

5.10 Determinación de actividad β -galactosidasa y fosfatasa alcalina en *X. campestris*.

Las células de *X. campestris* fueron cultivadas en medio TY hasta una DO_{600nm} entre 0,6 - 0,8. Las actividades de β -galactosidasa y fosfatasa alcalina se midieron siguiendo protocolos ya descritos (160); (161). Las unidades arbitrarias de cada actividad enzimática fueron calculadas como indica Miller (148).

5.11 SDS-PAGE, Western blot e inmunodetección.

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida 10% desnaturizantes, según el método de Schägger y von Jagow (162) y se transfirieron a membranas de PVDF (Inmobilon-P, Millipore) con buffer CAPS 10 mM pH 11,0, 10 % (v/v) metanol durante 30 min a 2,5 mA/cm² de área de gel utilizando el sistema semiseco (Hoefer Semiphor). Las membranas fueron bloqueadas durante 16 h a 4°C o 90 min a T°amb, en 5% de leche en polvo descremada en TBS-T (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,0 y 0,05 % (v/v) Tween 20) y luego se incubaron durante 90 min con los antisueros correspondientes (anti-GumB, dilución 1:3000 y anti-GumC, dilución 1:5000) (159). Para la detección se utilizaron anticuerpos anti-IgG de ratón ó conejo acoplados a fosfatasa alcalina (Sigma).

Se reveló con una solución NBT/BCIP (Promega) según indicaciones del fabricante. Se utilizaron proteínas comerciales como marcadores de peso molecular (MW-SDS-70L, Sigma).

Para determinar la intensidad de las bandas de proteína GumB y GumC en las membranas se utilizó un densitómetro UVP (Ultra Violet Products) y la cuantificación se realizó con el programa GelWorks 1D Analysis (NonLinear Dynamics Ltd). De cada membrana se utilizó una calle de referencia para establecer el nivel de expresión cromosomal de las proteínas analizadas en la cepa silvestre. Se utilizó la señal de cada proteína en esta calle para normalizar la intensidad en las demás muestras.

5.12 Marcación con [³H]-ácido palmítico

Células de *X. campestris* fueron cultivadas en medio XOL con 0,5% maltosa hasta una $DO_{600}=0,8$. Las células fueron cosechadas, lavadas con medio XOL e incubadas en el mismo medio con 200 $\mu\text{Ci/ml}$ (7400 kBq) de [9,10-³H]-ácido palmítico (50 Ci/mmol, 1850GBq/mmol) a 28°C durante 2 h. La marcación se detuvo por el agregado de un volumen de 10 % TCA frío y luego de 10 min en hielo se centrifugó a 4°C, 1 min. El precipitado se lavó 2 veces con acetona fría, se secó e hirvió en buffer de lisis (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 % (p/v) SDS) durante 10 min. Finalmente se centrifugó 10 min a 7000 x g y el sobrenadante se guardó a -20°C hasta su empleo (163).

Luego de la electroforesis los geles SDS-PAGE fueron teñidos o no con Coomassie Blue, se incubaron 30 min a T°amb en 1M salicilato de Na, secaron y expusieron a -70°C utilizando placas Kodak X-Omat (164).

5.13 Inmunoprecipitación.

El sobrenadante (100 μl) obtenido luego de la marcación [9,10-³H]-ácido palmítico se incubó con una dilución 1:600 del anticuerpo anti-GumB en buffer Tritón (2% (v/v) Tritón X-100, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl y 0,1 mM EDTA) a 4°C durante 16 h. Se agregaron 75 μl de proteína A-Sepharosa CL-4B (10% (p/v) en buffer Tritón) y se incubó a 4°C durante 3 h. Luego de centrifugar a 7000 x g durante 1 min, se lavó 2 veces el precipitado con buffer Tritón y una vez con 10 mM Tris/HCl pH 8 ((163). El precipitado se calentó con buffer para electroforesis (20% glicerol, 6% SDS y 125 mM Tris/HCl, pH 6,8) a 80°C durante 3 min. Se centrifugó a 7000 x g, 10 min y el sobrenadante se sembró en SDS-PAGE 10% tricina con glicerol. Para la transferencia de las muestras [³H] a membranas de PVDF se utilizó buffer 25 mM Na fosfato pH 7,0; 10% metanol. Las membranas se lavaron con agua y una vez secas se expusieron a -70°C utilizando placas Kodak X-Omat. Luego se procedió a la inmunodetección con anticuerpos anti-GumB 1:3000.

5.14 Incubaciones con globomicina.

Células de *X. campestris* fueron cultivadas en medio XOL a 28°C hasta una $DO_{600\text{nm}}$ entre 0,4 - 0,8. Se agregó globomicina (resuspendida en etanol) en diferentes concentraciones (0-200 $\mu\text{g/ml}$) y se incubó a distintos tiempos. Las bacterias de 1 ml de cultivo se fueron colectadas por centrifugación y resuspendidas en buffer de muestra. Las muestras se procesaron para el análisis por SDS-PAGE 14% e inmunodetección con anticuerpos anti-GumB 1:3000 (165).

La globomicina fue donada por Sankyo Co, Japón.

5.15 Fraccionamiento subcelular.

5.15.1 Lisis celular y separación de membranas por gradientes isopícnicos

Células de *X. campestris* se cultivaron en medio YM hasta fase exponencial tardía y se lavaron varias veces con agua MilliQ fría para eliminar el polisacárido adherido. Se resuspendieron en buffer 10 mM Tris/HCl pH 7,4, DNasa I (50 µg/ml), RNasa (50 µg/ml) (100g/ml de peso húmedo) y se rompieron por pasajes sucesivos en una celda de French-Press (18000 psi). Las células sin romper se eliminaron por centrifugación a baja velocidad (5000 x g, 10 min), al sobrenadante se agregó MgCl₂ (1 mM final) y se centrifugó a 45000 x g durante 45 min. El sobrenadante o fracción soluble (periplasma y citoplasma) se precipitó con un volumen de 10% TCA frío, se resuspendió en 10 mM Tris/HCl pH 7,4 y se guardó a -20°C. El precipitado o fracción de membranas totales, se lavó con 10 mM Tris/HCl pH 7,4 y se resuspendió en 1 ml del mismo buffer. Las membranas se separaron en gradientes de sacarosa (45-70%) (166) por centrifugación a 110000 x g a 4°C durante 20 h. Se tomaron fracciones de 1 ml y se midió absorbancia a 280nm.

Según el perfil de proteínas obtenido, las fracciones del gradiente se agruparon en 4 *grupos* (I al IV). La identidad de cada tipo de membrana se llevó a cabo mediante la determinación de la actividad enzimática del marcador de membrana interna NADH oxidasa (167) y del marcador de membrana externa, KDO (168).

5.15.2 Purificación de la fracción periplasmática

La fracción de periplasma de células de *X. campestris* se obtuvo mediante tres procedimientos diferentes: formación de esferoplastos (163), *shock* osmótico y por extracción con buffer TEX (50 mM TrisHCl pH8, 3 mM EDTA, 0.1% Tritón X-100) (130). En cada caso, las fracciones de membranas totales y citoplasma se obtuvieron por centrifugación luego de la ruptura de las células por sonicación o pasaje a través de la *French-Press*. La identidad de cada fracción se determinó por medición de actividad de fosfatasa alcalina (periplasma) e inmunodetección de OprF (ME). La fracción periplasmática se concentró por medio de filtros Biomax10K (Millipore) y las proteínas se separaron por cromatografía de exclusión molecular, Superdex S-200, equilibrada en buffer TEX. Para la calibración de la columna se utilizaron como marcadores de masa molecular las siguientes proteínas (Amersham Pharmacia): quimotripsinógeno (25 kDa, 17,5 ml), albúmina (67 kDa, 12,7 ml), aldolasa (158 kDa, 12,6 ml) catalasa (232 kDa, 12ml) y ferritina (440 kDa, 9,6 ml).

El anticuerpo anti-OprF fue cedido por el Dr. Harry Gilleland

5.15.3 Purificación de la fracción de proteínas de membrana con Tritón X-100

Células de *X. campestris* se cultivaron en medio YM (100 ml) hasta fase exponencial tardía y se lavaron varias veces con agua MilliQ fría para eliminar el polisacárido adherido. Se resuspendieron en 10 ml de buffer fosfato 10 mM pH 7,0, 1 mM PMSF y se rompieron por pasajes sucesivos en una celda de French-Press (18000 psi). Las células sin romper se eliminaron por centrifugación a baja velocidad (5000 x g, 10 min) y el sobrenadante se centrifugó a 45000 x g durante 45 min a 4°C. La fracción soluble (periplasma y citoplasma) se precipitó con un volumen de 10% TCA frío, se resuspendió en 10 mM Tris/HCl pH 7,4 y se guardó a -20°C. El precipitado o fracción de membranas totales se lavó con 10 ml de buffer fosfato 10 mM pH 7,0, 1 mM PMSF, se resuspendió en 5 ml de

buffer A (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 2% Tritón X-100) y se incubó por 30 min a 4°C con agitación. La fracción no soluble al detergente se eliminó por centrifugación a 11000 x g a 4°C durante 10 min (123).

Cromatografía de intercambio iónico

Las proteínas solubilizadas con Tritón X-100 (10 mg) se separaron mediante FPLC en una columna de intercambio iónico QHiperD preequilibrada con buffer A y se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl entre 0 y 1M en el mismo buffer. Las fracciones con analizaron por inmunodetección con anticuerpos anti-GumB y anti-GumC,

Cromatografía por exclusión molecular

Las fracciones de interés de la columna QHiperD se agruparon y precipitaron por la adición de sulfato de amonio hasta una concentración final del 70%. El pellet obtenido por centrifugación se resuspendió en buffer B (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,2M NaCl, 1% ácido deoxicólico (DOC)). Las muestras se separaron mediante FPLC en una columna de filtración por gel Superdex S200 (Pharmacia Biotech) preequilibrada con buffer B. Las fracciones eluidas se analizaron en SDS-PAGE e inmunodetección. La columna se calibró con los siguientes estándares de peso molecular: tiroglobulina (669 kDa, 8,6 ml), ferritina (443 Da, 10,1 ml), catalasa (232 kDa, 12,8 ml), seroalbumina bovina (67 kDa, 11,9 ml) y quimotripsinógeno A (25 kDa, 15,4 ml).

5.16 Purificación de las proteínas asociadas al sáculo de mureína

Se procedió según la técnica de Zhang y col. modificada (118). Cultivos en fase exponencial de *X. campestris* se cosecharon y resuspendieron en 10 mM buffer fosfato pH 7,0 (buffer A). Luego de la ruptura de las células por sonicación, se aisló la pared celular por centrifugación a 45000 x g a 4°C durante 1 h, y se incubó con 1% SDS en buffer A a 100°C durante 20 min. La fracción soluble (S) se separó de la fracción no soluble (NS) por centrifugación a 200.000 x g a 4°C durante 1h. La fracción NS, se incubó con 4% SDS en buffer A. Luego de centrifugar a 200.000 x g a 4°C durante 90 min, el pellet, sáculo de mureína, se lavó con agua, se resuspendió en buffer A y se incubó a 37°C toda la noche con 200 µg/ml de lisozima. Las proteínas unidas al sáculo de mureína se colectaron en la fracción soluble.

5.17 Entrecruzamiento (*crosslinking*) de proteínas *in vivo*

5.17.1 Formaldehído

Cultivos en fase exponencial de *X. campestris* se lavaron varias veces con agua MilliQ fría y se resuspendidos en un volumen de 10 mM buffer fosfato pH 7,0 (buffer A) equivalente a OD₆₀₀=1. Luego se incubaron a 28°C durante 2 h sin agitación en presencia de 0,1, 0,5 y 1% de formaldehído (37% p/p, Sigma). Las muestras (1 ml) fueron lavadas con buffer A frío, resuspendidas en buffer de muestra (157) e incubadas 10 min a 60°C y 20 min a 100°C para revertir el entrecruzamiento (126).

5.17.2 Glutaraldehído

Las células de *X. campestris* se cultivaron en medio TYE hasta fase exponencial tardía y se incubaron con 2,5, 5 y 10 mM de glutaraldehído (25% p/p, Sigma) durante 10 min a 28°C con agitación. Las bacterias fueron colectadas por centrifugación, resuspendidas en buffer de muestra (157) con urea e incubadas 5 min a 100°C. El mismo procedimiento se utilizó posteriormente fijando la concentración de glutaraldehído en 5 mM y realizando la incubación a distintos tiempos (0, 10, 20 y 30 min) (123).

5.18 Cuantificación del contenido de proteínas

La concentración de proteínas en los lisados de células se determinó según el método de Lowry (157). La concentración de proteínas en las fracciones de membrana se determinó según el método de Markwell y col. (169).

5.19 Análisis de la biosíntesis de xantano y de los lípido-azúcares intermediarios *in vitro*

5.19.1 Reactivos, solventes y soluciones utilizados

UDP-Glc, GDP-Man, UDPGlcA, fueron provistos por Sigma-Aldrich. El precursor radiactivo UDP-(¹⁴C)GlcA (300Ci/mol) fue sintetizado enzimáticamente según métodos ya descritos (4) por Susana Raffo en el Instituto Leloir.

Solución de permeabilización 10 mM EDTA, Tris (pH 8,2)

Solución Stop 70 mM Tris-HCl (pH 8,2)

Mezcla 1203 Cloroformo-metanol-agua (1:2:0,3 v/v/v)

Buffer A 0.1 M acetato de piridina (pH 5,5)

Solvente A Isopropanol-ácido acético-agua (27:4:9 v/v/v)

5.19.2 Preparaciones enzimáticas

Se prepararon según el protocolo descrito por Ielpi y col. (4). Células de *X. campestris* se cultivaron hasta fase logarítmica tardía en medio YM, se centrifugaron y resuspendieron en 1/25 del volumen inicial del cultivo en solución de permeabilización. Esta preparación se sometió a 3 ciclos de congelamiento (en nitrógeno líquido)/descongelamiento (en agua a T°amb) y posterior incubación con DNasa I (Sigma) y 30 mM MgCl₂. Las células permeabilizadas con EDTA se conservaron a -20°C hasta su utilización en los ensayos *in vitro*.

La mezcla para la síntesis de los intermediarios lipídicos del xantano contenía: 70 mM Tris-HCl (pH 8,2), 8 mM MgCl₂, células permeabilizadas (0,6 a 0,8 mg de proteínas), 285 μM UDP-Glc, 142 μM GDP-Man y 17,1 μM UDP-[¹⁴C]GlcA. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final 70 μl durante 30 min a 20°C y se detuvieron con el agregado de 0,2 ml de solución Stop. Las mezclas fueron agitadas vigorosamente con vortex y centrifugadas 5 min a 6000 x g. Este paso se repitió dos veces más combinándose los sobrenadantes (que contienen los nucleótidos-azúcares no utilizados y

los productos de polimerización). El pellet se extrajo 3 veces con 150 μ l de mezcla 1203. Este extracto contiene los lípidos-azúcares intermediarios (será referido como extracto 1203).

En los estudios de la actividad ATPasa las muestras se procesaron como se indica en el párrafo anterior con el agregado de 200 μ M final de vanadato (Sigma) en la incubación. Se preparó una solución madre de vanadato 100 mM en agua MQ y se llevó a pH 10 con HCl. Se incubó la solución a 100° C hasta que se tornara incolora. Se dejó enfriar, rectificó el pH y se guardó a -20° C (142).

5.19.3 Análisis de los intermediarios lipídicos sintetizados *in vitro*

El extracto 1203 fue sometido a una hidrólisis ácida suave (0,01 N HCl, a 100°C durante 10 min). En estas condiciones sólo los enlaces fosfato se hidrolizan liberando el oligosacárido marcado del lípido. Los productos de la hidrólisis se analizaron en una cromatografía descendente en papel (Whatman 1) en solvente A utilizando como patrones maltooligosacáridos y celobiosa (4). Las áreas radioactivas se detectaron utilizando un radiocromatógrafo Packard, modelo 7201 (Packard Instruments).

5.19.4 Análisis del xantano sintetizado *in vitro*

Los sobrenadantes de las reacciones *in vitro* se analizaron por filtración en gel en una columna de Biogel A 5M (27 ml) en buffer A. Se colectaron fracciones de 1 ml y se determinó la cantidad de radiactividad asociada a cada muestra por centelleo líquido. Los experimentos se realizaron por duplicado. Para la calibración de la columna se utilizaron como marcadores de masa molecular: ferritina (volumen de exclusión) y CoCl (volumen de inclusión).

5.20 Aislamiento, purificación y análisis de xantano producido *in vivo*

5.20.1 Condiciones del cultivo

Una colonia de *X. campestris* en medio sólido YM fue transferida a medio líquido YM a 30°C con agitación (300 rpm) durante una noche. Este cultivo se utilizó para inocular 100 ml del medio de producción, SFF-XOL (40 g glucosa, 1,25 g extracto de levadura, 1,25 gL triptona, 10 g K₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄ , 1 g (NH₄)₂SO₄, 0,01 g FeSO₄.7 H₂O, 0,1 g MgCl₂, 0,001 g MnCl₂, pH 7,0, por litro de agua corriente), el cual se cultivó en las mismas condiciones hasta fase estacionaria (96 h) o hasta que solo quede 0,5% de glucosa en el medio. La concentración de glucosa remanente se midió por el método de detección con DNS (170)

El crecimiento celular se determinó por la absorbancia a 600 nm del cultivo. Cuando fue necesario según la viscosidad del medio, las muestras fueron diluidas en agua corriente entre 4 y 6 veces, centrifugadas a 14000 x g a 4°C durante 10 min. Las células se resuspendieron en agua (igual volumen que el original) y se midió la DO₆₀₀.

5.20.2 Determinación de la concentración de xantano

Método gravimétrico

El polisacárido fue precipitado directamente del medio de cultivo por adición de 2 volúmenes de 2-propanol. El EPS precipitado se sometió a lavados sucesivos con concentraciones crecientes de

etanol en agua (desde 80 a 96% v/v) (137). Por último, las fibras obtenidas se secaron 16 h a 55°C y se determinó su peso seco (en estas condiciones menos del 20% corresponde a bacterias (171).

Método colorimétrico

El contenido de ácidos urónicos del xantano precipitado se determinó por reacción con *m*-hidroxidifenilo según el método descrito por Filisetti-Cozzi y col. (172) Alternativamente, se utilizó el método de precipitación de EPS con sales de amonio cuaternarias (CPC) según lo descrito por Scott y col.(173). Para la confección de la curva estándar se utilizó xantano comercial (KeltrolF, CP Kelco, CA, USA).

5.20.3 Análisis de la composición del xantano

Las concentraciones de glucosa, manosa y ácido pirúvico se determinaron por HPLC en una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) luego de hidrolizar las muestras con ácido trifluoroacético a 120°C. Se utilizó 5 mM de ácido sulfúrico a 40°C como fase móvil con un flujo de 0.6 ml/min. La detección de azúcares se realizó con un detector de índice de refracción (Hewlett Packard modelo 1047 A) y la de ácidos orgánicos con un detector UV a 220 nm (Hewlett Packard modelo 35900) (174) Para la determinación espectrofotométrica de ácido acético se utilizó el kit N° 148261 de Boehringer Mannheim de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5.20.4 Determinación del comportamiento reológico del xantano

Medición de LSRV (*low share rate viscosity*)

Se prepararon soluciones diluidas de xantano molido (0,25% en 0,1% de NaCl) a las que se midió la viscosidad aparente a T°amb utilizando un viscosímetro Brookfield LVD con un *spindle* N°1 a 3 rpm.

Determinación de la viscosidad intrínseca $[\eta]$

Las muestras se prepararon por diluciones sucesivas de una solución madre 0,25% de xantano (en 0,01M NaCl). Para cada dilución se determinó (por triplicado) la *viscosidad aparente* (n_c) mediante un analizador de viscoelasticidad (Vilastic Scientific, Inc., Austin, Tx). Con estos datos, de acuerdo con la ecuación 1, se calculó la *viscosidad específica reducida* (n_{sp}/c).

$$(1) \quad n_{sp}/c = ((n_c - n_o)/n_o)$$

Se graficó (n_{sp}/c) en función de la concentración de xantano (c), y por extrapolación a dilución infinita ($c = 0$) se obtuvo la *viscosidad intrínseca* $[\eta]$ de la muestra (175). La viscosidad intrínseca es proporcional al tamaño molecular para un polímero particular bajo ciertas condiciones de temperatura y solvente. Esta relación está dada por la ecuación 2 de Mark-Houwink-Sakurada, (en donde las constantes K y a son específicas del tipo de polímero, temperatura y solvente utilizados) (176). Para el xantano, $K=1,70 \times 10^{-4}$ ml/g y $a= 1.14$ en las condiciones ensayadas (177), ecuación 3.

$$(2) \quad [\eta] = K M^a$$

$$(3) \quad [\eta] = 1,7 \times 10^{-4} M^{1,14}$$

Medición del tamaño individual de las moléculas de xantano (M_r)

Se determinó mediante la visualización directa de las moléculas de xantano por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) (178).

La preparación de las soluciones de xantano para microscopía y el montaje de las muestras sobre discos de mica se llevó a cabo según lo establecido por McIntire y col. (179). Se utilizó un microscopio Nanoscope IIIa (Digital Instrument, Santa Barbara, CA, USA), en modalidad no-contacto (*tapping*) con un punta de nitruro de silicio en el *cantilever*. Las imágenes se tomaron, digitalizaron y procesaron con el programa que provee Digital Instruments. Se analizaron ~ 500 moléculas para cada condición. El grado de polidispersión en la muestra se calculó como la razón entre el promedio pesado (L_w) y el promedio numérico (L_n) de la longitud de la cadena, donde $L_n = \sum_n n_i L_i / \sum_n n_i$ y $L_w = \sum_n n_i L_i^2 / \sum_n n_i L_i$ (180).

Los ensayos y determinaciones realizados en las secciones 5.20.3 y 5.20.4 se llevaron a cabo en el departamento de Investigación y Desarrollo de CP Kelco U.S. Inc, San Diego, CA, USA.

6.

Bibliografía

- 1- **Raetz, C. R. and C. Whitfield** (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* **71**(10): 635-700.
- 2- **Jansson, P. E., L. Kenne and B. Lindberg** (1975). Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr Res* **45**: 275-82.
- 3- **Born, K., V. Langerdoff and P. Boulenguer** (2002). Xanthan. Weinheim ; New York, Wiley-VCH.
- 4- **Ielpi, L., R. O. Couso and M. A. Dankert** (1993). Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. *Journal of Bacteriology* **175**(9): 2490-500.
- 5- **Reeves, P. R., M. Hobbs, M. A. Valvano, M. Skurnik, C. Whitfield, D. Coplin, N. Kido, J. Klena, D. Maskell, C. R. Raetz and P. D. Rick** (1996). Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends in Microbiology* **4**(12): 495-503.
- 6- **Sutherland, I. W.** (1985). Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annual Review of Microbiology* **39**: 243-70.
- 7- **Leigh, J. A. and D. L. Coplin** (1992). Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual Review of Microbiology* **46**: 307-46.
- 8- **Sutherland, I. W.** (2001). The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* **9**(5): 222-7.
- 9- **Roberts, I. S.** (1995). Bacterial polysaccharide in sickness and in health. *Microbiology* **141**: 2023-2031.
- 10- **Sutherland, I. W.** (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology* **16**(1): 41-6.
- 11- **Yalpani, M.** (1987). Industrial polysaccharides : genetic engineering, structure/property relations, and applications : proceedings of the Symposium on the Applications and Modifications of Industrial Polysaccharides, held during the 193rd American Chemical Society National Meeting, Denver, Colorado, U.S.A., 5-10 April 1987. Amsterdam ; New York, Elsevier.
- 12- **Monchois, V., Willemot, RM, Remaud-Simeon, M, Croux, C, Monsan, P.** (1996). Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only alpha (1-6) and alpha (1-3) linkages. *Gene* **182**(1-2): 23-32.
- 13- **Song, K., Joo, H.K., Rhee S.K.** (1993). Nucleotide sequence of levansucrase gene (levU) of *Zymomonas mobilis* ZM1. *Biochim Biophys Acta* **1173**(3): 320-4.
- 14- **Castro, O., Zorreguieta, A, Ielmini, V, Vega, G, Ielpi, L.** (1996). Cyclic beta-(1,2)-glucan synthesis in Rhizobiaceae: roles of the 319-kilodalton protein intermediate. *J Bacteriol* **178**(20): 6043-8.
- 15- **Sutherland, I. W.** (1970). Structure of *Klebsiella aerogenes* type 8 polysaccharide. *Biochemistry* **9**(10): 2180-5.
- 16- **Kang, K. S. and D. J. Pettit** (1993). Xanthan, gellan, wellan and rhamansam. Industrial gums, Academic Press, Inc.: 341-397.

- 17- **Bernstein, H. D.** (2000). The biogenesis and assembly of bacterial membrane proteins. *Current Opinion in Microbiology* **3**(2): 203-9.
- 18- **Beveridge, T. J.** (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology* **181**(16): 4725-33.
- 19- **Nikaido, H.** (1999). Microdermatology: cell surface in the interaction of microbes with the external world. *Journal of Bacteriology* **181**(1): 4-8.
- 20- **Koebnik, R., K. P. Locher and P. Van_Gelder** (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology* **37**(2): 239-53.
- 21- **Saurin, W., M. Hofnung and E. Dassa** (1999). Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* **48**(1): 22-41.
- 22- **Saier, M. H.** (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : Mmbr* **64**(2): 354-411.
- 23- **Broome-Smith, J. K., S. Baumberg, C. J. Stirling and F. B. Ward** (1999). Transport of molecules across microbial membranes, Cambridge University Press.
- 24- **Wunder, D. E., W. Aaronson, S. F. Hayes, J. M. Bliss and R. P. Silver** (1994). Nucleotide sequence and mutational analysis of the gene encoding KpsD, a periplasmic protein involved in transport of polysialic acid in Escherichia coli K1. *J Bacteriol* **176**(13): 4025-33.
- 25- **Arrecubieta, C., T. C. Hammarton, B. Barrett, S. Chareonsudjai, N. Hodson, D. Rainey and I. S. Roberts** (2001). The transport of group 2 capsular polysaccharides across the periplasmic space in Escherichia coli. Roles for the KpsE and KpsD proteins. *J Biol Chem* **276**(6): 4245-50.
- 26- **Nesper, J., C. M. Hill, A. Paiment, G. Harauz, K. Beis, J. H. Naismith and C. Whitfield** (2003). Translocation of group 1 capsular polysaccharide in Escherichia coli serotype K30. Structural and functional analysis of the outer membrane lipoprotein Wza. *The Journal of Biological Chemistry* **278**(50): 49763-72.
- 27- **Paetzel, M., A. Karla, N. Strynadka and R. Dalbey** (2002). Signal peptidases. *Chem. Rev* **102**(12): 4549-4580.
- 28- **Morona, R., L. Van_Den_Bosch and C. Daniels** (2000). Evaluation of Wzz/MPA1/MPA2 proteins based on the presence of coiled-coil regions. *Microbiology* **146**(1): 1-4.
- 29- **Paulsen, I. T., A. M. Beness and M. H. Saier** (1997). Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria. *Microbiology* **143**(8): 2685-99.
- 30- **Frosch, M., U. Edwards, K. Bousset, B. Krausse and C. Weisgerber** (1991). Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. *Mol Microbiol* **5**(5): 1251-63.
- 31- **Becker, A., K. Niehaus and A. Puhler** (1995). Low-molecular-weight succinoglycan is predominantly produced by Rhizobium meliloti strains carrying a mutated ExoP protein characterized by a periplasmic N-terminal domain and a missing C-terminal domain. *Molecular Microbiology* **16**(2): 191-203.
- 32- **Wugeditsch, T., A. Paiment, J. Hocking, J. Drummelsmith, C. Forrester and C. Whitfield** (2001). Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assembly of group 1 capsular polysaccharides in Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry* **276**(4): 2361-71.

- 33- Yamazaki, M., L. Thorne, M. Mikolajczak, R. W. Armentrout and T. J. Pollock (1996). Linkage of genes essential for synthesis of a polysaccharide capsule in *Sphingomonas* strain S88. *J Bacteriol* **178**(9): 2676-87.
- 34- Dassa, E. and P. Bouige (2001). The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol* **152**(3-4): 211-29.
- 35- Silver, R. P., K. Prior, C. Nsahlai and L. F. Wright (2001). ABC transporters and the export of capsular polysaccharides from gram-negative bacteria. *Res Microbiol* **152**(3-4): 357-64.
- 36- Pigeon, R. P. and R. P. Silver (1994). Topological and mutational analysis of KpsM, the hydrophobic component of the ABC-transporter involved in the export of polysialic acid in *Escherichia coli* K1. *Mol Microbiol* **14**(5): 871-81.
- 37- Nsahlai, C. J. and R. P. Silver (2003). Purification and characterization of KpsT, the ATP-binding component of the ABC-capsule exporter of *Escherichia coli* K1. *FEMS Microbiol Lett* **224**(1): 113-8.
- 38- Gonzalez, J. E., C. E. Semino, L. X. Wang, L. E. Castellano-Torres and G. C. Walker (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**(23): 13477-82.
- 39- Alexander, D. C. and M. A. Valvano (1994). Role of the *rfe* gene in the biosynthesis of the *Escherichia coli* O7-specific lipopolysaccharide and other O-specific polysaccharides containing N-acetylglucosamine. *Journal of Bacteriology* **176**(22): 7079-84.
- 40- Yao, Z. and M. A. Valvano (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. *Journal of Bacteriology* **176**(13): 4133-43.
- 41- Wang, L., D. Liu and P. R. Reeves (1996). C-terminal half of *Salmonella enterica* WbaP (RfbP) is the galactosyl-1-phosphate transferase domain catalyzing the first step of O-antigen synthesis. *Journal of Bacteriology* **178**(9): 2598-604.
- 42- Amer, A. O. and M. A. Valvano (2002). Conserved aspartic acids are essential for the enzymic activity of the WecA protein initiating the biosynthesis of O-specific lipopolysaccharide and enterobacterial common antigen in *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**(Pt 2): 571-82.
- 43- Liu, D., R. A. Cole and P. R. Reeves (1996). An O-antigen processing function for Wzx (RfbX): a promising candidate for O-unit flippase. *Journal of Bacteriology* **178**(7): 2102-7.
- 44- Feldman, M. F., C. L. Marolda, M. A. Monteiro, M. B. Perry, A. J. Parodi and M. A. Valvano (1999). The activity of a putative polyisoprenol-linked sugar translocase (Wzx) involved in *Escherichia coli* O antigen assembly is independent of the chemical structure of the O repeat. *The Journal of Biological Chemistry* **274**(49): 35129-38.
- 45- Marolda, C. L., J. Vicarioli and M. A. Valvano (2004). Wzx proteins involved in biosynthesis of O antigen function in association with the first sugar of the O-specific lipopolysaccharide subunit. *Microbiology* **150**(Pt 12): 4095-105.
- 46- Collins, L. V. and J. Hackett (1991). Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the *rfc* gene, which encodes an O-antigen polymerase of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **173**(8): 2521-9.
- 47- Daniels, C., C. Vindurampulle and R. Morona (1998). Overexpression and topology of the *Shigella flexneri* O-antigen polymerase (Rfc/Wzy). *Molecular Microbiology* **28**(6): 1211-22.

- 48- **Whitfield, C.** (1995). Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends in Microbiology* **3**(5): 178-85.
- 49- **Bastin, D. A., G. Stevenson, P. K. Brown, A. Haase and P. R. Reeves** (1993). Repeat unit polysaccharides of bacteria: a model for polymerization resembling that of ribosomes and fatty acid synthetase, with a novel mechanism for determining chain length. *Molecular Microbiology* **7**(5): 725-34.
- 50- **Whitfield, C., P. A. Amor and R. Koplín** (1997). Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Molecular Microbiology* **23**(4): 629-38.
- 51- **Rick, P. D., G. L. Hubbard and K. Barr** (1994). Role of the rfe gene in the synthesis of the O8 antigen in Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **176**(10): 2877-84.
- 52- **Susskind, M., L. Brade, H. Brade and O. Holst** (1998). Identification of a novel heptoglycan of alpha1-->2-linked D-glycero-D-manno-heptopyranose. Chemical and antigenic structure of lipopolysaccharides from Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae rough strain R20 (O1-:K20-). *J Biol Chem* **273**(12): 7006-17.
- 53- **Guan, S., A. J. Clarke and C. Whitfield** (2001). Functional analysis of the galactosyltransferases required for biosynthesis of D-galactan I, a component of the lipopolysaccharide O1 antigen of Klebsiella pneumoniae. *Journal of Bacteriology* **183**(11): 3318-27.
- 54- **Reizer, J., A. Reizer and M. H. Saier, Jr.** (1992). A new subfamily of bacterial ABC-type transport systems catalyzing export of drugs and carbohydrates. *Protein Sci* **1**(10): 1326-32.
- 55- **Manting, E. H. and A. J. Driessen** (2000). Escherichia coli translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol Microbiol* **37**(2): 226-38.
- 56- **Chu, S., B. Noonan, S. Cavaignac and T. J. Trust** (1995). Endogenous mutagenesis by an insertion sequence element identifies Aeromonas salmonicida AbcA as an ATP-binding cassette transport protein required for biogenesis of smooth lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5754-8.
- 57- **Vinogradov, E., E. Fridrich, L. L. MacLean, M. B. Perry, B. O. Petersen, J. Å. Duus and C. Whitfield** (2002). Structures of lipopolysaccharides from Klebsiella pneumoniae. Elucidation of the structure of the linkage region between core and polysaccharide O chain and identification of the residues at the non-reducing termini of the O chains. *The Journal of Biological Chemistry* **277**(28): 25070-81.
- 58- **Keenleyside, W. J., M. Perry, L. Maclean, C. Poppe and C. Whitfield** (1994). A plasmid-encoded rfbO:54 gene cluster is required for biosynthesis of the O:54 antigen in Salmonella enterica serovar Borreze. *Molecular Microbiology* **11**(3): 437-48.
- 59- **Keenleyside, W. J. and C. Whitfield** (1996). A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in Salmonella enterica serovar Borreze. *The Journal of Biological Chemistry* **271**(45): 28581-92.
- 60- **Mulford, C. A. and M. J. Osborn** (1983). An intermediate step in translocation of lipopolysaccharide to the outer membrane of Salmonella typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(5): 1159-63.
- 61- **Heinrichs, D. E., M. A. Monteiro, M. B. Perry and C. Whitfield** (1998). The assembly system for the lipopolysaccharide R2 core-type of Escherichia coli is a hybrid of those found in Escherichia coli K-12 and Salmonella enterica. Structure and function of the R2 WaaK and WaaL homologs. *The Journal of Biological Chemistry* **273**(15): 8849-59.

- 62- **Kaniuk, N. A., E. Vinogradov and C. Whitfield** (2004). Investigation of the structural requirements in the lipopolysaccharide core acceptor for ligation of O antigens in the genus Salmonella: WaaL "ligase" is not the sole determinant of acceptor specificity. *J Biol Chem* **279**(35): 36470-80.
- 63- **Gaspar, J. A., J. A. Thomas, C. L. Marolda and M. A. Valvano** (2000). Surface expression of O-specific lipopolysaccharide in Escherichia coli requires the function of the TolA protein. *Molecular Microbiology* **38**(2): 262-75.
- 64- **Roberts, I. S.** (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **50**: 285-315.
- 65- **Arakawa, Y., R. Wacharotayankun, T. Nagatsuka, H. Ito, N. Kato and M. Ohta** (1995). Genomic organization of the Klebsiella pneumoniae cps region responsible for serotype K2 capsular polysaccharide synthesis in the virulent strain Chedid. *Journal of Bacteriology* **177**(7): 1788-96.
- 66- **Drummel-Smith, J. and C. Whitfield** (1999). Gene products required for surface expression of the capsular form of the group 1 K antigen in Escherichia coli (O9a:K30). *Molecular Microbiology* **31**(5): 1321-32.
- 67- **Amor, P. A. and C. Whitfield** (1997). Molecular and functional analysis of genes required for expression of group IB K antigens in Escherichia coli: characterization of the his-region containing gene clusters for multiple cell-surface polysaccharides. *Molecular Microbiology* **26**(1): 145-61.
- 68- **Whitfield, C. and I. S. Roberts** (1999). Structure, assembly and regulation of expression of capsules in Escherichia coli. *Molecular Microbiology* **31**(5): 1307-19.
- 69- **Drummel-Smith, J. and C. Whitfield** (2000). Translocation of group 1 capsular polysaccharide to the surface of Escherichia coli requires a multimeric complex in the outer membrane. *The Embo Journal* **19**(1): 57-66.
- 70- **Beis, K., R. F. Collins, R. C. Ford, A. B. Kamis, C. Whitfield and J. H. Naismith** (2004). Three-dimensional Structure of Wza, the Protein Required for Translocation of Group 1 Capsular Polysaccharide across the Outer Membrane of *Escherichia coli*. *The Journal Of Biological Chemistry* **279**(27): 28227-32.
- 71- **Rahn, A., K. Beis, J. H. Naismith and C. Whitfield** (2003). A novel outer membrane protein, Wzi, is involved in surface assembly of the Escherichia coli K30 group 1 capsule. *Journal of Bacteriology* **185**(19): 5882-90.
- 72- **Rigg, G. P., B. Barrett and I. S. Roberts** (1998). The localization of KpsC, S and T, and KfiA, C and D proteins involved in the biosynthesis of the Escherichia coli K5 capsular polysaccharide: evidence for a membrane-bound complex. *Microbiology* **144**(10): 2905-14.
- 73- **Rosenow, C., F. Esumeh, I. S. Roberts and K. Jann** (1995). Characterization and localization of the KpsE protein of Escherichia coli K5, which is involved in polysaccharide export. *J Bacteriol* **177**(5): 1137-43.
- 74- **Robles-Price, A., T. Y. Wong, H. Sletta, S. Valla and N. L. Schiller** (2004). AlgX Is a Periplasmic Protein Required for Alginate Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **186**(21): 7369-77.
- 75- **Glucksmann, M. A., T. L. Reuber and G. C. Walker** (1993). Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by Rhizobium meliloti: a model for succinoglycan biosynthesis. *J Bacteriol* **175**(21): 7045-55.
- 76- **Niemeyer, D. and A. Becker** (2001). The molecular weight distribution of succinoglycan produced by Sinorhizobium meliloti is influenced by specific tyrosine phosphorylation and ATPase activity of the cytoplasmic domain of the ExoP protein. *J Bacteriol* **183**(17): 5163-70.

- 77- **Becker, A. and A. Puhler** (1998). Specific amino acid substitutions in the proline-rich motif of the *Rhizobium meliloti* ExoP protein result in enhanced production of low-molecular-weight succinoglycan at the expense of high-molecular-weight succinoglycan. *J Bacteriol* **180**(2): 395-9.
- 78- **Sanford, P. A., Pittsley, J.E., Knutson, C.A., Watson, P.R., Cadmus, M.C. and Janes, A.** (1977). Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. *Extracellular Microbial Polysaccharides*. P. A. Sanford and A. Laskins. Washington, DC., American Chemical Society. **45**: 192-210.
- 79- **Kelco** (1994). Xanthan Gum: natural biogum for scientific water control. Whitehouse Station, NJ, Merck & Co., Inc.
- 80- **Dintzis, F. R., G. E. Babcock and R. Tobin** (1970). Studies on dilute solutions and dispersions of the polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Carbohydrate Research* **13**(2): 257-267.
- 81- **Capron, I., S. Alexandre and G. Muller** (1998). An atomic force microscopy study of the molecular organisation of xanthan. *Polymer* **39**(23): 5725-5730.
- 82- **Moorhouse, R., M. D. Walkinshaw and S. Arnott** (1977). *Xanthan Gum-Molecular Conformation and Interactions*. *Extracellular Microbial Polysaccharides*. P. A. Sanford and A. Laskins. Washington, DC., ACS Symp. Ser. No.45, Am. Chem. Soc., **1**: 81.
- 83- **Whitcomb, P. J., Macosko, C.W.** (1978). Rheology of xanthan gum. *Journal of Rheology* **22**(5): 493-505.
- 84- **Liu, W., T. Sato, T. Norisuye and H. Fujita** (1987). Thermally induced conformational change of xanthan in 0.01 aqueous sodium chloride. *Carb. Res* **160**: 267-281.
- 85- **Capron, I., G. Brigand and G. Muller** (1997). About the native and renatured conformation of xanthan exopolysaccharide. *Polymer* **38**(21): 5289-5295.
- 86- **Whistler, R. L. and J. N. BeMiller** (1993). Industrial gums : polysaccharides and their derivatives. San Diego, Academic Press.
- 87- **Morris, E. R., D. A. Rees, G. Young, M. D. Walkinshaw and A. Darke** (1977). Order-disorder transition for a bacterial polysaccharide in solution. A role for polysaccharide conformation in recognition between *Xanthomonas* pathogen and its plant host. *J Mol Biol* **110**(1): 1-16.
- 88- **Norton, I. T., D. M. Goodall, S. A. Frangou, E. R. Morris and D. A. Rees** (1984). Mechanism and dynamics of conformational ordering in xanthan polysaccharide. *J Mol Biol* **175**(3): 371-94.
- 89- **Booth, C. and C. Price** (1998). Polymer characterization. Oxford, Pergamon Press.
- 90- **Lee, J. and A. Trpathi** (2005). Intrinsic viscosity of polymers and biopolymers measured by microchip. *Analytical Chemistry* **77**: 7137-47.
- 91- **Chan, J. W. and P. H. Goodwin** (1999). The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. **17**(6): 489-508.
- 92- **Alfano, J. R. and A. Collmer** (1996). Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall. *Plant Cell* **8**(10): 1683-1698.
- 93- **Rudolph, K.** (1993). Infection of the plant by *Xanthomonas*. *Xanthomonas*. S. J.G. and C. E.L. London, Chapman and Hall: 193-264.

- 94- **Watabe, M., M. Yamaguchi, I. Furusawa and O. Horino** (1993). Virulence, and bacterial multiplication and movement in rice leaves of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* mutants impaired in productivity of extracellular polysaccharide. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **59**: 544-573.
- 95- **Hayward, A. C.** (1993). The hosts of *Xanthomonas*. *Xanthomonas*. C. E. Swings G. London, Chapman and Hall: 1-119.
- 96- **Williams, P. H.** (1980). Black rot: A continuing threat to world crucifers. *Plant Disease* **64**(8): 736-742.
- 97- **De Crécy-Lagard, V., P. Glaser, P. Lejeune, O. Sismeiro, C. E. Barber, M. J. Daniels and A. Danchin** (1990). A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* protein similar to catabolite activation factor is involved in regulation of phytopathogenicity. *Journal of Bacteriology* **172**(10): 5877-83.
- 98- **Ramirez, M. E., L. Fucikovsky, F. García-Jimenez, R. Quintero and E. Galindo** (1988). Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **29**: 5-10.
- 99- **Katzen, F., D. U. Ferreira, C. G. Oddo, M. V. Ielmini, A. Becker, A. Puhler and L. Ielpi** (1998). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *J Bacteriol* **180**(7): 1607-17.
- 100- **Ielpi, L.**, datos no publicados.
- 101- **Harding, N. E., Raffo, S., Raimondi, A., Cleary, J.M, Ielpi, L.** (1993). Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis sugar nucleotide precursors of xanthan gum. *J. Gen. Microbiol* **139**: 447-457.
- 102- **Katzen, F., A. Becker, A. Zorreguieta, A. Puhler and L. Ielpi** (1996). Promoter analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. *J Bacteriol* **178**(14): 4313-8.
- 103- **Ielpi, L., R. Couso and M. Dankert** (1981). Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of xanthan gum. *Febs Letters* **130**(2): 253-6.
- 104- **Ielpi, L., R. O. Couso and M. A. Dankert** (1983). Xanthan gum biosynthesis: acetylation occurs at the prenyl-phosphosugar state. *Biochem. Intern* **6**: 323-333.
- 105- **Crossman, L. and J. M. Dow** (2004). Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microbes Infect* **6**(6): 623-629.
- 106- **Tang, J. L., Y. N. Liu, C. E. Barber, J. M. Dow, J. C. Wootton and M. J. Daniels** (1991). Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Molecular & General Genetics* : *Mgg* **226**(3): 409-17.
- 107- **Tang, J. L., C. L. Gough and M. J. Daniels** (1990). Cloning of genes involved in negative regulation of production of extracellular enzymes and polysaccharide of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Molecular & General Genetics* : *Mgg* **222**(1): 157-60.
- 108- **Barber, C. E., J. L. Tang, J. X. Feng, M. Q. Pan, T. J. Wilson, H. Slater, J. M. Dow, P. Williams and M. J. Daniels** (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular Microbiology* **24**(3): 555-66.

- 109- **Poplawsky, A. and W. Chun** (1997). pigB determines a diffusible factor needed for extracellular polysaccharide slime and xanthomonadin production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol* **179**(2): 439-44.
- 110- **Poplawsky, A. and W. Chun** (1998). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires a functional pigB for epiphytic survival and host infection. *Mol Plant Microbe Interact* **11**(6): 466-75.
- 111- **Marzocca, M. P., N. E. Harding, E. A. Petroni, J. M. Cleary and L. Ielpi** (1991). Location and cloning of the ketal pyruvate transferase gene of *Xanthomonas campestris*. *Journal of Bacteriology* **173**(23): 7519-24.
- 112- **Koplin, R., W. Arnold, B. Hotte, R. Simon, G. Wang and A. Puhler** (1992). Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the xanA and xanB genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. *Journal of Bacteriology* **174**(1): 191-9.
- 113- **Swings, J. G. and E. L. Civerolo** (1993). *Xanthomonas*. London ; New York, Chapman & Hall.
- 114- **Marchler-Bauer, A. and S. H. Bryant** (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* **32**: 327-331.
- 115- **Hu, N. T., M. N. Hung, C. T. Liao and M. H. Lin** (1995). Subcellular location of XpsD, a protein required for extracellular protein secretion by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Microbiology* **141**(6): 1395-406.
- 116- **Sankaran, K. and H. C. Wu** (1994). Lipid modification of bacterial prolipoproteins. *J. Biol. Chem.* **269**: 19701.
- 117- **Hussain, M., S. Ichihara and S. Mizushima** (1980). Accumulation of glyceride-containing precursor of the outer membrane lipoprotein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* treated with globomycin. *J Biol Chem* **255**(8): 3707-12.
- 118- **Zhang, W. Y. and H. C. Wu** (1992). Alterations of the carboxyl-terminal amino acid residues of *Escherichia coli* lipoprotein affect the formation of murein-bound lipoprotein. *J Biol Chem* **267**(27): 19560-4.
- 119- **Osborn, M. J. and H. C. P. Wu** (1980). Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**: 369-422.
- 120- **Yakushi, T., T. Tajima, S. Matsuyama and H. Tokuda** (1997). Lethality of the covalent linkage between mislocalized major outer membrane lipoprotein and the peptidoglycan of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **179**(9): 2857-2862.
- 121- **Hu, N. T., M.-N. Hung, D. C. Chen and R.-T. Tsai** (1998). Insertion mutagenesis of XpsD, an outer membrane protein involved in extracellular protein secretion in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Microbiology* **144**: 1479-1486.
- 122- **Drake, S. L. and M. Koomey** (1995). The product of the *pilQ* gene is essential for the biogenesis of type IV pili in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **18**: 975-986.
- 123- **Chen, L. Y., D. Y. Chen, J. Miaw and N. T. Hu** (1996). XpsD, an outer membrane protein required for protein secretion by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a multimer. *The Journal of Biological Chemistry* **271**(5): 2703-2708.
- 124- **Hennessey, E. S. and J. K. Broome-Smith** (1993). Gene fusion techniques for determining membrane-protein topology. *Curr. Opin Structural Biol* **3**: 524-531.

- 125- **Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop and K. M. Peterson** (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**(1): 175-6.
- 126- **Prossnitz, E., K. Nikaido, S. J. Ulbrich and G. F. Ames** (1988). Formaldehyde and photoactivatable cross-linking of the periplasmic binding protein to a membrane component of the histidine transport system of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **263**(34): 17917-20.
- 127- **Tsai, R.-T., W.-M. Leu, L.-Y. Chen and N.-T. Hu** (2002). A reversibly dissociable ternary complex formed by XpsL, XpsM and XpsN of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus. *Biochemical Journal* **367**: 865-871.
- 128- **Kazmierczak, B. I., D. L. Mielke, M. Russel and P. Model** (1994). pIV, a filamentous phage protein that mediates phage export across the bacterial cell envelope, forms a multimer. *J Mol Biol* **238**(2): 187-98.
- 129- **Vilas, G. and L. Ielpi** (2000). Resultados sin publicar.
- 130- **Thorstenson, Y., Y. Zhang, P. Olson and D. Mascarenhas** (1997). Leaderless polypeptides efficiently extracted from whole cells by osmotic shock. *Journal of Bacteriology* **179**(17): 5333-5339.
- 131- **Hu, N. T., W. M. Leu, M. S. Lee, A. Chen, S. C. Chen, Y. L. Song and L. Y. Chen** (2002). XpsG, the major pseudopilin in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms pilus-like structure between cytoplasmic and outer membranes. *Biochem Journal* **365**: 205-211.
- 132- **Diao, H.-Y., X.-J. Liang, F.-L. Liang and R.-L. Liu** (2001). Study on secreted xanthan by the protoplast of *Xanthomonas campestris*. *Microbiology* **28**(5): 18-19.
- 133- **Pollock, T. J., W. A. van Workum, L. Thorne, M. J. Mikolajczak, M. Yamazaki, J. W. Kijne and R. W. Armentrout** (1998). Assignment of biochemical functions to glycosyl transferase genes which are essential for biosynthesis of exopolysaccharides in *Sphingomonas* strain S88 and *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* **180**(3): 586-93.
- 134- **Ferreiro, D. U.** (1997). Localización de la actividad glucosil 1-fosfato transferasa en el producto del gen *gumD* de *Xanthomonas campestris* involucrado en la síntesis de xantano. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires.
- 135- **Harding, N. E., J. M. Cleary, D. K. Cabanas, I. G. Rosen and K. S. Kang** (1987). Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *Journal of Bacteriology* **169**(6): 2854-61.
- 136- **Thorne, L., M. Mikolajczak, R. W. Armentrout and T. J. Pollock** (2000). Increasing the yield and viscosity of exopolysaccharides secreted by *Sphingomonas* by augmentation of chromosomal genes with multiple copies of cloned biosynthetic genes. *J Ind Microbiol Biotechnol* **25**(1): 49-57.
- 137- **Rodríguez, H. and L. Aguilar** (1997). Detection of *Xanthomonas campestris* mutants with increased xanthan production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **18**: 232-234.
- 138- **Casas, J. A., Santos VE, Garcia-Ochoa F** (2000). Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. *Enzyme and microbial technology* **26**: 282-291.
- 139- **Wolff, C., A. Silvery, Z. Priel and M. N. Layec-Raphalen** (1979). Influence of the association of macromolecules in dilute solutions on their reduced viscosity. *Polymer* **20**: 281-287.

- 140- **Gordon, J. A.** (1991). Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods in enzymology* **201**: 477-482.
- 141- **Urbatsch, I. L., B. Sankaran, J. Weber and A. E. Senior** (1995). P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site. *J Biol Chem* **270**(33): 19383-19390.
- 142- **Goodno, C. C.** (1982). Myosin active-site trapping with vanadate ion. *Methods in enzymology* **85**: 116-123.
- 143- **Simon, R., Priefer U. and Puhler A.** (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-791.
- 144- **Kidby, D., P. Sandford, A. Herman and M. Cadmus** (1977). Maintenance procedures for the curtailment of genetic instability: *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Applied and Environmental Microbiology* **33**(4): 840-5.
- 145- **Ditta, G., T. Schmidhauser, E. Yakobson, P. Lu, X. W. Liang, D. R. Finlay, D. Guiney and D. R. Helinski** (1985). Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* **13**(2): 149-53.
- 146- **Yanisch_Perron, C., J. Vieira and J. Messing** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**(1): 103-19.
- 147- **Schafer, A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach and A. Puhler** (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**(1): 69-73.
- 148- **Miller, J. H.** (1992). A short course in bacterial genetics : a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Plainview, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 149- **Sambrook, J. and D. W. Russell** (2001). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 150- **Gaboriaud, C., V. Bissery, T. Benchetrit and J. P. Mornon** (1987). Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *Febs Letters* **224**(1): 149-55.
- 151- **Pearson, W.** (1990). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol* **183**: 63-98.
- 152- **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- 153- **Kyte, J. and R. F. Doolittle** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**(1): 105-32.
- 154- **Eisenberg, D., E. Schwarz, M. Komaromy and R. Wall** (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol* **179**(1): 125-42.
- 155- **Simon, R.** (1984). High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-Mob transposon. *Molecular & General Genetics : Mgg* **196**(3): 413-20.
- 156- **Thorne, L., L. Tansey and T. J. Pollock** (1987). Clustering of mutations blocking synthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Bacteriology* **169**(8): 3593-600.

- 157- **Coligan, J. E.** (2001). Current protocols in protein science. Brooklyn, N.Y., Wiley.
- 158- **Lane, D. and E. Harlow** (1988). Antibodies : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- 159- **Harlow, E. and D. Lane** (1999). Using antibodies : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 160- **Aguilar, O. M., D. Kapp and A. Pühler** (1985). Characterization of *Rhizobium meliloti* fixation gene (*fixF*) located near the common nodulation region. *Journal of Bacteriology* **164**: 245-254.
- 161- **Derman, A. I. and J. Beckwith** (1995). Escherichia coli alkaline phosphatase localized to the cytoplasm slowly acquires enzymatic activity in cells whose growth has been suspended: a caution for gene fusion studies. *Journal of Bacteriology* **177**(13): 3764-70.
- 162- **Schägger, H. and G. von_Jagow** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**(2): 368-79.
- 163- **Hu, N. T., M. N. Hung, C. T. Liao and M. H. Lin** (1995). Subcellular location of XpsD, a protein required for extracellular protein secretion by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Microbiology (Reading, England)* **141**(6): 1395-406.
- 164- **Chamberlain, J. P.** (1979). Fluorographic detection of radioactivity in polyacrilamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate. *Analytical Biochemistry* **98**: 132-135.
- 165- **Fernandez, D., T. A. Dang, G. M. Spudich, X. R. Zhou, B. R. Berger and P. J. Christie** (1996). The *Agrobacterium tumefaciens* virB7 gene product, a proposed component of the T-complex transport apparatus, is a membrane-associated lipoprotein exposed at the periplasmic surface. *Journal of Bacteriology* **178**(11): 3156-67.
- 166- **Dianese, J. C. and N. W. Schaad** (1982). Isolation and characterization of inner and outer membranes of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Phytopathology* **72**: 1284-1289.
- 167- **Orndorff, P. E. and M. Dworkin** (1980). Separation and properties of the cytoplasmic and outer membranes of vegetative cells of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **141**(2): 914-27.
- 168- **Gerhardt, P.** (1994). Methods for general and molecular bacteriology. Washington, D.C., American Society for Microbiology.
- 169- **Markwell, M. A., S. M. Haas, L. L. Bieber and N. E. Tolbert** (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**(1): 206-10.
- 170- **Miller, G. L.** (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**(426-428).
- 171- **Lo, Y. M., S. T. Yang and D. B. Min** (1997). Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **47**: 689-694.
- 172- **Filisetti-Cozzi, T. M. and N. Carpita** (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical biochemistry* **197**: 157-162.
- 173- **Scott, J. E.** (1965). Fractionation by precipitation with quaternary amonium salts. Methods in Carbohydrate Chemistry. NY, Academic Press. **5**: 38-44.

- 174- **Tait, M., I. and I. W. Sutherland** (1990). Acid hydrolysis and high-performance liquid chromatography of xantan. *Carbohydr. Polym.* **13**: 133-148.
- 175- **Casas, J. A., V. E. Santos and F. García-Ochoa** (2000). Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. *Enzyme and Microbial Technology* **26**: 282-291.
- 176- **Zakin, J. L., R. Wu, H. Luh and K. G. Mayhan** (1976). Generalized correlations for molecular weight and concentration dependence of zero-shear viscosity of high polymer solutions. *Journal of Polymer Science* **14**: 299-308.
- 177- **Milas, M., M. Rinaudo and B. Tinland** (1985). The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. *Polymer Bulletin* **14**: 157-164.
- 178- **Kirby, A. R., A. P. Gunning and V. J. Morris** (1995). Imaging Xanthan gum by Atomic Force Microscopy. *Carbohydrate Research* **267**: 161-166.
- 179- **McIntire, T. M. and D. A. Brant** (1997). Imaging of individual biopolymers and supramolecular assemblies using noncontact atomic force microscopy. *Biopolymer* **42**: 133-146.
- 180- **Camesano, T. A. and K. J. Wilkinson** (2001). Single molecule study of xanthan conformation using atomic force microscopy. *Biomacromolecules* **2**: 1184-91

Índice de Figuras

Figura 1	Polisacáridos extracelulares bacterianos	1
Figura. 2	Modelo de las membranas interna y externa de <i>E. coli</i> K-12.	4
Figura. 3	Mapa genético de diferentes regiones involucradas en la biosíntesis de exopolisacáridos	6
Figura. 4	Representación de los tres sistemas de exportación de exopolisacáridos bacterianos	8
Figura. 5	Etapas involucradas en la síntesis de los lipopolisacáridos.	11
Figura. 6	Modelos de ensamblado de CPS en <i>E. coli</i> .	15
Figura. 7	Estructura química de la unidad repetitiva del xantano	17
Figura. 8	Estructura del xantano	18
Figura. 9	Imágenes de AFM del xantano	18
Figura. 10	Representación esquemática de las conformaciones el xantano	19
Figura. 11	Fuerzas que actúan sobre dos placas de líquido paralelas	19
Figura. 12	Genes involucrados en la biosíntesis del xantano	23
Figura. 13	Características de la proteína GumB.	27
Figura. 14	Análisis de la secuencia de GumB	27
Figura. 15	Detalle de la región <i>gum</i> secuenciada.	28
Figura. 16	Análisis de la secuencia de GumC	29
Figura. 17	Localización subcelular de GumB y GumC en <i>X. campestris</i> FC2	30
Figura. 18	Inhibición del procesamiento de GumB por globomicina	31
Figura. 19	Marcación <i>in vivo</i> de <i>X. campestris</i> con [9,10, ³ H]-ácido palmítico	32
Figura. 20	Extracción de proteínas unidas al sáculo de mureína.	33
Figura. 21	Topología de GumC en membranas de <i>X. campestris</i> 405phoA	35
Figura. 22	Localización de proteínas truncadas de GumC	36
Figura. 23	Ensayos de entrecruzamiento químico <i>in vivo</i> .	38
Figura. 24	Análisis cromatográfico de los oligómeros de alto peso molecular de GumB y GumC.	39
Figura. 25	Presencia de GumB y GumC en mutantes <i>gum</i> de <i>X. campestris</i>	40
Figura. 26	Localización subcelular de GumB en ausencia de otras proteínas Gum	41
Figura. 27	Expresión de GumB y GumC durante el crecimiento	42
Figura. 28	Caracterización de las mutantes Xc405AB y Xc405AC	43
Figura. 29	Caracterización de la cepa Xc401C.	45
Figura. 30	Interacción funcional entre las proteínas GumC y GumD	46
Figura. 31	Efecto de la amplificación génica en la producción de xantano	47
Figura. 32	Análisis de las moléculas de xantano por AFM	49
Figura.33	Distribución del largo de cadena de las moléculas de xantano	50
Figura. 34	Expresión de GumB y GumC plasmídicas en <i>X. campestris</i>	50
Figura. 35	Polimerización <i>in vitro</i> de xantano en presencia de vanadato	51

Índice de Tablas

Tabla 1	Usos comerciales e industriales de los biopolímeros.....	2
Tabla 2	Clases y subclases de transportadores del sistema TC	5
Tabla 3	Composición de los sistemas de exportación de polisacáridos bacterianos	9
Tabla 4	Clasificación de los polisacáridos capsulares de <i>E. coli</i>	14
Tabla 5	Relación entre las propiedades del xantano y su estructura	21
Tabla 6	Homología de GumB con proteínas de la familia OMA.....	26
Tabla 7	Homología de la GumC con proteínas de la familia MPA	30
Tabla 8	Análisis de la composición del xantano.....	49
Tabla 9	Tamaño de las moléculas de xantano.....	19
Tabla 10	Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	62
Tabla 11	Oligonucleótidos utilizados en esta tesis	62