

Tesis Doctoral

Análisis estructural y bioquímico de la proteína de membrana externa GumB de *Xanthomonas campestris*, y su participación en la síntesis del exopolisacárido xantano

Jacobs, Melisa

2014-02-26

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

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

Cita tipo APA:

Jacobs, Melisa. (2014-02-26). Análisis estructural y bioquímico de la proteína de membrana externa GumB de *Xanthomonas campestris*, y su participación en la síntesis del exopolisacárido xantano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Jacobs, Melisa. "Análisis estructural y bioquímico de la proteína de membrana externa GumB de *Xanthomonas campestris*, y su participación en la síntesis del exopolisacárido xantano". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-02-26.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**Análisis estructural y bioquímico de la proteína
de membrana externa GumB de *Xanthomonas
campestris*, y su participación en la síntesis del
exopolisacárido xantano**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Melisa Jacobs

Director de tesis: Dr. Luis Ielpi

Consejeros de estudios: Dr. Luis Ielpi y Dr. Julio Caramelo

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, 2014

Análisis estructural y bioquímico de la proteína de membrana externa GumB de *Xanthomonas campestris*, y su participación en la síntesis del exopolisacárido xantano

1. Resumen

Muchas bacterias producen polisacáridos extracelulares que pueden asociarse a la superficie celular o ser secretados al medio extracelular. Numerosos polisacáridos bacterianos se encuentran asociados al desarrollo de patogenicidad, convirtiéndose en un importante factor de virulencia. Por otro lado, existe un gran interés industrial sobre muchos polisacáridos bacterianos debido a sus amplias aplicaciones.

En general, se ha descrito en detalle los primeros pasos de la síntesis de polisacáridos, pero aún no se han esclarecido los mecanismos involucrados en la polimerización y transporte de los mismos hacia la superficie bacteriana o al medio extracelular. Se ha postulado que estos procesos serían llevados a cabo gracias a la formación de complejos proteicos que podrían atravesar la membrana plasmática, de forma similar a lo observado para los sistemas de secreción de proteínas.

En esta tesis se presenta el estudio estructural y bioquímico de la proteína de membrana externa GumB, la cual se encontraría asociada a la síntesis/secreción del polisacárido xantano en *Xanthomonas campestris*. Fue posible sobreexpresar y purificar cantidades suficientes para ensayos estructurales de esta proteína de membrana, al expresarla en el citoplasma. Se obtuvieron cristales de la proteína nativa y de su derivado de selenio-metionina, a partir de los cuales fue posible resolver la estructura a 2,54 Å. Se encontró que en el cristal GumB forma un tetrámero, esta característica también se ha observado en solución mediante ensayos de dispersión de luz estática y entrecruzamiento químico. Por otro lado, ensayos de dispersión de neutrones a bajos ángulos mostraron que la forma de GumB en solución es similar a la observada en el cristal. El tetrámero de GumB mostró una gran cavidad con cargas positivas que podrían estar involucradas en la interacción con el xantano, el cual posee cargas negativas debido a sus residuos de ácido glucurónico y grupos cetal-piruvato.

Asimismo, se presenta evidencia que sugiere la participación de GumB en un complejo proteico. Mediante ensayos de entrecruzamiento químico *in vivo* se observó que GumB forma complejos de alto peso molecular. Electroforesis azul nativa permitió identificar potenciales interacciones entre GumB y otras proteínas de *X. campestris*.

Palabras claves: *Xanthomonas campestris*, transporte, GumB, xantano, complejos de membrana.

Structural and biochemical analysis of the outer membrane protein GumB of *Xanthomonas campestris*, and its involvement in xanthan gum synthesis**2. Abstract**

Many bacteria produce extracellular polysaccharides, which can be associated with the cell surface or secreted to the extracellular medium. Several bacterial polysaccharides are associated with pathogenesis development, making them an important virulence factor. On the other hand, there is an important industrial interest in many bacterial polysaccharides because of their broad applications.

The steps involved in polysaccharide synthesis are well described, but less is known about polysaccharide transport to the extracellular medium. It is believed that secretion is achieved due to a protein transenvelope complex, similar to those observed for protein secretion systems.

In this thesis, the outer membrane protein GumB was studied structurally and biochemically. It has been previously shown that GumB is involved in the synthesis/secretion of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. Protein overexpression and purification, in quantities enough to set up structural assays, were achieved when this protein was expressed in the cytoplasm. Crystals of native protein and its selenium-methionine derivative were obtained, allowing the determination of GumB crystal structure to 2.54 Å. In the crystal, GumB is a tetramer, a feature also observed in solution by static light scattering and chemical crosslinking assays. Besides, small angle neutron scattering assays showed that GumB envelope in solution was similar to that observed in the crystal. GumB tetramer exhibited a cavity with positive charges that could be involved in the interaction with xanthan, which is a negatively charged polysaccharide due to its glucuronic acid residues and ketal-pyruvate groups.

In addition, evidence suggesting that GumB is part of a protein complex is presented. By *in vivo* chemical crosslinking, it was observed that GumB forms high molecular complexes. Blue native electrophoresis allowed the identification of potential interactions between GumB and other proteins from *X. campestris*.

Key words: *Xanthomonas campestris*, transport, GumB, xanthan, membrane complexes

Agradecimientos

A mi director de tesis, Luis Ielpi, por abrirme las puertas de su laboratorio y otorgarme la posibilidad de trabajar en libertad.

A todos los que forman parte del Instituto Leloir, por hacer que el trabajo sea más sencillo.

A otros laboratorios del Instituto, en especial, 204, 209 y 304, por su buena predisposición para prestar equipos y reactivos, y por su ayuda.

A la infinidad de blogs de gente que no conozco pero que hicieron posible la realización de esta tesis, gracias por explicar como instalar, hacer funcionar y demás, los distintos programas de Linux que utilicé!

Sole, gracias por hacer que los días de purificación sean más amenos, por toda tu ayuda y obviamente por todos los almuerzos compartidos!

Patri, gracias por tu ayuda, tus consejos y tu tiempo.

A todos mis compañeros del 207, por ser grandes compañeros y personas. Sil e Isa, no sé como agradecerles toda la ayuda que me brindaron, estuvieron en todo momento para darme una mano, aún cuando se encontraban físicamente lejos. Sil, Isa, Carmen, Maru, Nico, Mati, por los buenos momentos que pasamos en el lab, los almuerzos, los mates, gracias por ser tan divertidos, generando el ambiente de trabajo ideal. Estela, gracias por todo el apoyo que me brindaste durante este difícil último año.

Al grupete 207 y allegados (Sil, Pablo, Isa, Jorge, Maru, Fede, Carmen, Hernán, Nico, Javi), lo más importante que rescato de la tesis es el haberlos conocidos. Por lo bien que lo pasamos cada vez que nos juntamos!!

Adri e Ivi, gracias por su hermosa amistad y por preocuparse por el avance de mi tesis.

Amor, gracias por estar siempre y ser tan buen compañero! Gracias por escuchar mis problemas con los experimentos y por proponer soluciones que además resultaron efectivas! Muchas muchas gracias por el aguante que me tuviste este último año!

Gracias a todos!

Índice

1. Resumen	1
2. Abstract.....	2
Agradecimientos	3
3. Abreviaturas.....	7
4. Introducción	9
4.1. Relevancia de los polisacáridos	9
4.1.1. Importancia de los polisacáridos en la patogenicidad	9
4.1.2. Importancia de los polisacáridos en la industria	9
4.2. Modelos de síntesis y secreción de EPS.....	10
4.2.1. Wza: ejemplo de OPX de la vía Wzy-dependiente	14
4.2.2. KpsD: ejemplo de OPX de la vía de transportadores ABC- dependiente	17
4.2.3. AlgK: ejemplo de síntesis sintasa-dependiente	17
4.3. Síntesis del exopolisacárido xantano	18
4.3.1. GumB.....	19
5. Objetivos.....	22
5.1. Objetivos generales	22
5.2. Objetivos específicos.....	22
6. Materiales y métodos.....	23
6.1. Materiales y procedimientos generales	23
6.2. Cepas y plásmidos	23
6.3. Medios y condiciones de cultivo	24
6.4. SDS-PAGE e inmunodetección	25
6.5. Obtención de suero inmune contra GumB	25
6.6. Construcción de plásmidos.....	26
6.7. Mutagénesis sitio dirigida	27
6.8. Introducción de material genético en <i>E. coli</i> y <i>X. campestris</i>	28

6.9. Fraccionamiento celular y detección de las proteínas	28
6.10. Sobreexpresión y purificación de proteínas.....	29
6.10.1. Expresión y purificación de His-GumB	29
6.10.2. Expresión y purificación del derivado de selenio-metionina de His-GumB.....	29
6.10.3. Expresión y purificación de GumB-acilada	30
6.11. Cristalografía de rayos X	30
6.11.1. Cristalogénesis	30
6.11.2. <i>Soaking</i> con metales pesados	31
6.11.3. <i>Soaking</i> con KI y CsCl	31
6.11.4. Resolución de la estructura cristalográfica de His-GumB.....	32
6.11.4.1. Obtención de datos de difracción	32
6.11.4.2. Análisis de la estructura cristalográfica.....	32
6.12. Entrecruzamiento químico <i>in vitro</i>	33
6.13. Entrecruzamiento químico <i>in vivo</i>	33
6.14. Dispersión de luz estática acoplada a columna de exclusión molecular (SEC-SLS)	33
6.15. Dispersión de neutrones a bajos ángulos (SANS)	34
6.16. Dicroísmo circular (CD)	34
6.17. Proteólisis limitada.....	35
6.18. Proteólisis de células de XcFC2	35
6.19. Electroforesis azul nativa	35
6.20. Espectrometría de masa.....	36
6.21. Cuantificación de la producción de xantano	36
7. Resultados.....	37
7.1. Clonado y expresión de GumB-acilada y His-GumB	37
7.2. His-GumB	39
7.2.1. Purificación de His-GumB.....	39
7.2.2. Cristalogénesis de His-GumB.....	40

7.2.3. Estructura cristalográfica de His-GumB.....	41
7.2.4. Estado oligomérico de His-GumB	47
7.2.5. GumB podría interaccionar con el xantano.....	50
7.2.5.1. Dicroísmo circular de His-GumB.....	52
7.2.5.2. Proteólisis limitada de His-GumB	53
7.2.5.3. Importancia de los residuos básicos de GumB para su funcionalidad.....	55
7.3. GumB-acilada	58
7.3.1. Purificación de GumB-acilada.....	58
7.4. GumB no se encontraría expuesta en la superficie celular	61
7.5. GumB forma un complejo macromolecular	61
8. Discusión	65
9. Referencias.....	71

3. Abreviaturas

Å	Angstrom
Abs ₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
<i>Buffer</i>	Solución tampón
CD	Dicroísmo circular
CI	Cuerpos de inclusión
CPS	Polisacárido capsular
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
Da	Dalton
DDM	n-dodecil-β-D-maltósido
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
DSP	Ditiobis(succinimidil propionato)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EPS	Exopolisacárido
FPLC	<i>(Fast protein liquid chromatography)</i> , Cromatografía líquida rápida de proteínas
GT	Glicosiltransferasa
IMAC	<i>(Immobilized metal affinity chromatography)</i> , Cromatografía de afinidad por cationes divalentes
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
IR	Índice de refracción
LD	Luz dispersada
LPS	Lipopolisacárido
ME	Membrana externa
MI	Membrana interna
MPD	2-Metil-2,4-pentanediol

MT	Membrana total
N-terminal	Extremo amino terminal
OPX	(<i>Outer membrane polysaccharide export</i>), Proteínas de membrana externa de transporte de polisacáridos
PAGE	(<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>), Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCP	(<i>Polysaccharide copolymerases</i>), Copolimerasas de polisacáridos
PCR	(<i>Polymerase chain reaction</i>), Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PES	(<i>Polysaccharide export sequence</i>), Secuencia de exportación de polisacáridos
PMSF	(Phenylmethylsulfonyl fluoride), Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSI	Peptidasa señal I
PSII	Peptidasa señal II
QS	(<i>Quorum sensing</i>), Detección de quórum
RMSD	(<i>Root-Mean-Square Deviation</i>), Raíz cuadrada de la desviación cuadrática media
SAD	(<i>Single-wavelength Anomalous Dispersion</i>), Dispersión anómala a una única longitud de onda
SANS	(<i>Small-angle neutron scattering</i>), Dispersión de neutrones a bajos ángulos
SDS	(<i>Sodium dodecyl sulphate</i>), Dodecil sulfato de sodio
SLBB	(<i>Soluble ligand-binding β-grasp</i>), Dominio β -grasp de unión a ligandos solubles
SLS	(<i>Static light scattering</i>), Dispersión de luz estática
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TRP	(<i>Tetrapetide repeat</i>), Repetición de 34 aminoácidos

4. Introducción

4.1. Relevancia de los polisacáridos

El objetivo de esta tesis es profundizar en el conocimiento del transporte de macromoléculas a través de la pared bacteriana, en especial del exopolisacárido (EPS) xantano, producido por la bacteria fitopatógena gram-negativa *Xanthomonas campestris*. Numerosos microorganismos sintetizan EPS extracelulares que pueden asociarse a la superficie celular o ser liberados al medio extracelular. Los EPS pueden estar relacionados con la virulencia, con la interacción huésped-hospedador o funcionar como mecanismo de protección contra la disecación o ataques por bacteriófagos y protozoos [1-2]. Por otro lado, muchos EPS bacterianos son actualmente productos biotecnológicos ampliamente aceptados y utilizados en la industria [3-4].

4.1.1. Importancia de los polisacáridos en la patogenicidad

El rol de los EPS producidos por bacterias fitopatógenas no se ha dilucidado completamente pero se cree que están involucrados en la evasión o retraso de la activación de la defensa de la planta, o bien que actúan como señales de comunicación entre patógeno y planta. La virulencia está basada en parte por la habilidad de la bacteria para prevenir su reconocimiento por receptores de la planta. Se ha sugerido que los EPS bacterianos incrementarían la capacidad del patógeno de colonizar el tejido del huésped. Asimismo, los EPS podrían contribuir al mantenimiento de un ambiente hidratado para el crecimiento bacteriano debido a su habilidad de absorber humedad del ambiente y proteger a las bacterias de moléculas citotóxicas producidas por plantas infectadas [5-6].

En el caso del xantano, algunos autores sugieren que no sería esencial para la patogenicidad y que sólo contribuiría a la virulencia y supervivencia epífita de la bacteria. En tanto otros autores reportaron que la producción de xantano sería necesaria para la patogenicidad, ya que mutantes que no producen xantano no logran desarrollar la enfermedad [7-9].

4.1.2. Importancia de los polisacáridos en la industria

El interés industrial en los EPS bacterianos se debe a que éstos poseen propiedades únicas que no se encuentran en otros polisacáridos tradicionales como los de plantas y algas. Algunos EPS bacterianos, como el alginato, se han aplicado en los campos de la medicina y la biotecnología. El alginato se ha utilizado para la microencapsulación

de drogas pudiendo ser usado como un vector para el transporte de las mismas. Además, a la versión sulfatada del alginato se le han atribuido distintas funciones terapéuticas: anti-coagulante, anti-trombótico, anti-arterosclerótico, anti-metastásico y anti-inflamatorio [10].

Por su parte, el xantano posee amplias aplicaciones en la industria siendo utilizado en distintas áreas como la alimenticia, farmacéutica, cosmética, petroquímica y agrícola, entre otras. Debido a sus propiedades reológicas superiores es utilizado como agente de control reológico en sistemas acuosos y como estabilizante en emulsiones y suspensiones [11].

4.2. Modelos de síntesis y secreción de EPS

En bacterias gram-negativas, la síntesis de macromoléculas asociadas a la superficie celular o secretadas al medio extracelular representa un gran desafío ya que dichas macromoléculas deben atravesar las membranas interna y externa, y el espacio periplásmico sin comprometer la integridad de esta barrera física. En especial, la síntesis de polisacáridos representa un desafío adicional debido a que son polímeros hidrofílicos de alto peso molecular. La síntesis de polisacáridos ha sido ampliamente estudiada y existe evidencia de cómo es llevada a cabo, pero poco se conoce sobre el mecanismo por el cual las cadenas del polímero logran atravesar la pared celular. En el caso de los sistemas de transporte de proteínas, los distintos mecanismos de secreción varían en complejidad, pero en todos los casos el transporte es concebido debido a la formación de complejos multiproteicos que permiten la formación de un canal que atraviesa ambas membranas [12]. Se ha postulado que la secreción de polisacáridos es mediada por la formación de complejos macromoleculares similares a los observados en el transporte de proteínas [13].

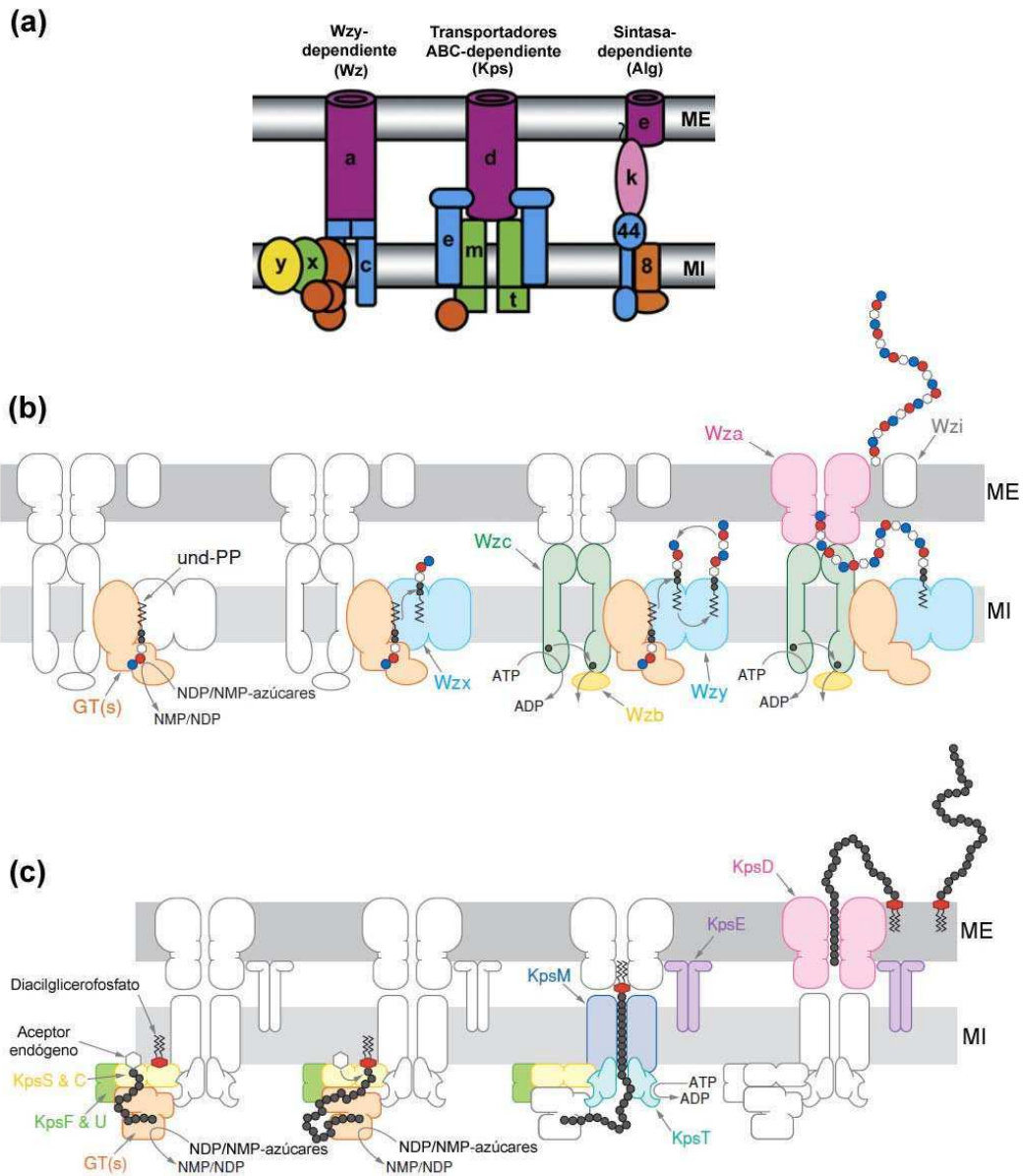


Figura 4.1. Vías de síntesis de polisacáridos (a) Representación de los complejos proteicos necesarios para la síntesis y secreción de los CPS tipos I/IV (Wzy-dependiente) y II/III (transportadores ABC-dependiente) de *E. coli* y el EPS alginato producido por *P. aeruginosa* (sintasa-dependiente), modificado de Keiski y col. [14]. Las glicosiltransferasas se muestran en naranja y la polimerasa Wzy en amarillo. Las proteínas necesarias para el transporte a través de la membrana interna (MI) y externa (ME) en verde y violeta, respectivamente, mientras que las proteínas que funcionan como puente entre MI y ME se muestran en azul. (b) y (c) Detalle de las vías Wzy- y transportadores ABC-dependientes, respectivamente, tomado de Whitfield [15]. GT: glicosiltransferasa, und-PP: undecaprenol difosfato, Wzx: flipasa, Wzc: PCP, Wzb: fosfatasa, Wzy: polimerasa, Wza: OPX, Wzi: involucrada en la asociación del CPS tipo I a la superficie celular, KpsT/KpsM: transportador ABC, KpsE: PCP, KpsD: OPX.

A pesar de la diversidad de polisacáridos existentes sólo se han descrito tres vías de síntesis y secreción en bacterias gram-negativas: Wzy-, transportadores ABC- o sintasa- dependiente (Figura 4.1a) [14, 16-17]. En la Figura 4.1b se muestra el esquema de síntesis del polisacárido capsular (CPS) tipo I de *Escherichia coli*, ejemplo de síntesis mediado por la vía Wzy-dependiente. Esta vía consiste en la formación de unidades repetitivas sobre un lípido pirofosfato (und-PP) gracias a la acción secuencial de glicosiltransferasas (GTs) en la cara citoplasmática de la membrana interna. Posteriormente, las unidades repetitivas son traslocadas mediante una flipasa (Wzx) al periplasma, lugar en el cual se produce la polimerización por la polimerasa Wzy. Para el ensamblado de las unidades repetitivas y la secreción a través de la membrana externa son necesarias proteínas pertenecientes a las familias de copolimerasas de polisacáridos (PCP, *polysaccharide copolymerases*; Wzc) y proteínas de membrana externa de transporte de polisacáridos (OPX, *outer membrane polysaccharide export*, Wza).

La síntesis de CPS tipo II de *E. coli* es un ejemplo de síntesis dependiente de transportadores ABC (Figura 4.1c). En este caso, el polímero es sintetizado en su totalidad por GTs sobre un aceptor endógeno aún no identificado. El polímero luego es unido a diacilglicerofosfato y es transportado a través de la membrana interna vía transportadores ABC (KpsM y KpsT). Para llevar a cabo el transporte son necesarias las proteínas KpsS, C, F y U, aunque todavía no se conoce de qué manera se encuentran involucradas. Para la secreción a través de la membrana externa también son necesarias una PCP (KpsE) y una OPX (KpsD).

La vía sintasa-dependiente no involucra proteínas PCP ni OPX, se cree que una única proteína actúa como polimerasa y transportador a través de la membrana interna. El alginato producido por *Pseudomonas aeruginosa* es sintetizado por esta vía, para el cual se ha descrito que son necesarios los motivos TRP (de sus sigla en inglés *tetratricopeptide repeat*), para poder transportar el polímero a través de la membrana [14]. Los motivos TRP son repeticiones de una secuencia degenerada de 34 aminoácidos involucrados en interacciones proteína-proteína que permitirían la formación de un complejo transmembrana [18].

El transporte de los CPS y de la mayoría de los EPS en bacterias gram-negativas requiere de la presencia de las proteínas auxiliares de membrana PCP y OPX, anteriormente denominadas MPA y OMA, respectivamente [19].

Las PCP se identificaron inicialmente en la síntesis de lipopolisacáridos (LPS), donde se observó que se encuentran involucradas en la determinación del largo de cadena

[20]. Las PCP presentan una topología característica, con un gran dominio periplásmico que contiene regiones *coiled-coil*, flanqueado por dos segmentos transmembrana. Además, se ha visto que las proteínas PCP poseen un dominio rico en prolina y glicina que se solapa con el segundo segmento transmembrana y que algunas presentan un dominio citoplasmático adicional con actividad tirosina quinasa [15].

La familia de las OPX comprende proteínas de membrana externa involucradas en el transporte de CPS y EPS. La única similitud de secuencia encontrada entre las OPX es el motivo PES (*polysaccharide export sequence*, Pfam 02563). Este motivo ha sido identificado por homología de secuencia pero no hay información en cuanto a su significancia funcional. Cuthbertson y colaboradores [16] realizaron un análisis filogenético haciendo uso de la conservación de los motivos PES, a partir del cual propusieron que las OPX se pueden clasificar en 6 grupos (Tabla 4.1). En cada caso, los grupos son homogéneos en cuanto a la vía de síntesis a la cual pertenecen (Wzy- o transportadores ABC-dependientes). Sin embargo, se observa variabilidad en cuanto al tamaño y al péptido señal que poseen tanto entre OPX de distintos grupos como entre integrantes del mismo grupo. Las OPX que poseen el sitio de corte para la peptidasa señal II (PSII), serían lipoproteínas en su forma madura. En la Figura 4.2 se muestra la estructura secundaria de Wza determinada experimentalmente mediante cristalografía de rayos X, en la misma se indican los dominios identificados (D1-D4) y el motivo PES. El alineamiento de esta estructura secundaria con las predicciones de estructura secundaria de OPX de distintos grupos muestra que los dominios D1 y D2 definidos para Wza se encuentran conservados entre las distintas OPX. Por otro lado, algunas OPX contienen un motivo extra denominado DUF1017, sin embargo la funcionalidad de este dominio todavía no se ha dilucidado y además se encuentra presente en otras proteínas que no pertenecen a la familia de las OPX.

A continuación se detalla el conocimiento actual en cuanto a las proteínas OPX más estudiadas, Wza y KpsD, involucradas en la síntesis de CPS, y de la proteína AlgK necesaria para la síntesis de alginato.

Tabla 4.1. Clasificación de proteínas OPX

Grupo	ABC o Wzy-dependiente	Secuencia señal*	Tamaño (residuos)	Ejemplos
A	Wzy	PSII	261 a 449	WzaK30, GfcC (<i>E. coli</i>)
B	ABC	PSII	355 a 403	CtrA (<i>Neisseria meningitidis</i>), VexA (<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi), BexD (<i>Haemophilus influenza</i>)
C	Wzy	PSI/PSII	185 a 300	GumB (<i>X. campestris</i>), PsiD (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
D	Wzy	PSI/PSII	163 a 459	AceH (<i>Gluconacetobacter xylinus</i>)
E	Wzy	PSI	576 a 1048	OtnA (<i>Vibrio cholera</i>)
F	ABC	PSI	546 a 606	KpsD (<i>E. coli</i>)

* La secuencia señal posee sitio de corte para peptidasa señal I (PSI) o peptidasa señal II (PSII).

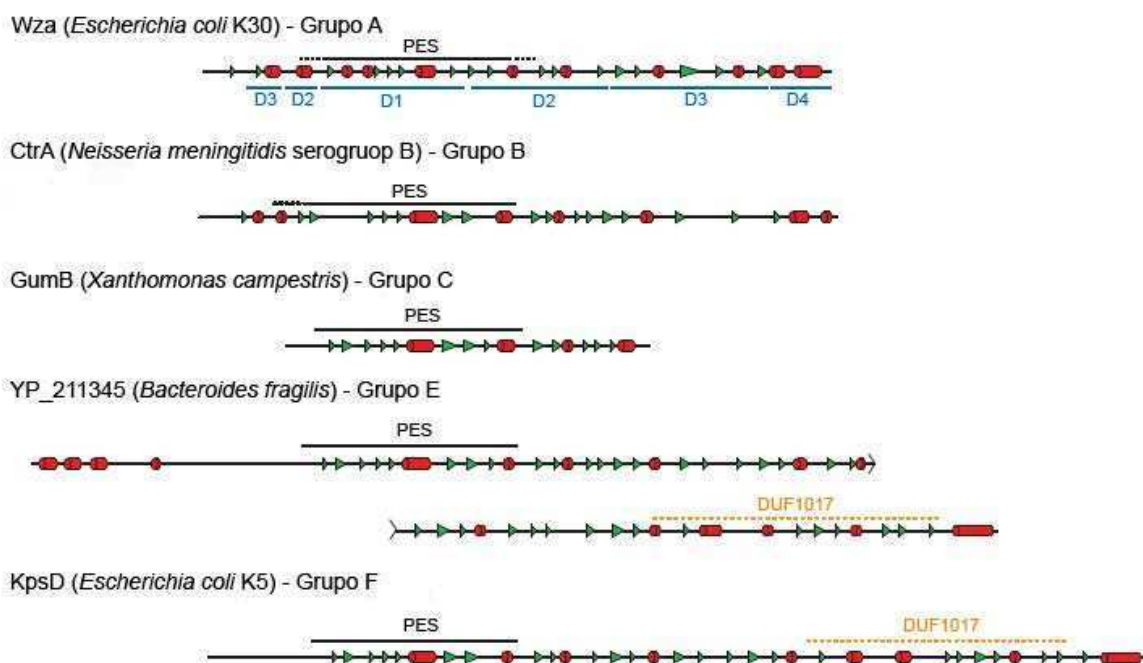


Figura 4.2. Alineamiento de estructura secundaria de proteínas OPX. Estructura secundaria experimental de Wza y predicciones de estructura secundaria de OPX pertenecientes a distintos grupos, en triángulos verdes se indican las hebras β y en cilindros rojos las hélices α . En cada caso, se señala el motivo PES característico de todas las OPX. D1-D4 son los dominios identificados en la estructura cristalográfica de Wza. Algunas OPX poseen el motivo DUF1017 que se indica en naranja. Tomado de Cuthbertson y col. [16].

4.2.1. Wza: ejemplo de OPX de la vía Wzy-dependiente

En *E. coli* la expresión de Wza es esencial para la producción de CPS tipo I [21]. La cepa de *E. coli* mutante en *wza* es incapaz de sintetizar CPS a pesar de que la síntesis de la unidad repetitiva no se ve afectada [22]. Wza es una lipoproteína de membrana

externa que forma multímeros resistentes a la presencia del detergente SDS [22]. Mediante microscopía electrónica de oligómeros de Wza reconstituidos en bicapas lipídicas se observaron estructuras en forma de anillo con un hueco central, sugiriendo la formación de un canal [23]. Imágenes similares de microscopía electrónica se han observado para las secretinas tipo II y III de los sistemas de secreción de proteínas [24-25]. La estructura cristalográfica de Wza es coincidente con lo visto mediante microscopía electrónica [26-27]. Wza es un octámero en forma de barril formado por el apilamiento de cuatro anillos (R1 a R4). Cada monómero presenta cuatro dominios (D1 a D4). Los dominios D1 y D2 contienen al motivo PES. Por otra parte, los dominios D2 y D3 poseen un plegamiento similar lo que sugiere una duplicación génica. El dominio D4 de Wza fue el primer dominio con segmento transmembrana de membrana externa en forma de hélice α en ser descrito. El oligómero de Wza se encuentra anclado a la membrana externa por los dominios transmembrana D4 y los extremos N-terminal acilados que se insertan en la cara interna de la membrana externa. Mediante la técnica de *immunogold*, se observó que Wza se encuentra expuesta en la superficie celular de *E. coli* [22, 26]. Por otro lado, se observó que la lipidación del extremo N-terminal es crítica para el transporte del polímero [23]. Wza posee una gran cavidad interna polar ($15\ 000\ \text{\AA}^3$) que se encuentra cerrada al periplasma y abierta al espacio exterior. Dong y colaboradores [26] propusieron que este canal se encuentra lleno de agua facilitando la formación de puentes de hidrógeno entre los aminoácidos polares y los grupos hidroxilo del polímero (Figura 4.3a).

Mediante las técnicas de entrecruzamiento químico *in vivo* y microscopía electrónica se observó que Wza interactúa con la proteína Wzc, PCP esencial para el transporte y el ensamblado de CPS tipo I [21, 23, 28-29]. El complejo observado mediante microscopía electrónica posee una longitud de $170\ \text{\AA}$ en su eje perpendicular al plano de la membrana, lo cual es consistente con la formación de un andamiaje que atraviese la pared celular (Figura 4.3b). Otro indicio que favorece la hipótesis de la formación de un complejo es que mutantes en *wza* y *wzc* poseen un fenotipo acapsular, sin acumulación de polisacárido en el periplasma, aunque se observa síntesis de unidades repetitivas [21-22, 29]. La ausencia de estas proteínas podría provocar que se pierdan interacciones proteína-proteína importantes para el sistema de biosíntesis de polisacárido. Se ha identificado una mutación en Wza que desacopla la polimerización del transporte, en la cual el péptido señal reconocido por PSII ha sido reemplazado por el péptido señal de OmpF que es del tipo PSI. De esta manera, la proteína posee péptido señal para localización en la membrana pero no posee sitio de lipidación. Se observó que esta variante de Wza se localiza en membrana externa y

forma oligómeros pero no es capaz de transportar el polímero y el mismo se acumula en el periplasma [23].

La determinación de la estructura cristalográfica de Wza permitió el desarrollo de drogas que impiden la secreción del CPS. De esta manera, la bacteria queda desprotegida y el sistema inmune humano puede reconocer y matar a la bacteria. La droga con más eficacia obtenida bloquea el barril en forma de hélice α que Wza forma en la membrana externa, un sitio que es accesible directamente desde el medio extracelular [30].

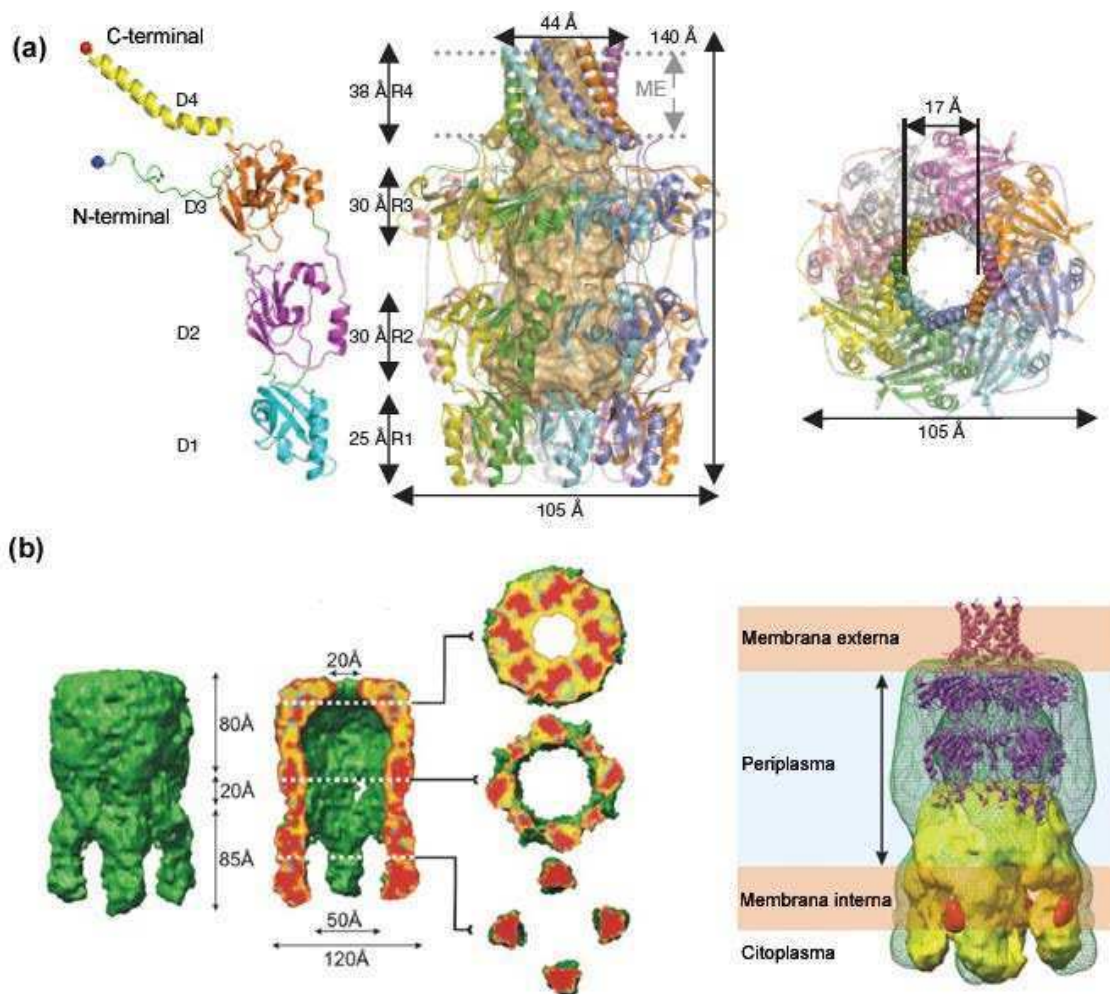


Figura 4.3. Estructura de Wza y en complejo con Wzc. (a) Detalle de la estructura cristalográfica de Wza, tomado de Dong y col. [26]. El monómero de Wza consiste de 4 dominios (D1-D4), que en el octámero contribuyen a la formación de 4 anillos (R1-R4). El octámero de Wza posee una gran cavidad central. En la derecha del panel se observa hacia dentro de esta cavidad central desde el exterior celular. **(b)** Reconstitución tridimensional a partir de microscopía electrónica del complejo Wza-Wzc, tomado de Collins y col. [28]. En la derecha del panel se observa la propuesta organización del complejo en la membrana. La estructura del complejo se muestra en verde, dentro de la cual se observa la estructura cristalográfica de Wza (violeta) y la estructura de microscopía electrónica de Wzc (amarillo).

4.2.2. KpsD: ejemplo de OPX de la vía de transportadores ABC-dependiente

Se ha postulado que el CPS tipo II es sintetizado por un complejo multiproteico unido en la cara citoplasmática de la membrana interna por la acción secuencial de glicosiltransferasas que extienden el polisacárido por su extremo no reductor [31-32]. En el caso de la síntesis del polisacárido K5 son necesarias 4 proteínas, KfiA-D, para la generación del polímero [33]. El transporte a través de la membrana interna es mediado por las proteínas KpsC, M, S, T, mientras que el transporte a través de la membrana externa es llevado a cabo por KpsD y E [32, 34-35]. KpsM y T constituyen un transportador ABC, siendo KpsM el dominio transmembrana y KpsT el dominio ATPasa. KpsD ha sido clasificada como una OPX por la presencia del motivo PES y KpsE como una PCP, ambas son necesarias para la secreción del polímero a través de la membrana externa ya que mutantes en estas proteínas acumulan el polímero en el periplasma [34, 36-39]. KpsE se localiza mayormente en el periplasma y se encuentra anclada a la membrana interna por sus extremos [34]. McNulty y colaboradores [37] propusieron que KpsD se ancla a la membrana externa mediante su extremo N-terminal y que su extremo C-terminal se localiza en el periplasma. KpsD se encuentra expuesta en la superficie celular y su localización en la membrana externa depende de su coexpresión junto a KpsE [34, 37]. Mediante entrecruzamiento químico *in vivo* se encontró la formación de un complejo entre las proteínas KpsD, E, M, T y S [37].

4.2.3. AlgK: ejemplo de síntesis sintasa-dependiente

La vía sintasa dependiente no involucra proteínas PCP ni OPX. El alginato producido por *P. aeruginosa* es sintetizado por esta vía. La polimerización del alginato y su transporte a través de la membrana interna sería llevado a cabo por las proteínas de membrana interna Alg8 y Alg44 [40-41]. AlgK es una lipoproteína de membrana externa esencial para la producción de alginato y contribuye a la correcta localización en la membrana externa de la porina AlgE, la cual transporta el polisacárido al exterior celular [42]. Mediante la resolución de la estructura cristalográfica de AlgK se observó que posee 9,5 repeticiones de motivos TRP, involucrados en interacciones proteína-proteína [14]. Keiski y colaboradores [14] proponen que estos motivos TRP permiten la formación de un complejo transmembrana para la secreción del polímero. Mediante análisis bioinformático se predijo que otros polisacáridos, como poli-N-acetilglucosamina y celulosa, también serían sintetizados por esta vía.

4.3. Síntesis del exopolisacárido xantano

El xantano es un polisacárido ácido con peso molecular promedio de 2×10^6 Da. El mismo consiste en un esqueleto de celulosa con cadenas laterales trisacarídicas, alternadas glucosa de por medio, de manosa-ácido glucurónico-manosa [43] (Figura 4.4a). Los residuos terminales de manosa pueden encontrarse modificados con grupos piruvato, mientras que grupos acetilos se encuentran como sustituyentes tanto en las manosas internas como en las externas. Los niveles de sustituciones con piruvato y acetilo varían según las condiciones de crecimiento.

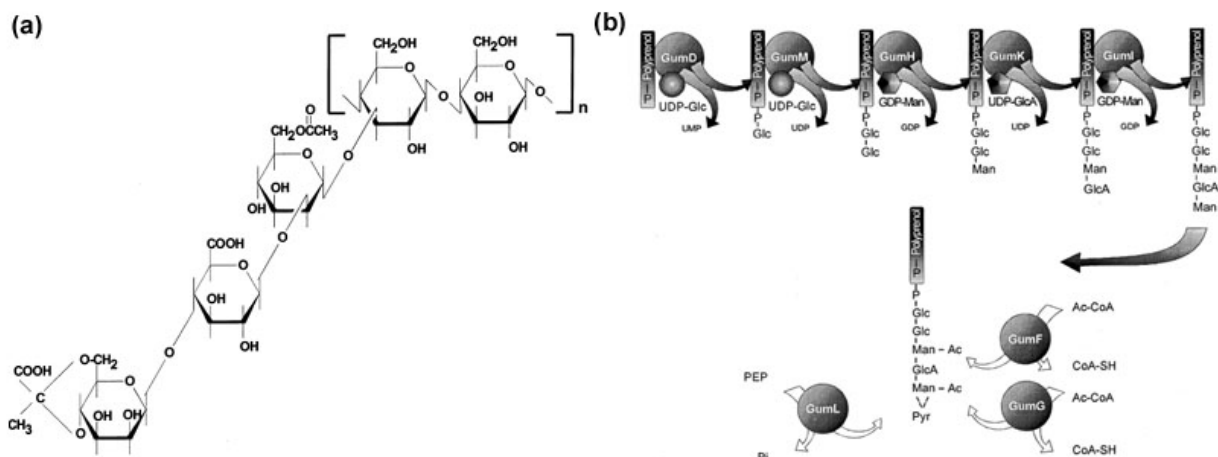


Figura 4.4. Estructura del xantano. El xantano está formado por la polimerización de unidades pentasacarídicas compuestas por dos moléculas de glucosa, dos de manosa y una de glucurónico. **(b) Síntesis de la unidad repetitiva.** La figura muestra la adición secuencial de azúcares mediada por glicosiltransferasas específicas. Glc: glucosa, Man: manosa, GlcA, ácido glucurónico, Ac: acetilo, Pyr: piruvato. Tomado de Becker y col. [44].

El operón *gum* codifica proteínas necesarias para la síntesis del polisacárido. La función bioquímica de los distintos productos de los genes *gum* se ha establecido mediante el análisis de la formación *in vitro* de intermediarios biosintéticos y/o de polímero en células permeabilizadas de cepas mutantes en esos genes. Las proteínas GumD, M, H, K e I son las glicosiltransferasas que sintetizan las unidades pentasacarídicas, mientras que GumL, F y G son las encargadas de adicionar los sustituyentes de piruvato y acetilo (Figura 4.4b) [8, 45-47]. Mutantes en *gumB*, *gumC* y *gumE* producen unidades repetitivas *in vitro* pero son incapaces de sintetizar polímero, atribuyéndoles a las proteínas codificadas por estos genes la función de polimerización y/o transporte [8, 48]. En base a homología de secuencia se ha propuesto un mecanismo de síntesis Wzy-dependiente, siendo GumE la polimerasa del sistema, mientras que las proteínas GumC y GumB se agrupan dentro de las familias PCP y OPX, respectivamente [16, 49]. Galván y colaboradores [48] mostraron que la

sobreexpresión de GumB junto a GumC sobre un fenotipo salvaje aumenta la viscosidad del xantano producido. Este aumento en viscosidad es atribuido a la formación de cadenas más largas. En la Figura 4.5 se muestra el modelo de síntesis y secreción del polisacárido xantano.

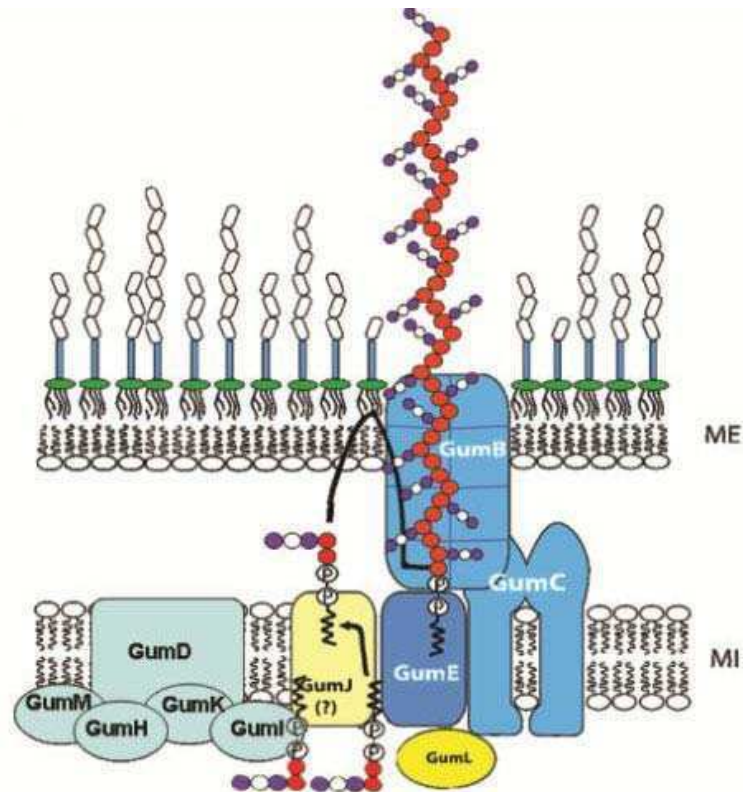


Figura 4.5. Modelo de síntesis y secreción del exopolisacárido xantano. Se ha demostrado que GumD, GumM, GumH, GumK y GumI son las glicosiltransferasas del sistema. Se cree que GumJ es la flipasa y que GumE es la polimerasa. GumC y GumB pertenecen a las familias PCP y OPX, respectivamente. ME y MI denotan para la membrana externa e interna, respectivamente. Tomado de Ielmini 2007 [50].

4.3.1. GumB:

GumB es una proteína de membrana externa esencial para la síntesis de xantano. Una cepa mutante en *gumB* no produce polímero *in vitro* pero acumula unidades pentasacáridicas (Figura 4.6) [8, 48, 50]. La mutante en *gumB* se obtuvo sobre una cepa deficiente en la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa (*Xc405A*, *ugp*⁻), enzima que cataliza la síntesis del nucleótido azúcar UDP-glucosa. La mutación de *gumB* sobre un fenotipo salvaje resultó letal para la célula, probablemente por la acumulación de intermediarios lipídicos tóxicos [8].

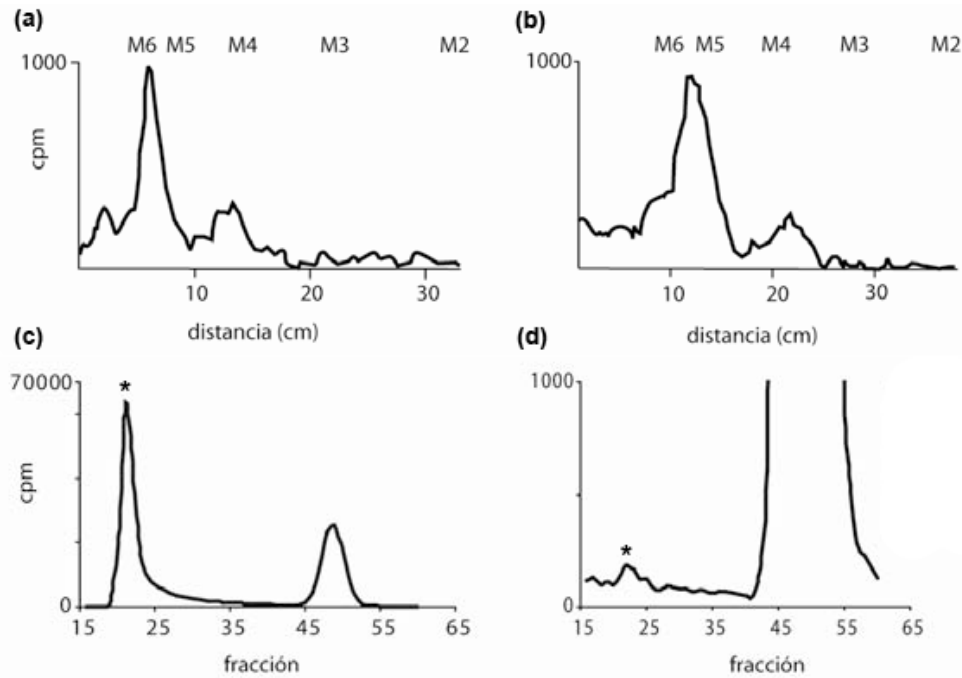


Figura 4.6. Caracterización de cepa mutante en *gumB*. Determinación de formación de unidades repetitivas por las cepas (a) Xc405A (*ugp*⁻) y (b) Xc405AB (*ugp*⁻, *gumB*), mediante cromatografía en papel descendente. Unidades pentasacáridicas migran entre maltohexosas (M6) y maltopentosas (M5). Análisis de la formación de polímero por las cepas (c) Xc405A (*ugp*⁻) y (d) Xc405AB (*ugp*⁻, *gumB*), mediante filtración en gel. Con asterisco se señala el pico de elusión del polímero. Tomado de Ielmini 2007 [50].

La localización predominante en membrana externa de GumB se demostró mediante ensayos de sedimentación en gradiente de sacarosa (Figura 4.7a) [48]. GumB ha sido clasificada dentro de la familia de las OPX debido a que posee el motivo PES [16, 19], encontrándose dentro del grupo C, cuya vía de síntesis es Wzy-dependiente. Este grupo contiene a las OPX de menor tamaño y se predice que algunas de ellas son lipoproteínas. Las lipoproteínas son sintetizadas como precursores en el citoplasma y traslocadas a través de la membrana interna por el sistema Sec. Estos precursores son secuencialmente procesados por tres enzimas, la fosfatidilglicerol:prolipoprotein diacilgliceril transferasa (Lgt), la prolipoprotein peptidasa señal (Lsp, también denominada PSII) y la fosfolípido:apolipoprotein transacilasa (Lnt). Lgt le adiciona un grupo diacilglicerol al sulfhidrilo de la cisteína que se encuentra dentro de la secuencia señal reconocida por PSII. El péptido señal luego es clivado por PSII dejando como aminoácido aminoterminal a la cisteína y finalmente Lnt transfiere un grupo acilo al nuevo extremo amino generado (Figura 4.7b). GumB posee la secuencia señal para reconocimiento por PSII en su extremo N-terminal. El carácter de lipoproteína ha sido demostrado mediante ensayo de inhibición con globomicina, antibiótico que inhibe a

PSII, generando la acumulación de proteína unida a diacilglicerol de mayor tamaño que la proteína completamente procesada [51]. En la Figura 4.7c se observa cómo la presencia de globomicina genera la acumulación de precursores de GumB [48].

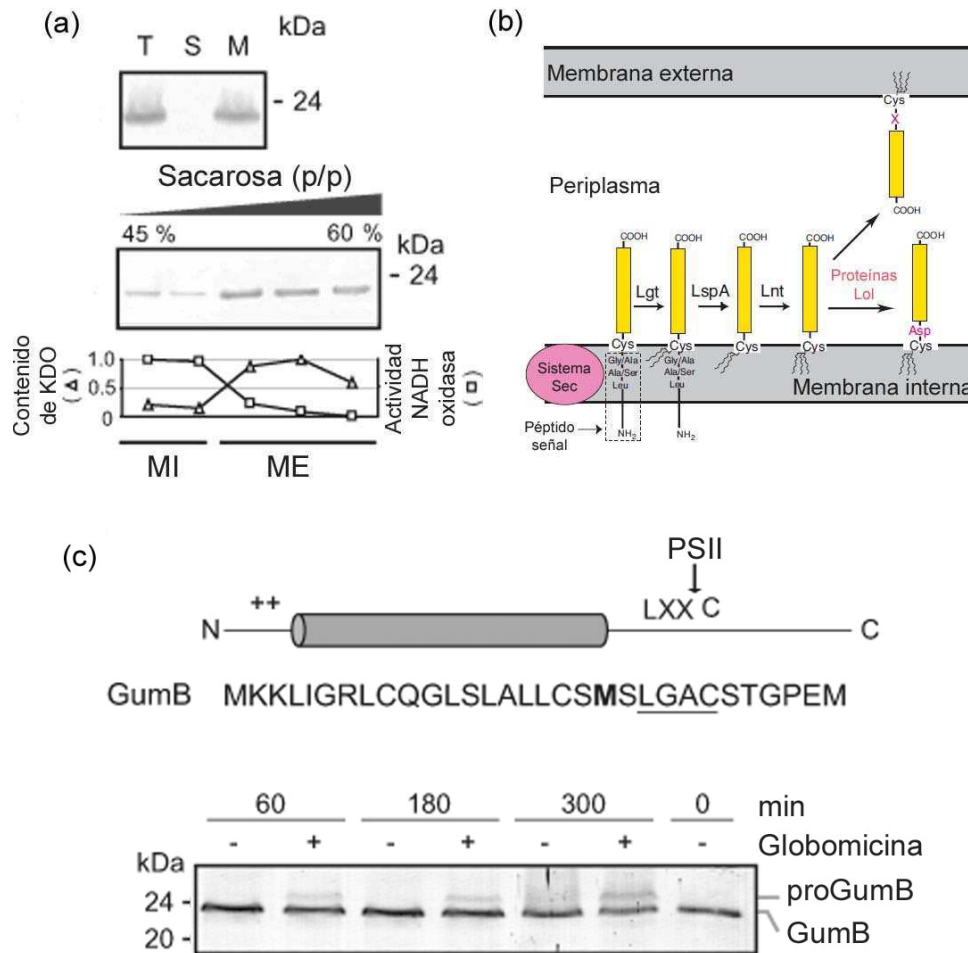


Figura 4.7. GumB es una lipoproteína de membrana externa. (a) Localización subcelular. Inmunodetección con anticuerpos contra GumB de células totales (T), fracción soluble (S) y fracción de membrana (M). Las membranas totales se separaron en un gradiente de sacarosa, distintas fracciones se analizaron por inmunodetección con anticuerpos contra GumB. La actividad NADH oxidasa y el contenido de KDO son marcadores de membrana interna y externa, respectivamente. Tomado de Galván y col. [48]. **(b)** Procesamiento de lipoproteínas bacterianas. Tomado de Tokuda [51]. **(c)** Ensayo de inhibición con globomicina. Extractos totales de *X. campestris* tratados y sin tratar con globomicina se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos contra GumB. Tomado de Galván y col. [48].

5. Objetivos

5.1. Objetivos generales

En esta tesis se plantea profundizar en el conocimiento del transporte de polisacáridos a través de la pared bacteriana. El objetivo de esta tesis en particular se centra en estudiar aspectos vinculados a la estructura y al rol que cumple la lipoproteína GumB en la secreción del polisacárido xantano.

5.2. Objetivos específicos

1. Expresar y purificar GumB para estudios estructurales.

Diseño de diferentes construcciones, ensayando distintos vectores, etiquetas, cepas bacterianas y protocolos de purificación.

2. Determinación de la estructura de GumB.

Ensayos bioquímicos y estructurales.

3. Identificación de aminoácidos importantes para la funcionalidad de GumB.

Mutagénesis sitio-dirigida.

Localización subcelular y complementación *in vivo*.

4. Identificación de proteínas que interaccionen con GumB.

Ensayos bioquímicos.

6. Materiales y métodos

6.1. Materiales y procedimientos generales

Con el fin de analizar las proteínas y los extractos celulares, los mismos fueron resuspendidos en *buffer* desnaturalizante (100 mM Tris-HCl pH 8,2, 10 M urea, 2 % SDS), tratados 10 min a 100 °C y luego separados en geles SDS-PAGE, seguido por tinción con *Coomassie blue* o inmunodetección con anticuerpos específicos. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford en el caso de extractos celulares y mediante absorbancia a 280 nm para proteínas purificadas, utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y coeficiente de extinción calculado a partir del programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) [52-53].

6.2. Cepas y plásmidos

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.

Cepa	Características relevantes	Origen/ referencia
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac^fZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene
DH5α	F- Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44 λ- thi-1gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
BL21 (DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen
BL21 (DE3) plys	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (CamR)	Novagen
C41 (DE3)	Derivado de BL21(DE3), posee una mutación no caracterizada que previene la muerte celular asociada a la expresión de proteínas recombinantes tóxicas	[54]
C43 (DE3)	Derivado de C41 (DE3), transformado con el gen F-ATPasa y curado.	[54]
B834 (DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻) <i>gal dcm met</i> (DE3)	Novagen
S17-1	F- <i>RP4-2(Km::Tn7,Tc::Mu-1) ΔuidA3::pir⁺ recA1 endA1 thiE1 hsdR17 creC510</i>	[55]
<i>Xanthomonas campestris</i>		
XcFC2	Mutante estable Rif ^r derivada de NRRL B-1459	[46]
Xc1231	Rif ^r Δ <i>gum</i>	[56]

Xc405AB	NRRL B-1459 <i>ugp</i> Rif ^r llevando el plásmido pGum57-18s integrado en el cromosoma	[50]
---------	---	------

Plásmidos

pET28a	<i>His-tag</i> , Km ^r	Novagen
pBBAD22T	Derivado pBBR1MCS-4 con promotor BAD en el 5' del MCS, Tet ^r	[57]
pBBAD22K	Derivado pBBR1MCS-4 con promotor BAD en el 5' del MCS, Km ^r	[57]
pBBRprom	Derivado de pBBR1MCS-5 con promotor <i>gum</i> en el 5' del MCS, Gm ^r	[50]
pRep4	Derivado de pACYC contiene el gen <i>lacI</i> , Km ^r	Qiagen
pJC440	Derivado del pRK293. Contiene la región <i>xpsIV</i> de <i>X. campestris</i>	[58]
pRK404	Derivado de pRK2. Tc ^r	[59]
pQE-Xps#6	Clonado de <i>gumB</i> en pQE-30	[60]
pBGumBHis	Clonado NcoI-HindIII <i>gumB</i> en pBBAD22T, <i>His-tag</i> C-terminal	Esta Tesis
pBGumB	Clonado NcoI-HindIII <i>gumB</i> en pBBAD22T	Esta Tesis
pUGP	Clonado HindIII-BamHI <i>ugp</i> en pRK404	Esta Tesis
pBBRpromGumB	Clonado NdeI-XhoI <i>gumB</i> en pBBRprom	Esta Tesis
pBBRpromGumB51	Clonado en pBBRprom, cuyo producto proteico es GumB R51A	Esta Tesis
pBBRpromGumB89	Clonado en pBBRprom, cuyo producto proteico es GumB K89A	Esta Tesis
pBBRpromGumB100-105	Clonado en pBBRprom, cuyo producto proteico es GumB K100A/R105A	Esta Tesis
pBBRpromGumB126-127	Clonado en pBBRprom, cuyo producto proteico es GumB R126A/R127A	Esta Tesis
pBBRpromGumB178	Clonado en pBBRprom, cuyo producto proteico es GumB K178A	Esta Tesis

6.3. Medios y condiciones de cultivo

Para los clonados se utilizaron las cepas de *E. coli* DH5 α o XL1-Blue. Para la sobreexpresión de proteínas se ensayaron distintas cepas de *E. coli* y *X. campestris*. Las células de *E. coli* fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) a 37 °C (a menos que se indique de otra forma) con agitación a 200 rpm [61]. Las células de *X. campestris* se cultivaron en medio YM (5 g/l triptona, 3 g/l extracto de levadura, 3 g/l extracto de malta, 10 g/l glucosa) o en medio XOL modificado (10 g/l K₂HPO₄, 0,2 g/l KH₂PO₄, 1 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,001 g/l MnCl₂, 0,1 g/l MgCl₂, 1,25 g/l triptona, 1,25 g/l extracto de levadura, 0,05 g/l, 40 g/l glucosa, pH 7.5) a 28 °C con agitación a 200 rpm. Los antibióticos fueron utilizados en las siguientes concentraciones (mg/l): para *E. coli*,

ampicilina, 200; kanamicina, 30; gentamicina, 15; tetraciclina, 10; para *X. campestris*, kanamicina, 50; gentamicina, 30; tetraciclina, 1.

Para los diferentes ensayos de expresión, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido -IPTG- (GBT) o L(+)-arabinosa (Calbiochem) se adicionaron a las placas o medios de cultivo a las concentraciones indicadas.

6.4. SDS-PAGE e inmunodetección

Para el análisis de proteínas se utilizó un sistema de geles desnaturizantes discontinuo (SDS-PAGE), empleando un gel de apilamiento y separación con poliacrilamida al 5 % y 10 %, respectivamente, salvo que se indique de otra forma. Para tinción con *Coomassie blue* los geles se incubaron 20 minutos en una solución de 0,1 % *Coomassie brilliant blue* R250, 50 % metanol, 10 % ácido acético. Los geles fueron desteñidos en una solución 10 % metanol, 7 % ácido acético, cambiando la solución cada 1 h, hasta que las bandas proteicas se observaron nítidamente.

Para la inmunodetección, los geles fueron transferidos a membranas de fluoruro de polivinilideno -PVDF- (GE Healthcare), utilizando un sistema semi-seco de transferencia con *buffer* 10 mM CAPS, 10 % metanol, pH 11,0. Los geles fueron transferidos a una corriente constante de 130 mA, durante 1 h a temperatura ambiente. Los marcadores de masa molecular fueron teñidos con una solución de 0,2 % Rojo Ponceau S y 10 % ácido acético, y desteñidos con varios lavados con H₂O MQ. Como anticuerpo primario se utilizó anticuerpo policlonal anti-GumB. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina o a peroxidasa (Sigma). Como sustrato de la fosfatasa alcalina se utilizó BCIP/NBT (Promega) y como sustrato de peroxidasa se utilizó el sistema ECL-Plus (GE Healthcare). El revelado se realizó según las indicaciones de los proveedores.

6.5. Obtención de suero inmune contra GumB

El antisuero contra la proteína GumB fue obtenido a partir de cuerpos de inclusión (CI) recuperados e inyectados en ratón siguiendo el protocolo descrito por Coligan [62]. Los CI resultaron de la sobreexpresión de la proteína en *E. coli* DH5 α /pQE-Xps#6 a 28 °C, 5 h en agitador a 200 rpm. Las células fueron cosechadas por centrifugación, resuspendidas en *buffer* 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM MgCl₂, 1 mM PMSF y fragmentadas por tres pasajes por French Press (20 000 psi). El extracto celular obtenido fue centrifugado a 3 000 x g para remover agregados. Los CI fueron recuperados del sobrenadante de 3 000 x g por centrifugación a 13 000 x g, se

resuspendieron en 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, y se incubaron 10 min a temperatura ambiente con agitación. Luego de centrifugar se guardó el sobrenadante (SN1) y el *pellet* obtenido se resuspendió en el mismo *buffer* suplementado con 0,5 % Tritón X-100 y 10 mM EDTA, y se incubó 10 min a temperatura ambiente con agitación. Luego de centrifugar se guardó el sobrenadante (SN2) y el *pellet* se lavó con H₂O MQ (se guardó el sobrenadante del lavado, SN3) y el nuevo *pellet* se resuspendió en 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 6 M urea, se incubó a 37 °C por 90 min con agitación suave. Luego de centrifugar se guardó el sobrenadante (SN4) y el *pellet*. Los sobrenadantes de cada paso y el último *pellet* se corrieron en geles SDS-PAGE y se tiñeron con *Coomassie blue* para identificar la fracción en la que se encontró GumB. La urea fue removida por diálisis contra PBS en membranas de tamaño de poro entre 12 y 14 kDa. Ratones Balb/c se inyectaron, vía subcutánea, con 20 µg de proteína en adyuvante completo de Freund. A los 15 días se inyectó a los ratones otra dosis de 20 µg de proteína mezclada con adyuvante incompleto de Freund, este procedimiento se repitió tres veces. Los anticuerpos policlonales se purificaron según Harlow y Lane [63] y los antiseros se guardaron a -80 °C. Antes de ser utilizado, el antisero fue preadsorbido con extractos de cepas de *E. coli* DH5α y de *X. campestris* 405AB.

6.6. Construcción de plásmidos

Para los clonados realizados, las secuencias de interés fueron amplificadas mediante PCR. Los oligonucleótidos utilizados (IDT o Genbiotech) se detallan en la Tabla 6.2. Los sitios de corte para las enzimas de restricción están subrayados. Las enzimas de restricción utilizadas y la T4 DNA ligasa fueron adquiridas en NEB. Las digestiones y ligaciones fueron realizadas según indicaciones del proveedor. La recuperación de plásmidos a partir de cultivos de bacterias y los geles de agarosa para el análisis de ADN fueron realizados por los métodos preestablecidos [61].

Tabla 6.2. Oligonucleótidos.

Oligonucleótidos para clonados		
Nombre	Secuencia (5'→3')	Sitio de restricción
FGB1* [†]	CATGCCATGGGGAAGAACTGATCGGACGACTCTGC	<i>Nco</i> I
RpBBADGB1*	CCCAAGCTTTCATCGGTAAGCGCGCCAC	<i>Hind</i> III
RpBBADGBHisC [†]	CCCAAGCTTTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAG	<i>Hind</i> III
FpromB [#]	GGGAATTCCATATGAAGAACTGATCGGACGAC	<i>Nde</i> I
RGBHisN [#]	CCGCTCGAGTCATCGGTAAGCGCGCCACACC	<i>Xho</i> I
Fw_ugp [†]	AAGCTTATGAGCAAGCGTATTTCGCAA	<i>Hind</i> III
Rv_ugp [†]	GGATCCTCAGCCGCGTGCGTCGGCCG	<i>Bam</i> HI
Oligonucleótidos para mutagénesis		
Nombre	Secuencia (5'→3')	Mutación
FwR51A	GGTGCAGCCC GAATACGCTCTTGCGCCGGGCGATCTGTTGC	R51A
RvR51A	GCAACAGATCGCCCGCGCAAGAGCGTATTCTGGGCTGCACC	
FwK89A	CCGTTGATTGGCGACGTCGCGGCCGCGGTCTGGGC	K89A
RvK89A	GCCCAGACCGGCGGCCGCGACGTCGCCAATCAACGG	
FwK100A-R105A	GGCGAACTGGAAGCGCTGGTCGCCGATGCGTATCGCGCAGGC	K100A, R105A
RvK100A-R105A	GCCTGCGCGATACGCATCGGCGACCAGCGCTTCCAGTTCGCC	
FwR126A-R127A	CGTGCAGGAGTCCAACGGGCTGCCGTACGGTCACTGGTGCG	R126A, R127A
RvR126A-R127A	CGCACCAGTGACCGTGACGGCAGCCCCGTTGGACTCCTGCACG	
FwK178A	CGCATGGTCAACGGGCAAGCAATGATTGCGCGGTTTCGACC	K178A
RvK178A	GGTCGAACCGCGCAATCATTGCTTGCCCGTTGACCATGCG	

*FGB1 y RpBBADGB1, se utilizaron para clonar GumB con péptido señal propio en pBBAD22T. [†]FGB1 y RpBBADGBHisC, se utilizaron para clonar GumB con péptido señal propio y etiqueta de histidinas en su extremo C-terminal en pBBAD22T. [#]FpromB y RGBHisN se utilizaron para clonar GumB con péptido señal propio bajo el promotor *gum* en pBBRprom. [†]Fw_ugp y Rv_ugp se utilizaron para clonar el gen *ugp* en pRK404.

6.7. Mutagénesis sitio dirigida

Las mutaciones se hicieron utilizando el kit comercial Quickchange (Qiagen) o por el método de PCR *overlapping*. Para el primer método, se utilizaron mezclas de reacción compuestas por: 0,4 mM dNTPs, 30 ng molde plasmídico (pBBRpromGumB), 2,5 U PFU Turbo (Stratagene), 10 % *buffer* PFU, 2 μM de cada oligonucleótido, H₂O MQ c.s.p 50 μl. Los ciclos de PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C, 4 min; luego, 20 ciclos de: desnaturalización a 95 °C (30 s), hibridización a 55 °C (2 min), extensión a 68 °C (20 min). Luego de la PCR, las muestras fueron digeridas

con 20 U de DpnI (NEB), a 37 °C por 3 h. Células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue fueron transformadas con los productos digeridos. La presencia de las mutaciones introducidas se corroboró por secuenciación del marco de lectura abierto completo.

La técnica de PCR *overlapping* consiste en 2 pasos de amplificación, que se realizaron de la siguiente manera: (a) 0,15 mM dNTPs, 0,2 ng molde plasmídico, 1 U Vent polimerasa (NEB), 10 % *buffer* Thermopol (NEB), 4 µM de cada oligonucleótido, H₂O MQ c.s.p 50 µl. Los fragmentos amplificados fueron extraídos de geles de agarosa, purificados y utilizados como molde en la PCR (b), cuya mezcla de reacción es igual a (a). En ambos casos, los ciclos de PCR consistieron en una desnaturalización inicial de 4 min a 94 °C, luego 30 ciclos de: desnaturalización a 94 °C (30 s), hibridación a 58 °C (45 s) y extensión a 72 °C (30 s). Finalmente, se realizó una extensión final a 72 °C por 4 min. Los productos de PCR fueron purificados y utilizados como insertos para los clonados correspondientes.

6.8. Introducción de material genético en *E. coli* y *X. campestris*

La introducción de plásmidos en *E. coli* y *X. campestris* fue llevada a cabo por electroporación utilizando un electroporador Gene Pulser Transfection System (Bio-Rad). La preparación de las células electrocompetentes y las condiciones de electroporación fueron especificadas por el fabricante. Para los ensayos de complementación, fue necesario introducir en *X. campestris* un plásmido con la región codificante para *ugp* (pJC440 o pUGP) mediante conjugación. 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 [64].

6.9. Fraccionamiento celular y detección de las proteínas

Para la localización subcelular, tanto en *E. coli* como en *X. campestris*, las células correspondientes fueron cosechadas y resuspendidas en *buffer* 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl₂. Las células se lisaron mediante tres pasajes por *French Press* a 20 000 psi. El extracto de células obtenido se centrifugó a 5 000 x g con el fin de precipitar las células sin romper y los restos celulares. El sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 12 000 x g para aislar cuerpos de inclusión. Finalmente, el sobrenadante se ultracentrifugó a 100 000 x g, con el fin de separar las membranas de la fracción soluble. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE e inmunodetección.

6.10. Sobreexpresión y purificación de proteínas

6.10.1. Expresión y purificación de His-GumB

El gen que codifica a GumB (fragmento 1336-1971 de la región *gum*; N° de acceso de GenBank U22511) fue clonado en el vector pQE30 por CP Kelco dando origen al plásmido pQE-Xps#6 [60]. La secuencia de la construcción se confirmó por secuenciación de ADN. Se reemplazó el péptido señal propio de GumB por una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal. De esta manera, la proteína se sobreexpresó en el citoplasma y se hizo uso de la etiqueta de histidinas para purificarla por afinidad por cationes. La proteína codificada por esta construcción tiene una masa molecular de 24,71 kDa. Células de *E. coli* DH5 α conteniendo el plásmido pRep4 se transformaron con pQE-Xps#6 y se cultivaron en medio LB, suplementado con ampicilina y kanamicina, a 37 °C hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,7. En ese momento la sobreexpresión se indujo por el agregado de 0,5 mM de IPTG. Las células se cultivaron durante 16 h más a 20 °C, se cosecharon por centrifugación y se lavaron con una solución de 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM MgCl₂. Las células lavadas se resuspendieron en 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM DDM, 1 mM PMSF y se rompieron mediante tres pasajes por French Press a 20 000 psi y 4 °C. Las células rotas se incubaron durante 1 h con agitación suave a 4 °C, luego se centrifugaron a 100 000 x g por 1 h a 4 °C. El extracto soluble se sometió a purificación por cromatografía líquida (FPLC, Jasco). En primera instancia, la muestra se inyectó en una columna de Ni-NTA de 5 ml equilibrada con 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,54 mM DDM. La columna se lavó con este *buffer* hasta que no se observó absorbancia a 280 nm. Las proteínas se eluyeron con 60 ml de un gradiente lineal de 0 a 400 mM de imidazol con un flujo de 1 ml/min. Las fracciones que contenían His-GumB se identificaron por geles de SDS-PAGE y se concentraron a 5 mg/ml utilizando un filtro concentrador centriprep (Millipore) con un poro de 10 kDa. La proteína concentrada se sometió a un segundo paso de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular, utilizando una columna Superdex 200 (GE Healthcare), con un rango de 10 000-600 000 Da, y un *buffer* de corrida compuesto por 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,18 mM DDM.

6.10.2. Expresión y purificación del derivado de selenio-metionina de His-GumB

La sobreexpresión y purificación del derivado de selenio-metionina de His-GumB se realizó siguiendo los mismos protocolos utilizados para His-GumB, salvo que para la expresión se utilizaron células de *E. coli* B834 (auxótrofas de metionina) y se cultivaron

en medio mínimo M9 (5 g/l glucosa, 40 mg/l de todos los aminoácidos menos metionina, 50 mg/l L-SeMet, 2 mg/l tiamina, 2 mg/l biotina) [65].

6.10.3. Expresión y purificación de GumB-acilada

Células de *X. campestris* FC2 conteniendo el plásmido pBGumB se crecieron en YM a 28 °C hasta alcanzar una DO_{600} de 0,8, momento en el cual se indujo la sobreexpresión mediante el agregado de 0,1 % de arabinosa. Las células se cultivaron por 16 h más, se cosecharon por centrifugación y se lavaron con *buffer* fosfato 20 mM pH 7, 50 mM NaCl. Las células lavadas se resuspendieron en *buffer* fosfato 20 mM pH 7, 50 mM NaCl, 1 mM PMSF y se rompieron por tres pasajes por *French Press* a 20 000 psi y 4 °C. Las células rotas se centrifugaron para eliminar restos celulares y se recuperaron las membranas totales por ultracentrifugación. Las membranas totales se resuspendieron en *buffer* fosfato 20 mM pH 7, 2 % N-Lauril Sarcosil, 1 mM PMSF y se incubaron 1 h a temperatura ambiente. Se recuperó la membrana externa por ultracentrifugación y se solubilizó con *buffer* fosfato 20 mM pH 7, 50 mM NaCl, 17 mM DDM a 4 °C por 16 h. El sobrenadante obtenido luego de ultracentrifugar se purificó mediante una columna Superdex 200 (GE Healthcare) utilizando *buffer* fosfato 20 mM pH 7, 50 mM NaCl, 1,7 mM DDM.

6.11. Cristalografía de rayos X

6.11.1. Cristalogénesis

Los ensayos de cristalización se realizaron empleando el método de difusión de vapor de la gota sentada usando los kits comerciales JBScreen Classic, JBScreen Membrane (Jena Bioscience) y Crystal Screen (Hampton Research). Se utilizó un robot (Honeybee 963) para dispensar igual volumen de proteína y solución de cristalización (0,2 µl) en el pocillo de la gota y 50 µl de solución de cristalización en el pocillo de solución de reservorio. Las placas se incubaron a 18 °C. Las condiciones que presentaron crecimiento cristalino se repitieron mediante el método de difusión de vapor de la gota colgante (1 µl de solución de cristalización, 1 µl de proteína y 500 µl de solución de cristalización en el pocillo de reservorio) ensayando distintas concentraciones de proteína (5, 10, 15 y 20 mg/ml). Además se realizaron ensayos de optimización de estas condiciones mediante el agregado de aditivos (10 % del volumen de la gota, Tabla 6.3) o modificando de a uno por vez la concentración de los componentes de los *buffers*. Se observó crecimiento cristalino aproximadamente luego de 30 días de incubación, momento en el cual se montaron y crio-conservaron en *buffer* de cristalización conteniendo 20 % de glicerol hasta su medición.

Tabla 6.3. Aditivos ensayados

Compuesto	Concentración final	Compuesto	Concentración final
CaCl ₂	10 mM	Etilenglicol	3 % v/v
CoCl	10 mM	Fenol	10 mM
CsCl ₂	100 mM	Metanol	3 % v/v
MgCl ₂	10 mM	MPD	3 % v/v
NaCl	200 mM	PEG 400	5 % v/v
NiCl ₂	10 mM	PEG 600	5 % v/v
Cloruro de guanidinio	100 mM	PEG 1000	2 % v/v
Tartrato de K ⁺ Na ⁺	100 mM	PEG 1500	3 % v/v
Citrato de Na ⁺	100 mM	PEG 3350	1 % v/v
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM	PEG 6000	3 % v/v
EDTA	100 mM	PEG 20000	1 % v/v
Glicerol	3 % v/v	PEG MME 550	3 % v/v
1-propanol	4 % v/v	PEG MME 2000	2 % v/v
Acetonitrilo	3 % v/v	PEG MME 5000	3 % v/v
DMSO	3 % v/v	Xantano	0,02; 0,05; 0,1 % v/v
Etanol	3 % v/v		

6.11.2. Soaking con metales pesados

Cristales de His-GumB fueron incubados en 30 µl de *buffer* de cristalización conteniendo 3 µl de una solución 0,1 M de alguno de los siguientes metales pesados: K₂PtCl₄, PtCl₂, HgCl₂, C(HgOAc)₄, HgBr₂, Hg(CN)₂, PbNO₃, K₂Au(CN)₂. Los tiempos de incubación ensayados fueron 0,2, 2 y 20 h. Luego los cristales se lavaron con solución del reservorio, se montaron y crio-conservaron en *buffer* de cristalización conteniendo 20 % de glicerol hasta su medición.

6.11.3. Soaking con KI y CsCl

Los cristales se incubaron en *buffer* de reservorio conteniendo 35 % de glicerol y 0,32 M de KI o 0,65 M de CsCl, por 30 o 60 segundos, respectivamente [66-67]. Luego los cristales se montaron y crio-conservaron hasta su medición.

6.11.4. Resolución de la estructura cristalográfica de His-GumB

6.11.4.1. Obtención de datos de difracción

El set de datos de difracción del cristal nativo de His-GumB se colectó en la línea PROXIMA 1 del sincrotrón de SOLEIL, Saclay, Francia. Las imágenes se integraron con el programa MOSFLM [68] y se escalaron con SCALA del paquete de programas de CCP4 [69-70].

El set de datos del derivado de selenio metionina (Se-Met) de His-GumB se colectó en la línea X12B del sincrotrón del laboratorio nacional de Brookhaven, Nueva York, Estados Unidos. Los datos se analizaron utilizando los programas HKL2000 [71] y Phenix [72]. Las fases se calcularon a partir del derivado de Se-Met en el pico de absorción del átomo de selenio (0,9796 Å) mediante el método de difracción anómala a una única longitud de onda utilizando la herramienta AutoSol de Phenix. El modelo obtenido se refinó utilizando Phenix, la estrategia de refinamiento consistió en corrección de solvente, escalado anisotrópico de los datos, refinamiento de coordenadas y refinamiento de factores B.

La resolución de la estructura cristalografía de His-GumB nativa se realizó mediante reemplazo molecular utilizando el programa Phaser de Phenix y como modelo la estructura del derivado de Se-Met de His-GumB. La estrategia de refinamiento utilizada fue la misma que la descrita para el derivado de Se-Met de His-GumB.

6.11.4.2. Análisis de la estructura cristalográfica

El programa VMD [73] se utilizó para la visualización y la generación de figuras de la estructura cristalográfica de His-GumB.

La estructura cristalográfica de His-GumB se cargó al servidor PDBePISA [74] para el análisis de las interfases entre monómeros y la estimación del complejo más estable en solución.

Para el cálculo de la superficie electroestática de His-GumB en primer lugar se utilizó el servidor PDB2PQR [75] para transformar el archivo .pdb a .pqr que se utilizó como archivo de entrada para la herramienta APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) [76].

La identificación de bolsillos y cavidades se realizó mediante el servidor CASTp [77] utilizando una esfera de radio 1,4 Å como sonda. El programa Hollow [78] se utilizó para rellenar las cavidades identificadas con moléculas de agua.

6.12. Entrecruzamiento químico *in vitro*

Previo al entrecruzamiento se cambió a His-GumB del *buffer* 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,18 mM DDM al *buffer* fosfato 100 mM pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,18 mM DDM, mediante cromatografía utilizando una columna Superdex 200. La proteína His-GumB a una concentración de 10 μ M, fue incubada con distintas concentraciones de xantano. Las mezclas se incubaron con el reactivo bifuncional ditiobis[succinimidil propionato] -DSP- (0, 0,1 y 0,5 mM) a 20 $^{\circ}$ C o en hielo. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos a las cuales se les agregó solución de finalización (20 mM Tris-HCl pH 7,5). Luego de mezclarse con *buffer* desnaturalizante, las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE seguida por tinción con *Coomassie blue*. Para analizar la reversibilidad del entrecruzamiento, se agregó 2 mM ditioneitol (DTT, Sigma).

6.13. Entrecruzamiento químico *in vivo*

Células de XcFC2 se resuspendieron a una DO_{600} de 5 en PBS. El entrecruzamiento se realizó con 0,2 mM DSP en hielo. A distintos tiempos se tomaron alícuotas a las que se les adicionó solución de finalización. Las células se cosecharon y se resuspendieron en *buffer* de desnaturalización. El entrecruzamiento se revirtió por el agregado de 50 mM DTT. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de inmunodetección con anticuerpos contra GumB [79].

6.14. Dispersión de luz estática acoplada a columna de exclusión molecular (SEC-SLS)

Para el análisis del estado oligomérico de His-GumB en solución, se inyectaron 250-500 μ g (en 200-450 μ l) de proteína en una columna Superdex 200 (GE Healthcare), acoplada a un instrumento de dispersión de luz estática (Presicion Detectors PD2010) conectado a un equipo HPLC (LKB 2248) y a un detector UV (Waters 486).

Para la determinación del estado oligomérico se utilizó el método de los tres detectores, para ello se midieron las señales de absorbancia a 280 nm, la dispersión de luz y el índice de refracción [80]. La masa molecular de la proteína en la micela proteína/detergente se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$PM_{\text{proteína}} = (\Delta LD \cdot \Delta UV_{280}) / (K \cdot A_{280, \text{proteína}} \cdot (\Delta IR)^2),$$

donde ΔLD , ΔUV_{280} y ΔIR es la diferencia de luz dispersada, absorbancia a 280 nm e índice de refracción, respectivamente, entre una solución con proteína y la misma solución sin proteína. Estas diferencias se calcularon como el área bajo la curva de las

respectivas señales. A_{280} es el coeficiente de extinción ($\text{ml mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y K es una constante que depende del índice de refracción del solvente, de la longitud de onda usada y del ángulo entre la luz incidente y la dispersada. Para la determinación del valor de K se utilizó BSA como estándar. Los datos se analizaron con el programa Discovery32 (Precision Detectors).

6.15. Dispersión de neutrones a bajos ángulos (SANS)

His-GumB a una concentración de 10 mg/ml y en un *buffer* conteniendo 20 % de agua deuterada fue medida en la línea D22 de dispersión de neutrones (Institut Laue Langevin, Grenoble, Francia). Previo a las mediciones His-GumB fue centrifugada 10 min a 4 °C. El análisis de los datos fue realizado por la co-responsable de la línea D22, Anne Martel. Se generaron modelos del sistema con los programas Dammif [81] y Gasbor [82]. A partir de estos modelos utilizando el programa Situs [83] se generó una envoltura que representa la estructura de His-GumB en solución. La superposición de esta envoltura con la estructura cristalográfica se realizó con el programa Situs. El ajuste de las curvas experimental y teórica se realizó con el programa Cryson [84].

6.16. Dicroísmo circular (CD)

Las mediciones de CD fueron realizadas en un espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco, Japón) con un sistema Peltier de control de temperatura. Los espectros en el UV lejano (200 a 260 nm) se colectaron en una cubeta de cuarzo (Hellma) de 0,1 cm de paso óptico con una velocidad de escaneo de 100 nm/min, un tiempo de respuesta de dos segundos y un ancho de banda de 2 nm, usando una concentración de proteína de 10 μM en ausencia y presencia de xantano (0,0001; 0,001; 0,01 %). Espectros en función de la temperatura se obtuvieron al calentar His-GumB de 5 a 95°C con una rampa de 2 °C/min. Los espectros resultantes provienen de un promedio de cinco mediciones. Los datos registrados fueron exportados y analizados con GraphPad Prism 4.

Las curvas de desnaturalización térmica se ajustaron a un modelo de dos estados utilizando la siguiente ecuación:

$$y_{\text{obs}} = \frac{y_{\text{N}} + m_{\text{N}}*T + (y_{\text{U}} + m_{\text{U}}*T) \exp\{(\Delta H/R*(1/T_{\text{m}}-1/T))\}}{1 + \exp\{(\Delta H/R*(1/T_{\text{m}}-1/T))\}}$$

donde y_{obs} representa la señal observada; y_{N} , m_{N} , y y_{U} , m_{U} , son parámetros de los estados nativo y desnaturalizado, respectivamente; T es la temperatura (K); R es la constante de los gases; ΔH es la entalpía aparente; y T_{m} es la temperatura aparente

de transición. Los datos se ajustaron mediante una regresión no lineal usando GraphPad Prism 4.

6.17. Proteólisis limitada

His-GumB a una concentración de 40 μ M fue parcialmente digerida con tripsina (Sigma), proteinasa K (Sigma), α -quimiotripsina (Sigma) y proteasa XIV (Sigma) con una relación en masa de 1:50 en ausencia y presencia de 0,01 % de xantano a 20 °C. La digestión con α -quimiotripsina se realizó en presencia de 10 mM CaCl_2 . Previo a la digestión His-GumB se incubó por 10 min a 20 °C. En todos los casos, alícuotas fueron tomadas a diferentes tiempos e incubadas con 1 volumen de *buffer* desnaturalizante suplementado con 2 mM PMSF. Luego fueron incubadas 10 min a 100 °C y reservadas a -80 °C hasta su uso. Las muestras obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE seguido por tinción con *Coomassie blue*.

6.18. Proteólisis de células de XcFC2

Células enteras y permeabilizadas de XcFC2 se resuspendieron a una DO_{600} de 10 en 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 140 mM NaCl y se sometieron a proteólisis con proteinasa K a una concentración final de 1 mg/ml a 28 °C. A distintos tiempos se tomaron alícuotas a las que se les agregó 20 mM PMSF para frenar la proteólisis. Las células se centrifugaron y resuspendieron en *buffer* desnaturalizante. Luego fueron incubadas 10 min a 100 °C y reservadas a -80 °C hasta su uso. Las muestras obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE seguido de inmunodetección con anticuerpos contra GumB.

Para la obtención de las células permeabilizadas de XcFC2, las mismas se crecieron hasta fase exponencial, se cosecharon y se lavaron 2 veces con 1 volumen del *buffer* 10 mM Tris-EDTA pH 8,0. Se resuspendieron en 1/3 del volumen del mismo *buffer* y se sometieron a tres ciclos de congelamiento en N_2 líquido y posterior descongelamiento en H_2O [46]. Finalizados los tres ciclos, se incubaron con 30 mM MgCl_2 y punta de espátula de DNAsa I (sigma), por 10 min a 10 °C. Luego fueron centrifugadas y resuspendidas en *buffer* de proteólisis.

6.19. Electroforesis azul nativa

Los extractos obtenidos luego de la solubilización de membranas de XcFC2 con 72 mM DDM, 750 mM ácido amino-caproico, 50 mM BisTris-HCl pH 7, 0,5 mM EDTA- Na_2 se mezclaron con igual volumen de *buffer* de sembrado (750 mM ácido amino-caproico, 5% *Coomassie blue* G250) y se sembraron en un gel nativo. El gel se realizó con capas de apilamiento al 4 % y de separación en gradiente con un rango de

5 a 13 %. La electroforesis se realizó en frío. Una vez finalizada la electroforesis se cortaron las calles del gel las cuales fueron sometidas a tinción con *Coomassie blue*, a transferencia a membrana de PVDF para inmunodetección o a una segunda electroforesis desnaturizante. Luego de la transferencia fue necesario incubar la membrana de PVDF en 100 mM β -mercaptoetanol, 2 % SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,5 por 30 min a 50 °C para remover el exceso de *Coomassie blue* y que éste no interfiera con la inmunodetección. Previo a la segunda dimensión el gel se incubó por 15 min en *buffer* desnaturizante (10% glicerol, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8,2, 0,002 % azul bromofenol, 50 mM DTT) [85].

6.20. Espectrometría de masa

La identificación de proteínas a partir de geles SDS-PAGE, teñidos con *Coomassie blue* se realizó en el servicio de LANAIS-PRO (IQUIFIB-CONICET, FFyB, UBA). Se procesaron bandas de la muestra a identificar, de un estándar y de una zona del gel sin muestra que se usó como blanco. Se digirió "in gel" utilizando tripsina como enzima proteolítica. El extractivo de cada una de las muestras se sometió a análisis en el Espectrómetro de Masas 4800 MALDI TOF TOF plus de ABI. En primer lugar, se obtuvieron los datos en modo reflectrón y luego se realizó la fragmentación, obteniéndose los espectros MS/MS, de las señales más importantes. Se utilizó el programa Mascot PMF para el estudio de los digeridos completos y el programa Mascot MSMS para el análisis de la fragmentación.

6.21. Cuantificación de la producción de xantano

Para la cuantificación de la producción del exopolisacárido, las cepas mutantes complementadas fueron cultivadas en medio XOL modificado. Una vez alcanzada la fase estacionaria las células se cultivaron por tres días más para asegurar la producción del polímero. El xantano producido por las distintas cepas se precipitó con isopropanol, al que luego se le realizaron posteriores lavados con etanol. El polímero obtenido se secó a 55 °C y se pesó para determinar el rendimiento de xantano [48].

7. Resultados

7.1. Clonado y expresión de GumB-acilada y His-GumB

A pesar de la importancia atribuida a las proteínas de membrana por estar involucradas en diferentes procesos celulares, el número de proteínas de membrana cuya estructura se conoce es reducido con respecto a las proteínas solubles. Una de las principales dificultades deriva de trabajar en una condición muy diferente al ambiente lipídico natural. A este problema se agrega la dificultad en la obtención de suficiente cantidad de proteína con pureza y calidad necesarias para realizar los ensayos correspondientes. Por tal motivo, se realizaron distintos clonados con el objetivo de obtener proteína en cantidad suficiente y con la calidad necesaria para realizar ensayos estructurales. El gen *gumB* fue clonado en vectores fuerte y levemente inducibles (pET y pBBAD, respectivamente), con y sin etiqueta de histidinas, manteniendo o removiendo la secuencia que codifica a su péptido señal. Además, se ensayó la sobreexpresión en distintas cepas de *E. coli* y *X. campestris* cultivándolas a distintas temperaturas, tiempos y con distintas concentraciones de inductores.

Finalmente, fue posible sobreexpresar GumB con su péptido señal pero sin etiqueta de histidinas en XcFC2 en un vector con un promotor levemente inducible (pBBAD), esta proteína fue denominada GumB-acilada. En la Figura 7.1 se observa que tras la inducción con 0,1 % de arabinosa aparece una banda de alrededor de 24 kDa, correspondiente a GumB ya que fue detectada con anticuerpos específicos mediante inmunodetección. Posteriormente, se analizó la cantidad de GumB-acilada que se localiza en la membrana externa, la cual fue procesada por la maquinaria celular. Para ello membranas totales (MT) se solubilizaron con N-Lauril Sarcosil, detergente que solubiliza selectivamente proteínas de membrana interna [86]. De esta manera, se observó que una fracción importante de proteína se encuentra asociada con la membrana interna (MI) posiblemente porque la maquinaria celular no es capaz de procesar tanta cantidad de proteína. La fracción de proteína que se encontró en la fracción insoluble y que por lo tanto, corresponde a proteínas de membrana externa (ME) se extrajo con el detergente DDM para luego realizar pruebas de purificación, que se detallan más adelante. La funcionalidad de la proteína GumB-acilada se analizó mediante la complementación de una cepa mutante en *gumB* (Xc405AB), (Figura 7.2). La cepa Xc405AB desarrolla colonias secas debido a su incapacidad de producir xantano, mientras que la cepa salvaje XcFC2 desarrolla colonias mucosas por la producción de polisacárido. Cuando GumB-acilada es expresada en Xc405AB es

capaz de restaurar el fenotipo productor de xantano ya que se observan colonias mucosas. Al adicionar una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal de GumB-acilada para facilitar la purificación, la proteína es incapaz de revertir hacia el fenotipo productor de xantano observándose colonias secas, indicando la importancia del extremo C-terminal en la funcionalidad de la proteína.

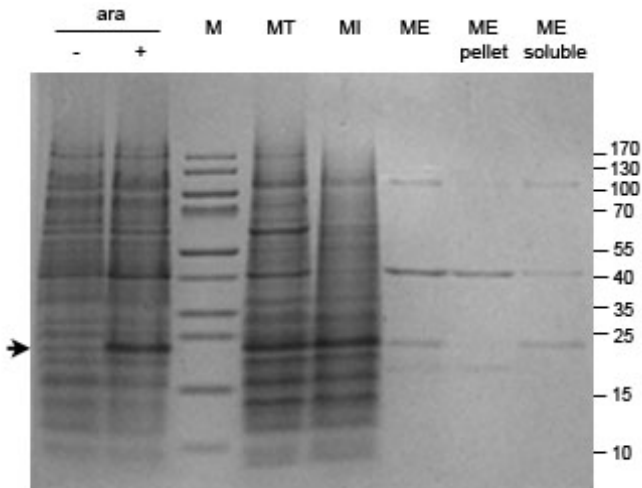


Figura 7.1. Sobreexpresión de GumB-acilada en *X. campestris* y localización subcelular. SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue*. M: marcador de masa molecular (a la derecha del gel se indican en kDa la masa de cada banda), MT: membranas totales de XcFC2/pBGumB; MI: membrana interna, obtenida luego de solubilizar MT con N-Lauril Sarcosil; ME: membrana externa, no soluble a N-Lauril Sarcosil; ME *pellet*: ME no solubilizada con DDM; ME soluble: ME solubilizada con DDM. La flecha a la izquierda del gel señala la banda correspondiente a GumB.

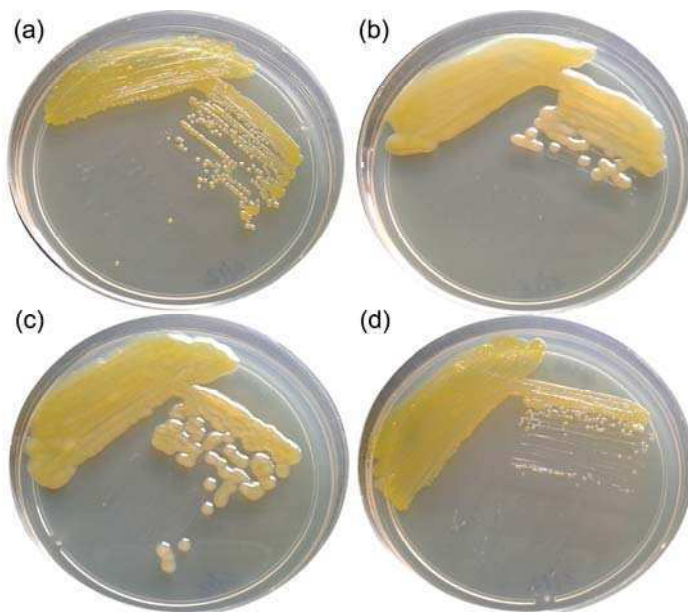


Figura 7.2. Ensayo de complementación de la cepa Xc405AB. (a) Xc405AB; (b) XcFC2, cepa salvaje; (c) Xc405AB/pBGumB/pJC440; (d) Xc405AB/pBGumBHis/pJC440. Debido a que la cepa Xc405AB además posee mutado el gen *ugp*, el mismo es incorporado en *trans* con el plásmido pJC440.

Por otro lado, fue posible sobreexpresar GumB reemplazando su péptido señal por una etiqueta de histidinas, a la que denominamos His-GumB (Figura 7.3). En este caso, la proteína se sobreexpresó en el citoplasma debido a la carencia del péptido señal que la dirige a la membrana. La purificación de esta proteína a partir de

E. coli/pQE-Xps#6 resultó más sencilla, obteniéndose cantidad de proteína suficiente para realizar ensayos estructurales, como se describe a continuación.

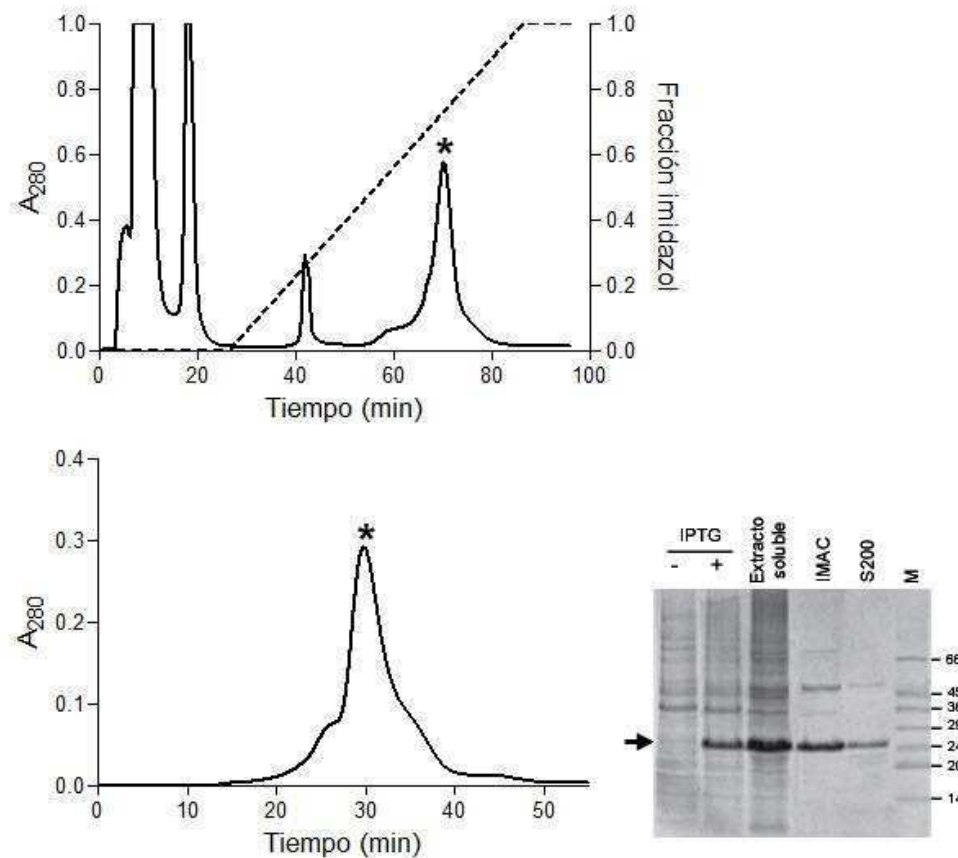


Figura 7.3. Sobreexpresión y purificación de His-GumB. His-GumB se purificó a partir de *E. coli*/pQE-Xps#6 y se purificó mediante dos pasos cromatográficos. En la parte superior se observa el cromatograma obtenido luego de la purificación por afinidad por cationes (IMAC) y abajo el obtenido luego de la purificación mediante exclusión molecular (S200), con asterisco se marcan los picos correspondientes a His-GumB. En el SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue* se observa la sobreexpresión de His-GumB y los distintos pasos de la purificación, la flecha indica la banda correspondiente a His-GumB. A la derecha del gel se indican las bandas del marcador de masa molecular (M) en kDa.

7.2. His-GumB

7.2.1. Purificación de His-GumB

His-GumB fue purificada mediante un protocolo consistente en dos pasos cromatográficos. Se realizó una cromatografía de afinidad por cationes seguida de una cromatografía de exclusión molecular (Figura 7.3). A pesar de que His-GumB se sobreexpresó en el citoplasma, y por lo tanto no fue necesario el uso de detergente para extraerla de la membrana, la proteína se purificó en presencia del detergente

DDM para estabilizarla y evitar que agregue. Se obtuvieron 20 mg de proteína por litro de cultivo con al menos un 95 % de pureza.

7.2.2. Cristalogénesis de His-GumB

En los ensayos iniciales de cristalización se probaron 362 condiciones comerciales mediante el método de difusión de vapor. Sólo en cuatro de estas condiciones se observó formación de cristales: JB2.B3, JB3.A1 (Figura 7.4a), JB10.A3 y JBM1.C1 (Figura 7.4e) del kit JBScreen Classic de Jena Bioscience. Estas cuatro condiciones intentaron optimizarse mediante variaciones en las concentraciones de los componentes de los *buffers* o mediante el agregado de aditivos. Mediante la primera estrategia no se obtuvieron cristales de mejor calidad, pero sí en presencia de aditivos. En la Figura 7.4 se puede observar cómo los aditivos usados generaron cristales más grandes y homogéneos. Al someter los cristales a rayos X se obtuvieron patrones de difracción como los que se observan en la Figura 7.5. El análisis de los datos de difracción del cristal crecido en la condición JB3.A1 en presencia de 1-propanol como aditivo mostró que el cristal pertenece al grupo de espacio $P2_12_12_1$ siendo los parámetros de la celda unidad, $a = 84,4$; $b = 90,5$; $c = 120,7$ Å; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Los datos de difracción sugieren la presencia de cuatro moléculas en la unidad asimétrica con un coeficiente de Matthews de $2,33$ Å³ Da⁻¹ y 47,23 % de contenido de solvente. La función de autorotación mostró cuatro picos no cristalográficos relacionados por simetría doble, confirmando la presencia de cuatro moléculas en la unidad asimétrica. Por otra parte, la presencia de tres picos en los extremos de los vectores perpendiculares entre sí en la función de autorotación confirmó la simetría 222 del cristal (Figura 7.5).

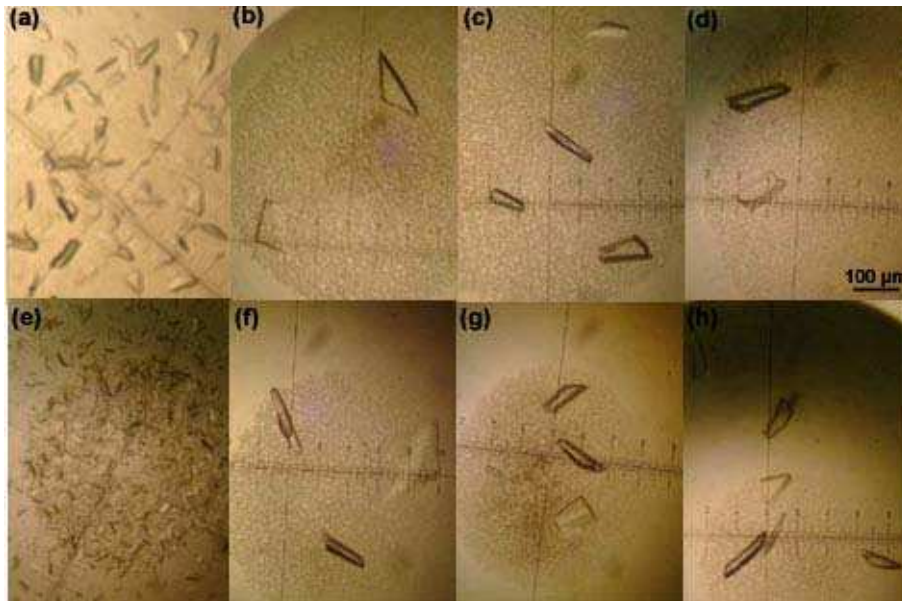


Figura 7.4. Condiciones de cristalización de His-GumB. (a) Cristales de His-GumB crecidos en JB3.A1 (100 mM Tris-HCl pH 8,5, 800 mM LiCl, 8 % PEG 4000), (b), (c) y (d) igual que en (a) pero en presencia de los aditivos 1-propanol, fenol y 2-metil-2,4-pentanediol, respectivamente. (e) Cristales de His-GumB crecidos en JBM1.C1 (10 % PEG 2000, 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 500 mM MgCl₂), (f), (g) y (h) igual que en (e) pero en presencia de los aditivos citrato de sodio, cloruro de sodio y sulfato de amonio, respectivamente.

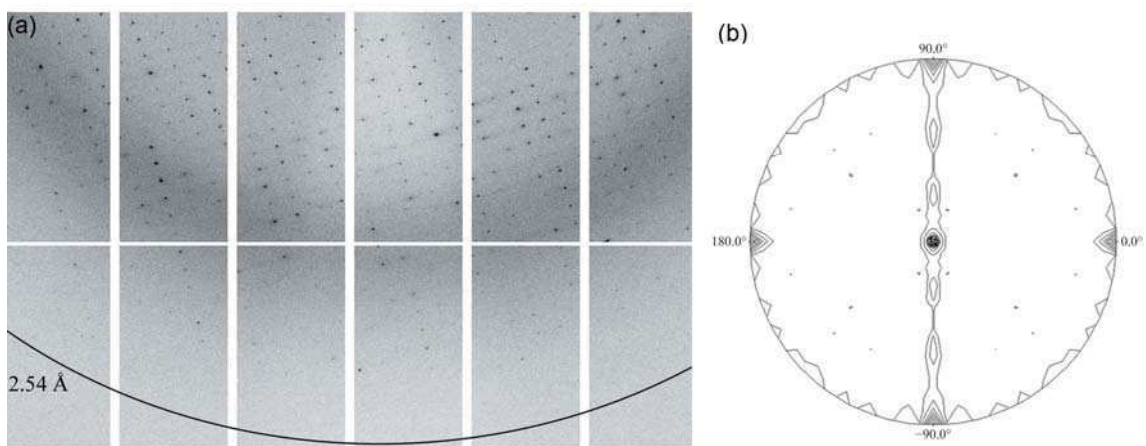


Figura 7.5. (a) Difracción del cristal nativo de His-GumB. (b) Función de autorotación de His-GumB. La función de autorotación se calculó a $\kappa = 180^\circ$ con el fin de identificar ángulos de rotación con simetría doble.

7.2.3. Estructura cristalográfica de His-GumB

A partir de los patrones de difracción se obtiene información sobre la intensidad de las reflexiones y los índices de las mismas. Sin embargo la información de las fases de las

reflexiones se pierde, las cuales son indispensables para poder construir un modelo estructural de la proteína. Existen distintos métodos para determinar las fases. Unos implican perturbar el sistema introduciendo en la red cristalina algún átomo pesado (muchos electrones) que produce mayor intensidad de radiación que los átomos ligeros. Ejemplos son los métodos de reemplazo isomorfo y dispersión anómala. Por otro lado, las fases pueden calcularse mediante reemplazo molecular, a partir de un modelo que se acepta como una buena aproximación. El modelo se extrae de otra molécula similar, de estructura conocida. Como regla práctica, reemplazo molecular funciona cuando la proteína modelo y la proteína con estructura a resolver comparten una identidad de secuencia de al menos un 40 %. Al momento de obtener los datos de difracción de His-GumB, sólo se conocía la estructura de Wza, lipoproteína de membrana externa involucrada en el transporte de CPS tipo I de *E. coli* [26]. Aunque la identidad de secuencia entre ambas proteínas es del 21 %, se intentó resolver la estructura mediante este método, sin obtenerse resultados positivos. Con el objetivo de obtener las fases mediante métodos experimentales (reemplazo isomorfo y/o dispersión anómala) se utilizó la técnica de remojo (*soaking*) de cristales de la proteína en soluciones de átomos pesados, y se expresó, purificó y cristalizó el derivado de selenio-metionina (Se-Met) de His-GumB.

Finalmente, fue posible resolver la estructura mediante dispersión anómala del átomo de selenio a una única longitud de onda (SAD, *Single-wavelength Anomalous Dispersion*). Los datos de difracción del cristal nativo y del derivado de Se-Met de His-GumB se muestran en la Tabla 7.1. El derivado de Se-Met de His-GumB cristalizó en el grupo de espacio $P2_1$ y difractó hasta 2,23 Å; los parámetros de la celda unidad fueron $a = 62,1$; $b = 89,0$; $c = 84,2$ Å; $\alpha = \beta = 90$, $\gamma = 100,2$ °. Debido a la baja completitud obtenida para el derivado de Se-Met, una vez resuelta la estructura mediante SAD se la utilizó como molde para resolver la estructura del cristal nativo mediante reemplazo molecular.

Tabla 7.1. Datos de colección y de procesamiento del cristal nativo y el derivado de Se-Met de His-GumB.

	Nativo	Derivado Se-Met
Longitud de onda (Å)	0,98011	0,9796
Grupo de espacio	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P12 ₁ 1
Parámetros de la celda unidad (Å, °)	a = 84,4; b = 90,5; c = 120,7 α = β = γ = 90	a = 62,1; b = 89,0; c = 84,2 α = β = 90, γ = 100,2
Resolución (Å)	90,49-2,54 (2,68-2,54)	37,64-2,23 (2,35-2,23)
R _{merge}	0,093 (0,468)	0,117 (0,355)
I/σ(I)	11,8 (3,8)	7,3 (2,8)
Completitud (%)	100 (100)	90,4 (90,7)
Multiplicidad	8,0 (8,0)	4,0 (3,9)
Refinamiento		
Nº total de reflexiones	249621 (35738)	160845 (22472)
Nº de reflexiones únicas	31227 (4482)	39789 (5826)
R _{work}	0,2510	0,2192
R _{free}	0,3245	0,2785
Nº de átomos (no hidrógeno)	5836	
proteína	5728	
agua	104	
cloruro	4	
Factor B promedio (Å ²)	60.6	
r.m.s.d de enlaces peptídicos (Å)	0.010	
r.m.s.d de ángulos (°)	1,20	
Ramachandran favorecidos (%)	95	
Ramachandran atípicos (%)	0	

Los valores entre paréntesis corresponden a la capa más externa.

En la celda unidad se encontraron cuatro unidades asimétricas, cada una de ellas presentando dos dominios (Figura 7.6a). El dominio D1 (residuos 48-118) presenta cinco hebras β antiparalelas y una hélice α, mientras que el dominio D2 (residuos 120-204) presenta cinco hebras β antiparalelas y tres hélices α cortas (Figura 7.6b). Por cristalografía no se pudieron determinar los primeros 25 aminoácidos de los 226 que componen a la proteína, probablemente debido a su movilidad. Dentro de los 25 residuos no observados, 14 corresponden a la secuencia proveniente del plásmido en que se clonó, de los cuales 6 son los residuos de histidinas adicionados para facilitar la purificación.

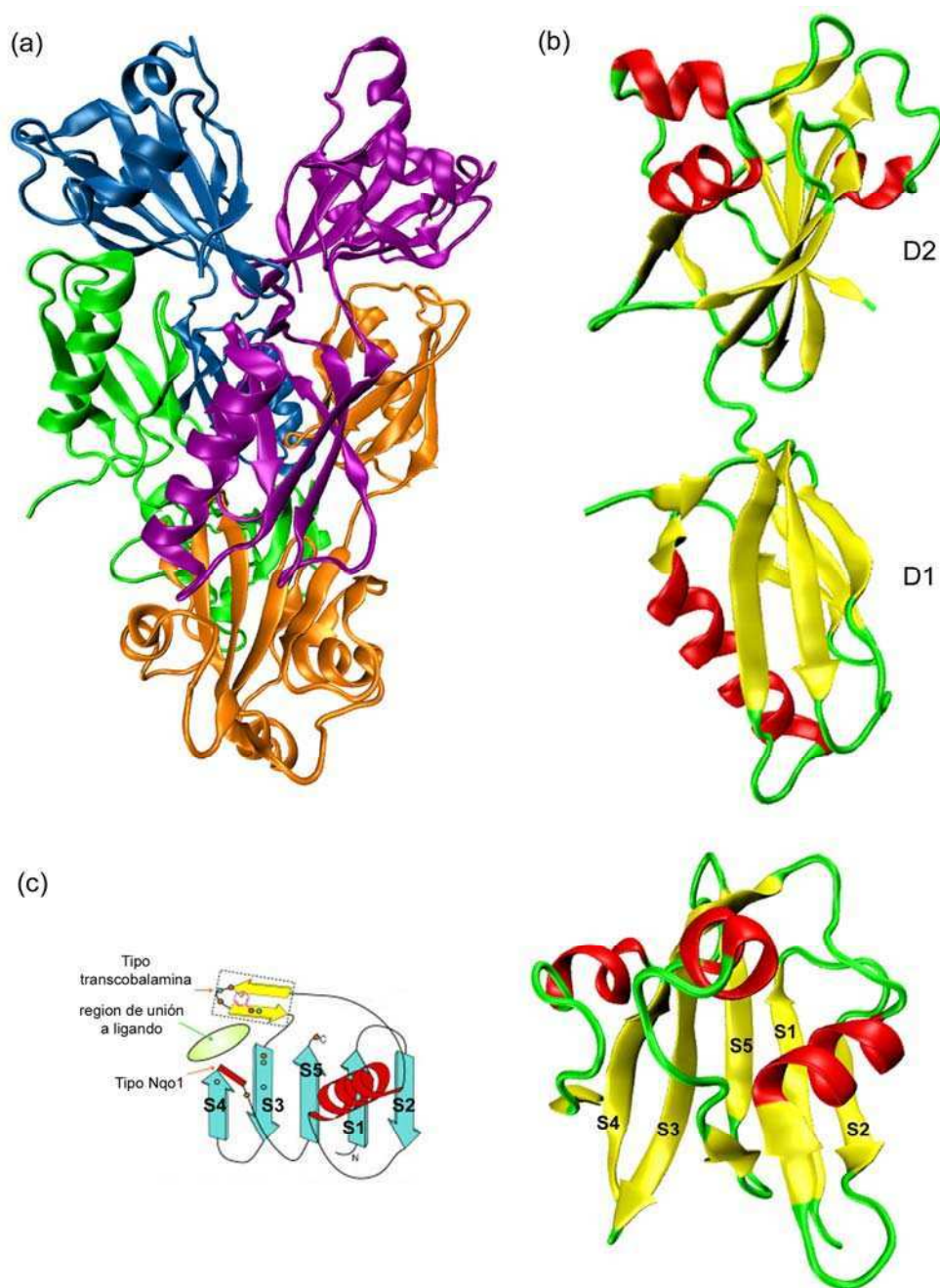


Figura 7.6. Estructura cristalográfica de His-GumB. (a) Tetrámero de His-GumB observado en la celda unidad, cada cadena de la proteína se encuentra coloreada con un color distinto. (b) Monómero de His-GumB coloreado según elementos de estructura secundaria, hélices α : rojo, hebras β : amarillo y bucles: verde. (c) Dominio β -grasp típico (izquierda, tomado de Burroughs y col. 2007 [87]) y dominio D2 de His-GumB (derecha).

El plegamiento que posee el dominio D2 es conocido como β -grasp [88]. Existen distintos tipos de dominios β -grasp, en correspondencia con las diversas funciones asignadas a estos dominios. En particular, el dominio β -grasp que posee His-GumB se denomina dominio β -grasp de unión a ligandos solubles (*soluble ligand-binding*

β -grasp, SLBB), ya que los primeros dominios caracterizados estaban involucrados en la unión de ligandos solubles o de pequeñas moléculas, como es el caso de la vitamina B12 [87]. Un dominio β -grasp típico está formado por una única hélice α y cuatro hebras β que forman una lámina. La característica de este dominio es que la primera (S1) y la última hebra β (S5) se encuentran adyacentes y son paralelas entre sí, mientras que las otras dos hebras β (S2 y S3) se encuentran flanqueando a las hebras centrales de forma antiparalela (**Figura 7.6c**). Dentro de la superfamilia SLBB se han identificado dos tipos de plegamiento tipo Nqol y tipo transcobalamina. El dominio SLBB presente en His-GumB corresponde al tipo Nqol que se caracteriza por la presencia de inserciones, generalmente hélices cortas, entre las hebras S4 y S5.

Wza y GfcC, proteínas involucradas en el transporte de CPS tipo I y IV, respectivamente, también poseen el dominio SLBB [26, 89]. Al comparar la estructura de los monómeros de estas proteínas se observa que presentan una organización similar de dominios (Figura 7.7a). Las tres proteínas comparten el dominio D2, con valores de RMSD de 1,7452 Å (His-GumB-Wza), 1,9014 Å (His-GumB-GfcC) y 1,9839 Å (Wza-GfcC), (Figura 7.7b). El dominio D1 sólo está presente en His-GumB y Wza (RMSD: 1,2151 Å, Figura 7.7c), mientras que el dominio D3, duplicación estructural del dominio D2, está presente en GfcC y Wza.

En la Figura 7.7a se observa que si se alinean los dominios D2 de His-GumB y Wza, los dominios D1 no se alinean porque se encuentran en otra orientación, y lo mismo sucede con los dominios D2, si se alinean los dominios D1. Teniendo en cuenta esta característica, fue posible construir un modelo de la conformación abierta de Wza al alinear los dominios de D2 de His-GumB con cada uno de los monómeros del octámero de Wza (Figura 7.8). El modelo de conformación abierta de Wza posee en su punto más estrecho un diámetro de ~26 Å, mientras que en la conformación cerrada es de ~6 Å.

La homología estructural observada entre His-GumB y los dominios D1 y D2 de Wza podría sugerir que, en el caso de GumB, exista otra proteína que complemente la ausencia de los dominios D3 y D4. Sin embargo, al realizar una búsqueda en PSI-BLAST utilizando la secuencia aminoacídica de los dominios D3 y D4 de Wza dentro del taxid de *Xanthomonas* no se halló ninguna proteína que presente homología con estos dominios.

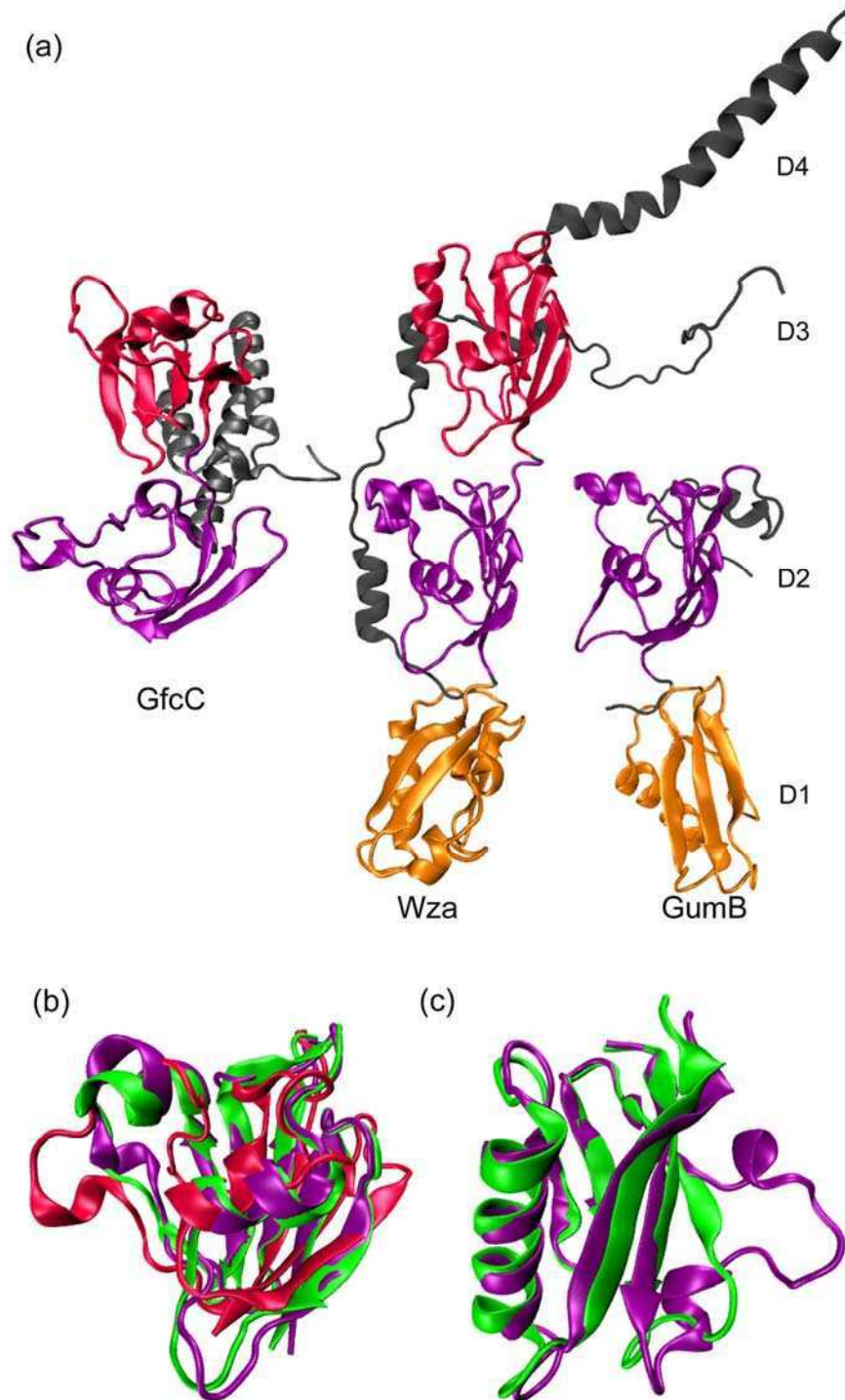


Figura 7.7. Alineamiento estructural de His-GumB con Wza y GfcC. (a) Comparación de las estructuras monoméricas de las tres proteínas. Los dominios que se encuentran coloreados de un mismo color (rojo, violeta y naranja) presentan homología estructural. (b) Alineamiento de los dominios D2 de His-GumB (verde), Wza (violeta) y GfcC (rojo) (c) Alineamiento de los dominios D1 de His-GumB (verde) y Wza (violeta).

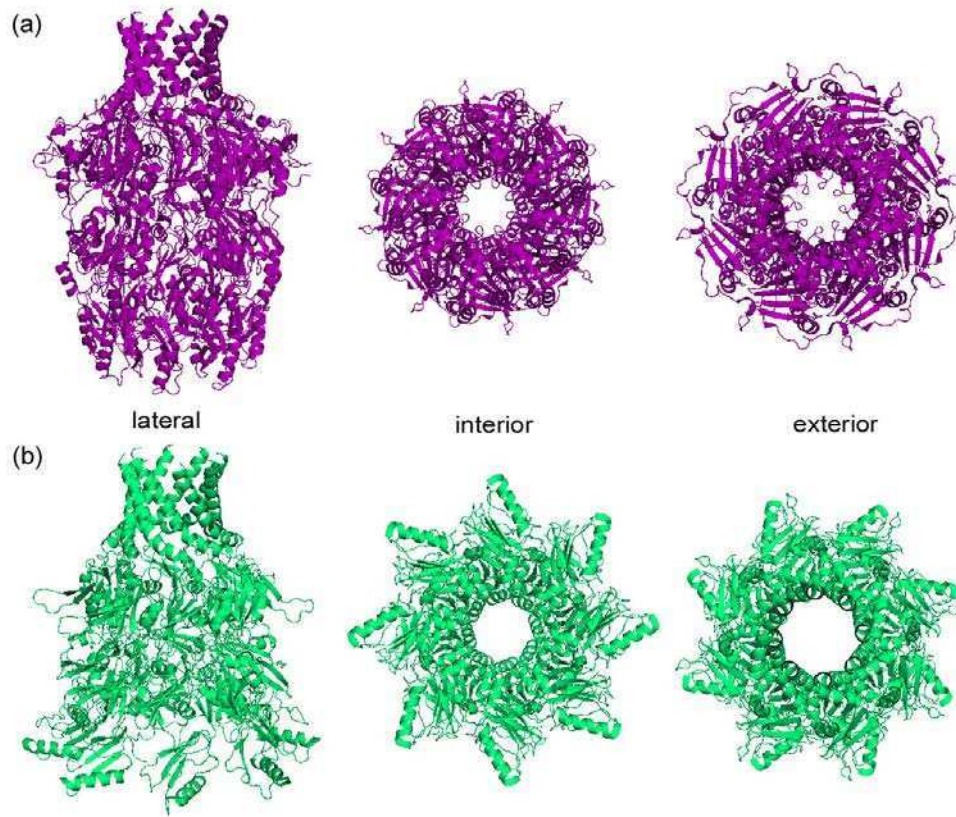


Figura 7.8. Modelo de la conformación abierta de Wza. (a) Estructura cristalográfica de Wza en su conformación cerrada. (b) Modelo de Wza en su conformación abierta, obtenido al alinear los dominios D2 de Wza y His-GumB. En este modelo los dominios D1 y D2 pertenecen a His-GumB y los dominios D3 y D4 a Wza. Se muestran las vistas laterales, y desde el interior y exterior celular de ambas estructuras

7.2.4. Estado oligomérico de His-GumB

La estructura cristalográfica de His-GumB se analizó mediante el servidor PDBePISA para predecir cuál es el complejo más estable en base a sus propiedades fisicoquímicas [74]. El análisis de la interfase entre monómeros sugiere que la estructura cuaternaria más estable es el tetrámero, con los siguientes valores: área accesible al solvente = 32550 \AA^2 ; área oculta = 9860 \AA^2 ; $\Delta G^{\text{int}} = -60,3 \text{ kcal/mol}$; $\Delta G^{\text{diss}} = 0,4 \text{ kcal/mol}$, donde ΔG^{int} es una medida de la ganancia en la energía libre de solvatación luego de la formación del tetrámero, mientras que ΔG^{diss} es una medida de la energía libre necesaria para la disociación del tetrámero. Dentro del tetrámero las cadenas A-B y C-D se encuentran formando 18 puentes de hidrógeno (área de la interfase = 1474 \AA^2 ; $\Delta G^{\text{int}} = -7 \text{ kcal/mol}$) mientras que las cadenas B-D y A-C forman 10 puentes de hidrógeno (área de la interfase = 577 \AA^2 ; $\Delta G^{\text{int}} = -3,7 \text{ kcal/mol}$) (Figura 7.9a). Estos datos sugieren que la formación del tetrámero no es un artefacto del

empaquetamiento del cristal, siendo altamente probable encontrar el tetrámero de His-GumB en solución. Mediante ensayos de entrecruzamiento químico con DSP y de dispersión de luz estática acoplado a una columna de exclusión molecular (SEC-SLS) se verificó que His-GumB es un tetrámero en solución (Figura 7.9b y c). Para calcular la masa molecular a partir de los ensayos de SEC-SLS se utilizó la técnica de los tres detectores, midiendo las señales de dispersión de luz estática, absorbancia a 280 nm e índice de refracción. Esta técnica permite determinar la masa molecular de proteínas de membrana en solución, mediante la separación física, a través de una columna de exclusión molecular, de agregados y micelas de detergente vacías de la proteína de interés [80]. De esta manera, se encontró que His-GumB a distintas concentraciones y bajo distintas condiciones de fuerza iónica, posee una masa molecular compatible con un tetrámero. En la Figura 7.9c se muestra la condición de His-GumB a 10 mg/ml en un *buffer* conteniendo 0,15 M de NaCl, donde la masa molecular obtenida fue de 98,87 kDa, compatible con un tetramero de His-GumB ($98,87/24,71 = 4,001$).

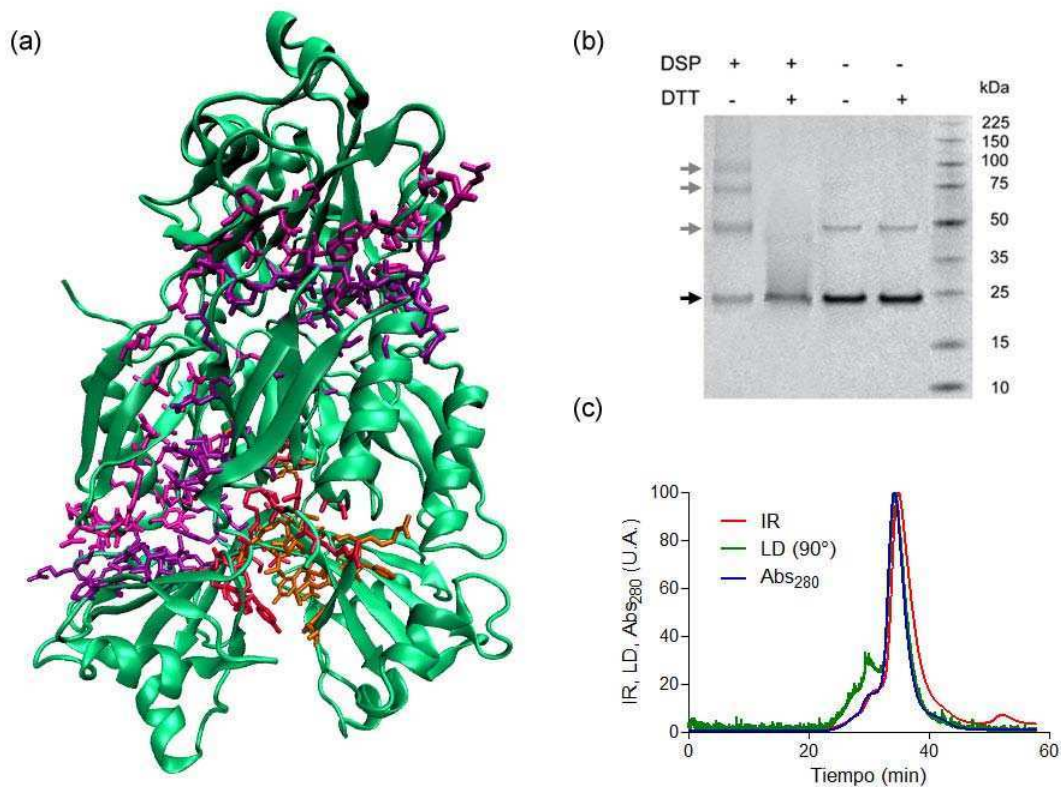


Figura 7.9. Estado oligomérico de His-GumB. (a) Residuos identificados mediante el servidor PISA como involucrados en las interfaces entre monómeros (A-B, rosa y violeta; A-C, rojo y naranja, respectivamente). (b) Entrecruzamiento químico con DSP. SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue*. La flecha negra señala a la especie monomérica, mientras que las flechas grises las especies oligoméricas de His-GumB. (c) Dispersión de luz estática acoplada a cromatografía de exclusión molecular. IR: índice de refracción, LD: luz dispersada, Abs_{280} : absorbancia medida a 280 nm.

Con el fin de corroborar si la disposición de los monómeros en el tetrámero en solución es igual a la que se observa en el cristal, se realizaron ensayos de dispersión de neutrones a bajos ángulos (SANS, *Small-angle neutron scattering*). Mediante la técnica de variación de contraste fue posible eliminar la dispersión del solvente, especialmente del detergente DDM. En esta técnica se intercambia el hidrógeno por deuterio lo cual, generalmente, no produce cambios notables en la muestra pero sí en la dispersión. La técnica de variación de contraste se basa en la diferencia de dispersión del deuterio con respecto al hidrógeno. Cuando una molécula se encuentra disuelta en agua, sus hidrógenos están disponibles para intercambiarse por deuterio. A una cierta relación de agua y deuterio (*match point*), la dispersión de la molécula se iguala con la dispersión del solvente y, por lo tanto, se puede eliminar su dispersión al restar la dispersión del solvente de los datos. El *match point* para DDM es del 20 %, por lo tanto, para observar sólo la dispersión de His-GumB y no del detergente se midieron curvas de dispersión de His-GumB en un *buffer* conteniendo 20 % de agua deuterada. De esta manera, el *buffer* posee la misma densidad de longitud de dispersión que el detergente. En la Figura 7.10a puede observarse como se ajusta la curva de dispersión experimental, al restarle la dispersión del *buffer*, con la curva de dispersión teórica calculada a partir de la estructura cristalográfica de His-GumB. A partir de la curva experimental fue posible construir un modelo de la forma de His-GumB en solución, el cual coincide con el obtenido por cristalografía (Figura 7.10b), con valores de radio de giro (R_g) de 30,17 y 30,28 Å, experimental y teórico, respectivamente.

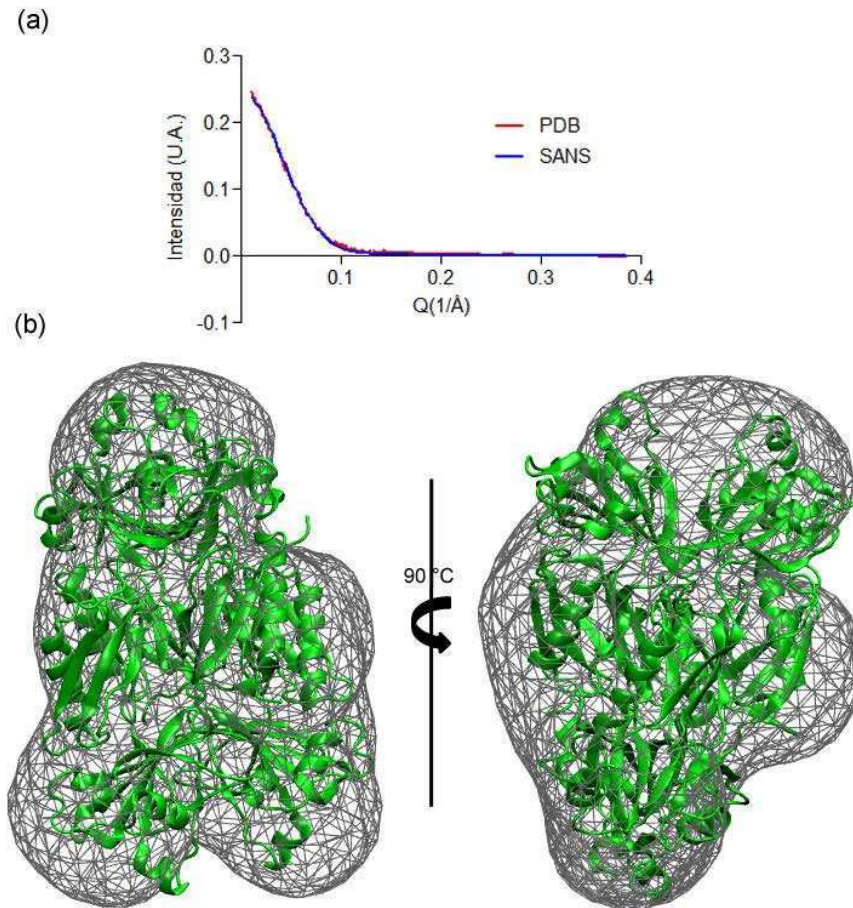


Figura 7.10. Estructura en solución de His-GumB. (a) Comparación de la curva experimental obtenida por SANS con la curva teórica de dispersión calculada a partir de la estructura cristalográfica. (b) Superposición de la estructura de His-GumB en solución con la estructura cristalográfica.

7.2.5. GumB podría interactuar con el xantano

Mediante el análisis de la superficie electrostática del tetrámero de His-GumB, se encontró una región con carga positiva que podría estar involucrada en la interacción con el polisacárido, el cual presenta carga negativa (Figura 7.11a). Esta característica también se ha observado en AlgE, proteína de membrana externa involucrada en el transporte de alginato. En la conformación abierta de AlgE, donde los bucles L2 y T8 no se encuentran obstruyendo el poro, esta región cargada electropositivamente permite la secreción del polisacárido (Figura 7.11c, [90]).

Por otro lado, la estructura cristalográfica de His-GumB se sometió al análisis con el servidor CASTp, el cual permite localizar, delimitar y medir superficies cóncavas, incluyendo bolsillos superficiales o huecos en el interior de la proteína [77]. Se encontraron 74 probables cavidades al analizar la estructura de His-GumB utilizando

una esfera de radio 1,4 Å como sonda. Uno de ellos llamó la atención por su gran área y volumen, 10 836 Å² y 19 302 Å³, respectivamente. En la Figura 7.11b puede observarse que parte de esta gran cavidad se solapa con la región electropositiva de la proteína. Con el programa Hollow fue posible construir un cilindro que ocupe esta región, dentro de la cual fue posible ubicar una molécula de xantano de ocho unidades repetitivas [78].

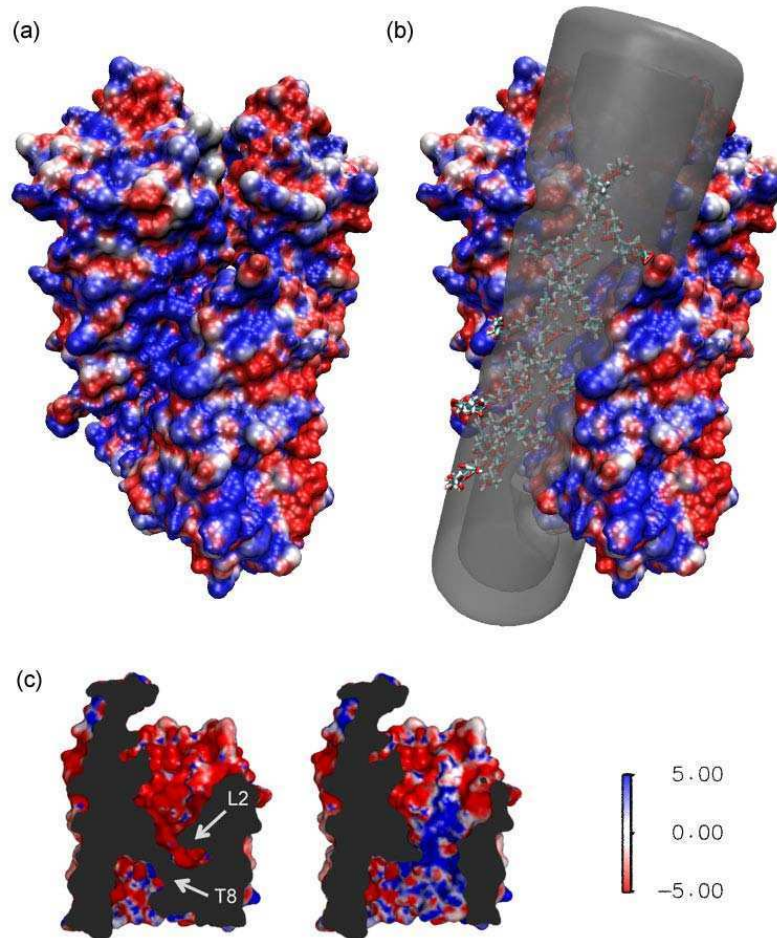


Figura 7.11. Análisis de la superficie electrostática de His-GumB. (a) Superficie electrostática de His-GumB. **(b)** Modelo de His-GumB en presencia de una molécula de xantano, con ocho unidades repetitivas, ubicada dentro de una cavidad generada con el programa Hollow. **(c)** Superficie electrostática de AlgE, porina de membrana externa involucrada en el transporte de alginato. Tomado de Whitney y col. 2011 [90].

Debido a que la estructura sugiere una probable interacción con el polisacárido se realizaron diferentes ensayos con el objetivo de comprobarlo. Es necesario aclarar que los ensayos de interacción se realizaron con moléculas de xantano y no con la unidad repetitiva; dado que esta última no pudo ser sintetizada químicamente, ni tampoco pudo obtenerse por digestión debido a que no se dispone de una enzima que digiera los enlaces β -1,4 que unen las moléculas de glucosa en la molécula de xantano.

7.2.5.1. Dicroísmo circular de His-GumB

La unión de ligandos generalmente genera cambios conformacionales en las proteínas, los cuales pueden ser monitoreados mediante técnicas biofísicas. Al incubar His-GumB con distintas concentraciones de xantano y medir los respectivos espectros de dicroísmo circular (CD) en el UV lejano, se observó que 0,01 % de xantano genera un incremento en la señal pero no modifica la forma del espectro (Figura 7.12a). Cuando se incubó His-GumB con el EPS producido por *Rhizobium leguminosarum*¹ no se observó este efecto sobre el espectro. El aumento en la señal de CD en UV lejano podría estar indicando que la unión del xantano a la proteína genera algún cambio conformacional sobre la misma. En general, la unión de ligandos aumenta la estabilidad de la proteína pero en este caso la estabilidad térmica, monitoreada en el UV lejano mediante CD, de His-GumB en ausencia y presencia de xantano fue la misma (Figura 7.12b). En ambos casos, se observa una desnaturalización cooperativa e irreversible. La desnaturalización térmica se puede ajustar a una desnaturalización en dos estados con valores de temperatura de *melting* aparente de 39,9 +/- 0,08 °C y 40 +/- 0,07 °C en ausencia y presencia de xantano, respectivamente.

¹ El EPS de *R. leguminosarum* fue cedido por Patricia Abdian del Laboratorio de Microbiología Molecular y Celular de la Fundación Instituto Leloir. Este EPS es un heteropolisacárido ramificado formado por unidades repetitivas octasacarídicas. El esqueleto consiste de dos residuos de glucosa y dos de ácido glucurónico, y la cadena lateral de tres residuos de glucosa y uno de galactosa [91].

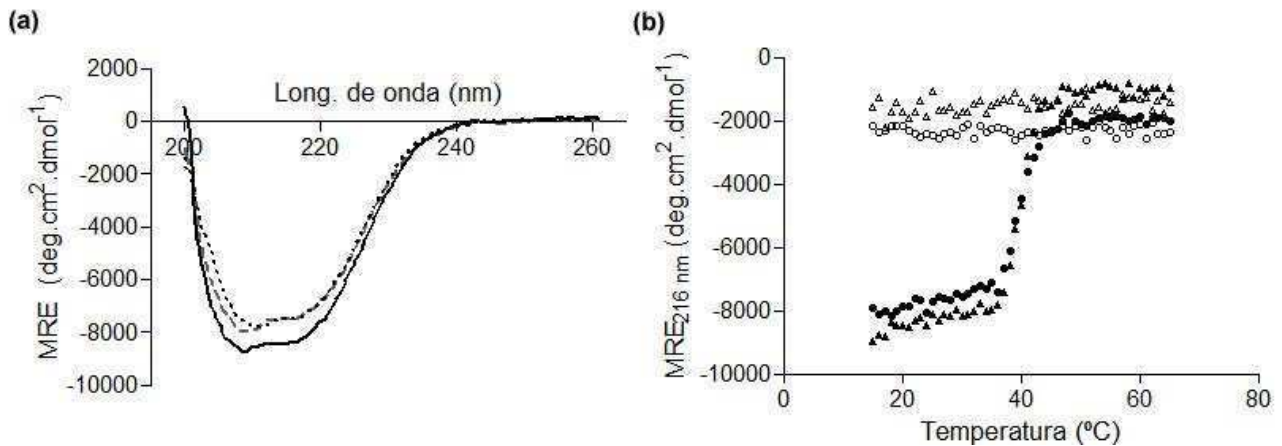


Figura 7.12. CD de His-GumB en presencia y ausencia de xantano (a) Espectros de His-GumB (- -), His-GumB en presencia de 0,01 % de EPS de *Rhizobium* (· · ·) y His-GumB en presencia de 0,01 % de xantano (-). **(b)** Curvas de desnaturalización térmica de His-GumB en ausencia (●) y en presencia de 0,01 % de xantano (▲) desde 15 °C a 65 °C; curvas de reversibilidad de His-GumB en ausencia (○) y en presencia de 0,01 % de xantano (Δ) desde 65 °C a 15 °C.

7.2.5.2. Proteólisis limitada de His-GumB

Los cambios conformacionales mediados por ligandos también pueden monitorearse mediante proteólisis limitada; al ocultar sitios de cortes para proteasas, los ligandos le confieren estabilidad a la proteína frente a la proteólisis. Se estudió la estabilidad de His-GumB en ausencia y presencia de xantano frente a distintas proteasas. Se seleccionaron proteasas con especificidad por distintos sitios de corte: la tripsina digiere especialmente residuos básicos, la α -quimotripsina residuos hidrofóbicos, la proteinasa K residuos alifáticos y aromáticos, y la proteasa XIV residuos ácidos. En todas las condiciones ensayadas no se observaron bandas diferenciales, indicando que el xantano no estaría ocultando sitios de corte para las proteasas ensayadas (Figura 7.13). Sin embargo, al analizar las digestiones se observa que His-GumB presenta de por sí una gran estabilidad frente a digestiones por proteasas, posiblemente atribuido a su forma compacta. En todos los casos se observa que la banda mayoritaria luego de la proteólisis por 20 h es de 20 kDa, salvo para la tripsina en la que la proteólisis es muy leve y la banda mayoritaria sigue siendo de 24 kDa.

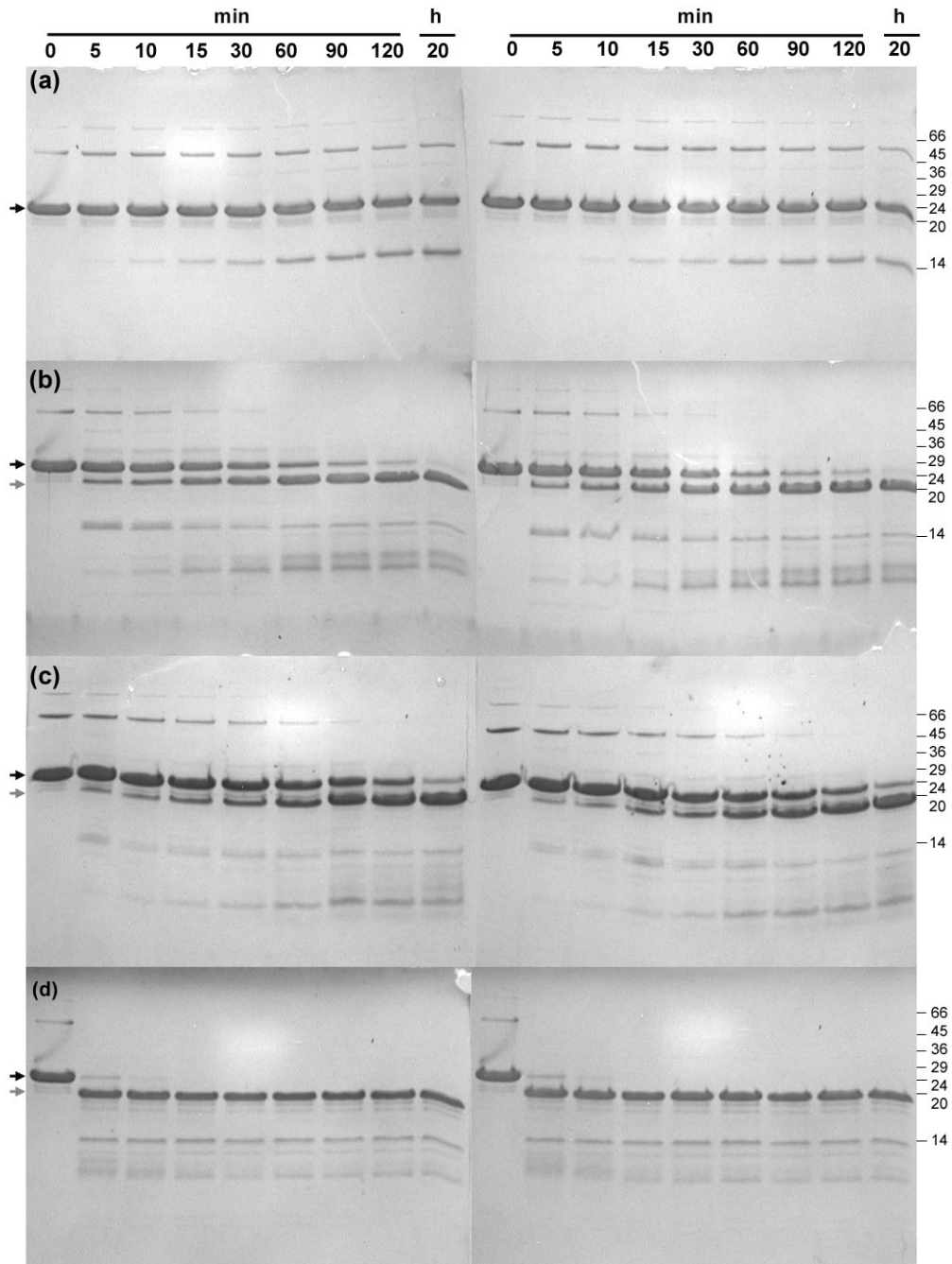


Figura 7.13. Proteólisis limitada de His-GumB. La proteólisis de His-GumB se realizó con las proteasas tripsina **(a)**, α -quimotripsina **(b)**, proteinasa K **(c)** y proteasa XIV **(d)**, en ausencia (izquierda) y presencia de 0,01 % de xantano (derecha). A la derecha del SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue* se indican las bandas del marcador de masa molecular en kDa. Las flechas negras señalan a la proteína sin digerir mientras que las flechas grises al fragmento mayoritario obtenido luego de la digestión.

7.2.5.3. Importancia de los residuos básicos de GumB para su funcionalidad

El tetrámero de GumB presenta dos regiones idénticas con carga positiva definiendo dos cavidades en forma de canaleta que permitirían acomodar al xantano. Los residuos responsables de otorgar la carga positiva a la canaleta 1 son los aminoácidos R51, K89, K100, R105, R126, R127 de las cadenas A y D, y K178, R229, R232 de las cadenas B y C. Mientras que los aminoácidos R51, K89, K100, R105, R126, R127 de las cadenas B y C, y K178, R229, R232 de las cadenas A y D son los responsables de otorgar la carga a la canaleta 2 (Figura 7.14).

Con el objetivo de analizar la importancia en la síntesis/secreción del xantano de los residuos básicos identificados en las cavidades de GumB se realizaron mutaciones de estos residuos por alanina. En el caso que dos residuos se encontraran próximos en la secuencia se diseñaron oligonucleótidos para mutar ambos residuos a la vez. Se obtuvieron las proteínas mutadas en los residuos R51, K89, K100/R105, R126/R127 y K178, no fue posible obtener la proteína mutada en los residuos R229/R232. En la Figura 7.15 se muestra el efecto, en la superficie electrostática de His-GumB, esperado por cada una de estas mutaciones. Se analizó la expresión y localización de las proteínas mutadas en la cepa Xc405AB/pUGP (*gumB*). Las proteínas con las mutaciones dobles K100A/R105A y R126A/R127A no se expresaron en niveles detectables, mientras que las demás proteínas con mutaciones simples si lo hicieron (Figura 7.16a). GumB-K89A y GumB-K178A se expresaron en menor medida que GumB-salvaje, mientras que GumB-R51A lo hizo en niveles comparables, y todas se localizaron en la fracción de membrana (Figura 7.16b). Sin embargo, las proteínas con mutaciones simples y GumB salvaje se expresaron en mayores niveles que GumB endógena expresada por la cepa salvaje XcFC2.

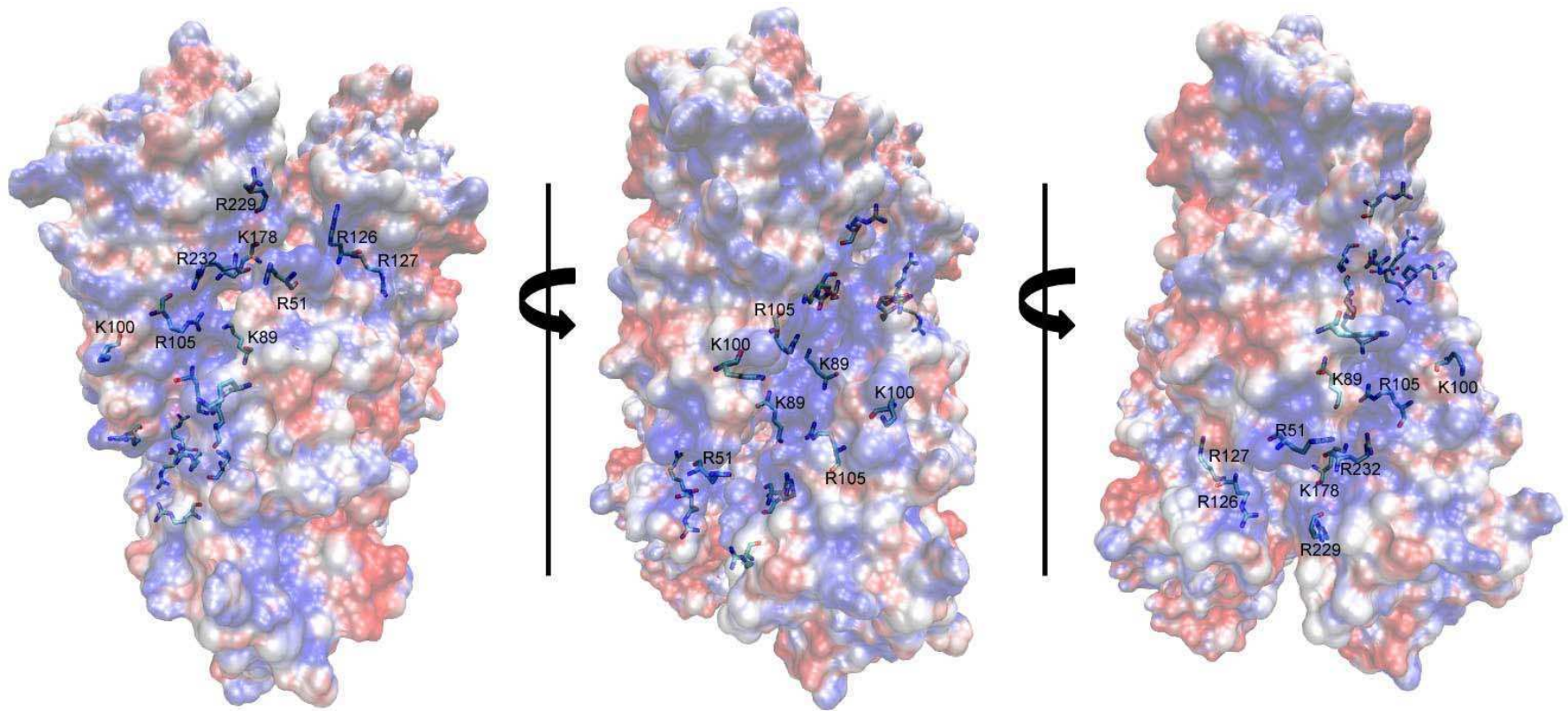


Figura 7.14. Residuos responsables de otorgar la carga electropositiva a His-GumB. Dentro de la superficie electrostática de His-GumB, se señalan los residuos básicos presentes en una de las cavidades electropositivas.

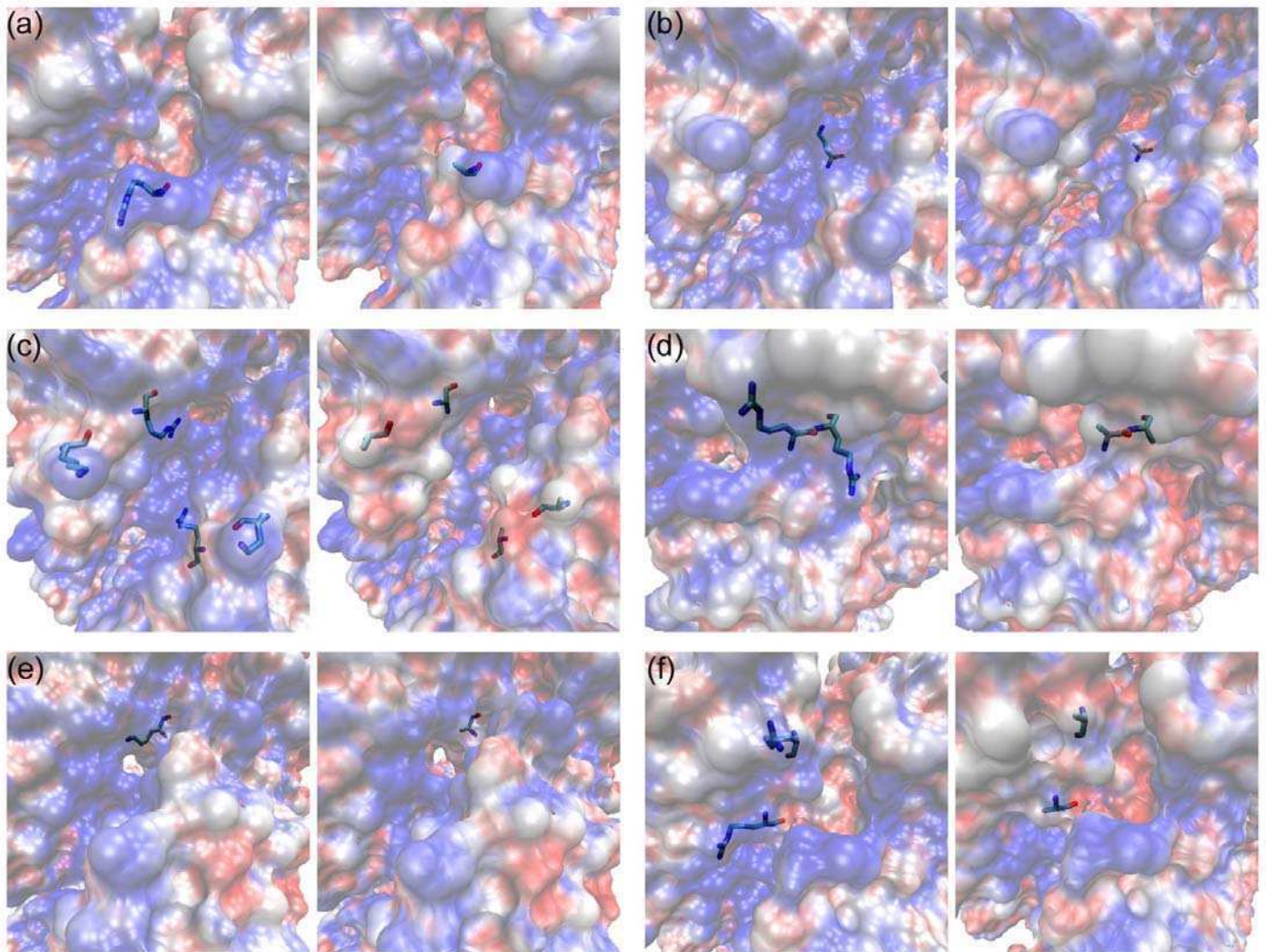


Figura 7.15. Efecto en la superficie electrostática de His-GumB generado por las mutaciones a alanina. A la izquierda de cada panel se muestra la superficie electrostática de la proteína salvaje y a la derecha de la proteína mutada en el/los residuo/s (a) 51, (b) 89, (c) 100-105, (d) 126-127, (e) 178, (f) 229-232.

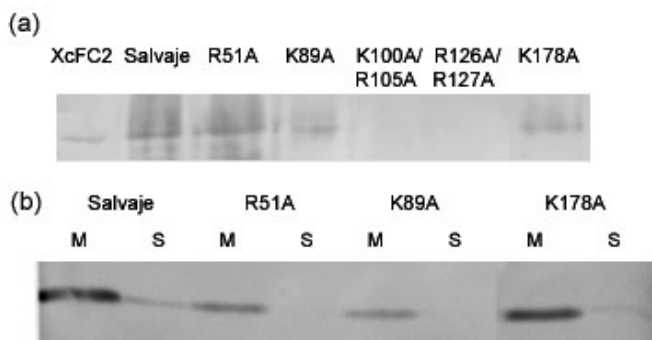


Figura 7.16. Expresión y localización de GumB salvaje y las correspondientes GumB mutadas en residuos básicos. Inmunodetección con anticuerpos contra GumB de (a) extractos totales y (b) fracciones de membrana (M) y soluble (S) de Xc405AB/pUGP/pBBRpromGumB y las respectivas mutaciones.

Como medida de la funcionalidad de las proteínas mutadas, se analizó la restauración de la producción de xantano en la cepa Xc405AB/pUGP complementada con cada una de las versiones mutadas de *gumB*. Dicho análisis mostró que Xc405AB/pUGP complementada con el plásmido pBBRpromGumB100-105 o pBBRpromGumB126-127 no restaura la producción de polisacárido, en concordancia con que en estos casos no se detecta expresión de la proteína mutada. Mientras que cuando las complementaciones se realizaron con los plásmidos pBBRpromGumB51, pBBRpromGumB89 y pBBRpromGumB178 se observó una reducción de aproximadamente el 50 % en la producción de polisacárido con respecto a la complementación con pBBRpromGumB, indicando que estos residuos son importantes para la funcionalidad de GumB (Figura 7.17). Esta reducción en la funcionalidad de GumB podría atribuirse a una interacción más débil con el polisacárido debido a la disminución en la carga positiva o por algún cambio conformacional de la proteína. La disminución de la expresión de las proteínas mutadas con respecto a la proteína salvaje indicaría, además, que la estabilidad de GumB se encuentra afectada por estas mutaciones. Sin embargo, las cepas Xc405AB/pUGP/pBBRpromGumB51, Xc405AB/pUGP/pBBRpromGumB89 y Xc405AB/pUGP/pBBRpromGumB178 expresan igual o mayor cantidad de proteína que la cepa salvaje XcFC2. Por lo tanto, la cantidad de proteína disponible en cada condición debería ser suficiente para que el sistema de síntesis/secreción funcione correctamente.

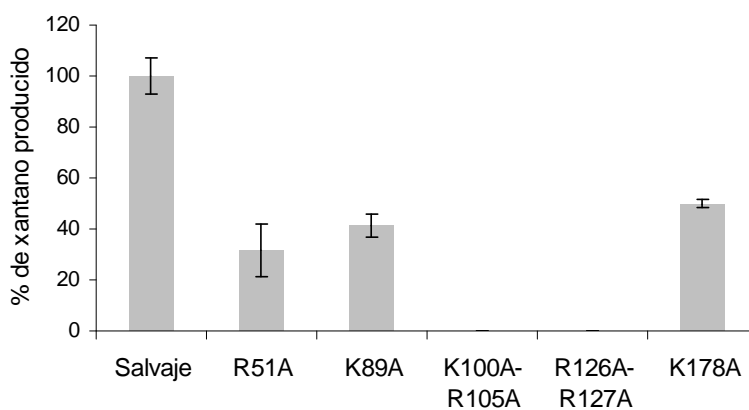


Figura 7.17. Cuantificación del xantano producido por la cepa Xc405AB/pUGP complementada con *gumB* y las versiones mutadas de *gumB*. Cada barra representa el promedio \pm la desviación estandar de tres experimentos independientes.

7.3. GumB-acilada

7.3.1. Purificación de GumB-acilada

En el caso de Wza, se ha visto que la acilación del extremo N-terminal es crítica para la secreción del CPS [23]. A pesar de la baja cantidad de proteína correctamente

localizada en la membrana externa se intentó purificar GumB-acilada con el objetivo de identificar los lípidos unidos y determinar si la presencia de los mismos modificaría la estructura de GumB. Para obtener GumB-acilada membranas totales de XcFC2 sobreexpresando la proteína se incubaron con el detergente N-Lauril Sarcosil que solubiliza selectivamente las proteínas de membrana interna [86]. Posteriormente, la membrana externa fue solubilizada con el detergente DDM para extraer a GumB-acilada (Figura 7.1). El extracto obtenido a partir de la solubilización de la membrana externa se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular (Figura 7.18). Mediante espectrometría de masa se intentaron identificar los lípidos unidos a GumB-acilada. Sin embargo, luego de la digestión con tripsina no se observó el péptido correspondiente al extremo N-terminal. Pero se identificó la proteína Ax21 en la misma banda que GumB-acilada. El hecho de que luego de varios pasos de purificación se haya encontrado otra proteína junto a GumB-acilada sugiere una posible interacción entre estas proteínas.

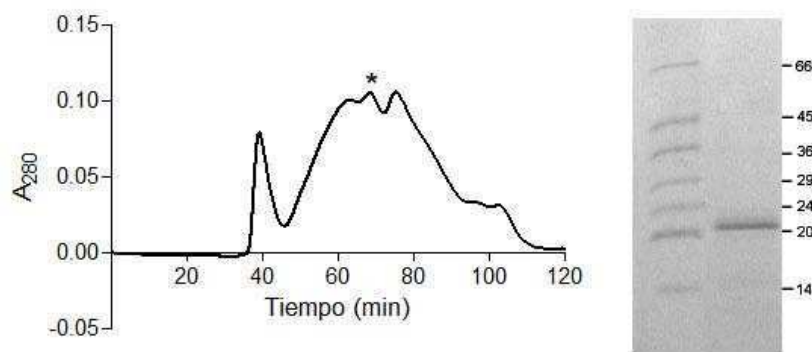


Figura 7.18. Purificación de GumB-acilada. El extracto obtenido luego de la solubilización de membrana externa de XcFC2/pBGumB se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular; con asterisco se marca el pico correspondiente a GumB-acilada. En el SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue* se observa a GumB-acilada obtenida luego de la purificación. A la derecha del gel se indican las bandas del marcador de masa molecular en kDa.

En *Xanthomonas oryzae oryzae* (Xoo) se ha visto que Ax21 es una proteína con actividad dual, además de ser un activador de la inmunidad innata en la planta, es un mediador de *quorum sensing* (QS) en *Xanthomonas* [92-93]. Ax21 se identificó en el sobrenadante de medio de cultivo de Xoo y se vio que activa la inmunidad en la planta de arroz al unirse al receptor XA21 [92]. Ax21 es sintetizada como un precursor con un péptido señal que luego es clivado para liberar la proteína al medio extracelular (Figura

7.19a). Ax21 se encuentra presente en todas las especies de *Xanthomonas* secuenciadas con una identidad de secuencia de 90-98 %. Se observó que un péptido sintético de 17 aminoácidos conteniendo la tirosina 22 sulfatada (AxYs22) es suficiente para disparar la inmunidad mediada por XA21. La identidad de secuencia entre estos péptidos entre las distintas *Xanthomonas* es del 100 %. Para la activación de la inmunidad mediada por XA21 se han identificado 10 genes en *Xoo*. Los genes *raxA*, *B* y *C* codifican para un sistema de secreción tipo I [94]. *raxP* y *raxQ* codifican una ATP sulforilasa y una APS quinasa, respectivamente, las que producen 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato, donador universal de grupos sulfhidrilo [95]. *raxST* codifica para una sulfotransferasa, la cual se ha demostrado que puede utilizar a Ax21 como sustrato [96]. Y por último, genes que codifican para dos sistemas de dos componentes, *raxR/H* y *phoP/Q* [97-98]. Sobrenadantes purificados de *Xoo* con actividad Ax21 pueden inducir la expresión de los genes *rax* en *Xoo*, sugiriendo que Ax21 está involucrada en QS [93]. Se ha demostrado que Ax21 controla la expresión de genes involucrados en movilidad, en la producción de xantano y en el metabolismo de c-di-GMP (Figura 7.19b). RaxH sería el receptor de Ax21, sin embargo RaxH se encuentra localizada en membrana interna con su dominio sensor en el periplasma, hasta el momento no se conoce como Ax21 sería capaz de ingresar al periplasma.

(a)

MKTSLLALGLLLAALPFAASA **AENLSYNFVEGDYVRTPT** EGRDADGWGVKAS
 YAFAPNFHVFGDYSKQNADDNDSVFESSNSDFQQWGVGVGYNHEIATSTD
 FVARVAYRKLDLDTPNISFDGYSVEAGLRNAFGEHFEVYALAGYEDFSKGRG
 VDLGDNFYGRGLGAQVKLNQNWINGDIRMDGDGNKEWSVGPFRFSW

(b)

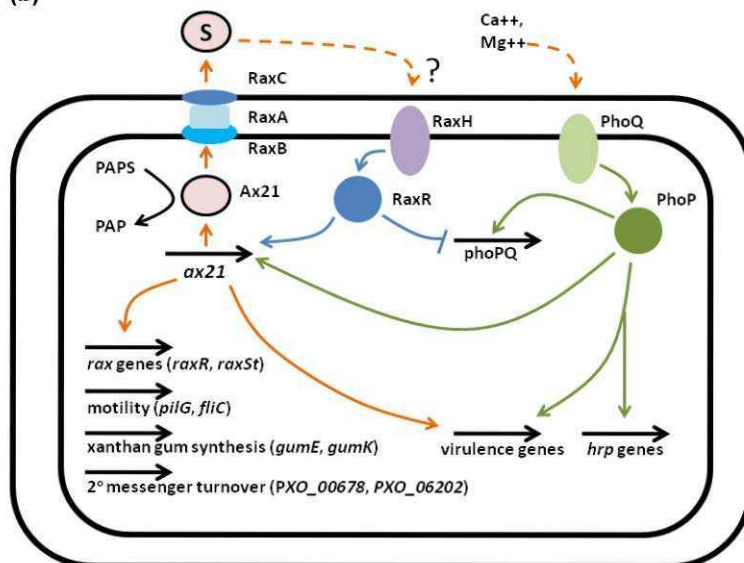


Figura 7.19. Ax21 es un mediador de QS en *Xoo*. (a) Ax21 es sintetizado como precursor con péptido señal (sombreado en gris). Con recuadro se señala el péptido mínimo necesario para disparar la inmunidad innata mediada por XA21, la tirosina que debe encontrarse sulfatada para que el péptido sea funcional se encuentra subrayada.

(b) Modelo de QS mediado por Ax21. Ax21 es transportada por el sistema de secreción tipo I, RaxABC. Se propuso que la histidina quinasa RaxH une a Ax21 sulfatada, activando al regulador de respuesta RaxR. Por otro lado, la histidina quinasa PhoQ percibe cambios en la concentración de iones extracelulares y activa al regulador de respuesta PhoP que activa la expresión de Ax21 y de genes de virulencia. Tomado de Ronald 2011 [99].

A pesar de que no fue posible determinar los lípidos unidos a GumB-acilada ni cristalizar a la misma, se identificó una proteína con la cual GumB podría interactuar. Para corroborar esta posible interacción es necesario realizar ensayos adicionales.

7.4. GumB no se encontraría expuesta en la superficie celular

En el caso que GumB fuera la encargada de exportar el xantano, la misma debería atravesar la membrana externa, exponiendo residuos al exterior celular. Con el fin de determinar si GumB se encuentra expuesta en la superficie celular se analizó la susceptibilidad de la proteína frente a proteólisis con proteinasa K en células de XcFC2 enteras y permeabilizadas. En la Figura 7.20 se observa que GumB es susceptible a la proteólisis con proteinasa K en células permeabilizadas pero no en células enteras. Estos resultados estarían indicando que GumB no se encuentra expuesta en la superficie celular o que en el caso que logre atravesar la membrana externa sólo pocos residuos se encuentran expuestos, no pudiendo éstos ser digeridos por la proteasa.

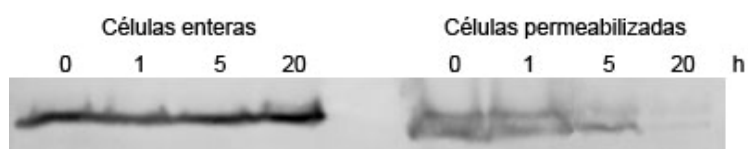


Figura 7.20. Proteólisis de células de XcFC2. Inmunodetección de células enteras y permeabilizadas de XcFC2 luego de ser digeridas con proteinasa K revelado con anticuerpos contra GumB.

7.5. GumB forma un complejo macromolecular

La formación de complejos macromoleculares para el transporte de polisacáridos se ha visto en varios sistemas [28, 37, 100], por tal motivo se analizó la posibilidad de que GumB forme parte de uno. Mediante ensayos de entrecruzamiento químico *in vivo* con DSP se observó que GumB forma un complejo incapaz de ingresar al gel de SDS-PAGE, pero al revertir el entrecruzamiento con el agente reductor DTT se observa nuevamente la especie monomérica de GumB (Figura 7.21a). Estos resultados indican que GumB forma parte de un complejo con una masa molecular mayor a 200 kDa. Una técnica especialmente utilizada para el estudio de complejos de membrana y la identificación de las subunidades que lo componen es la electroforesis azul nativa. Esta técnica permite la separación de complejos de proteínas de membrana en forma nativa y enzimáticamente activos. En primer lugar, los complejos proteicos son solubilizados con un detergente no desnaturizante y neutro. La

separación de los complejos se consigue mediante la adición de *Coomassie blue* G250, el cual se une a la superficie de las proteínas otorgándoles carga negativa, permitiendo así la separación de los complejos por masa molecular. Las subunidades que componen los complejos pueden resolverse mediante un segundo paso electroforético. Los complejos son desnaturalizados en presencia de SDS y DTT, y luego son sometidos a SDS-PAGE para separar las subunidades del sistema por masa molecular. Finalmente, las proteínas que forman parte del complejo pueden ser identificadas mediante espectrometría de masa.

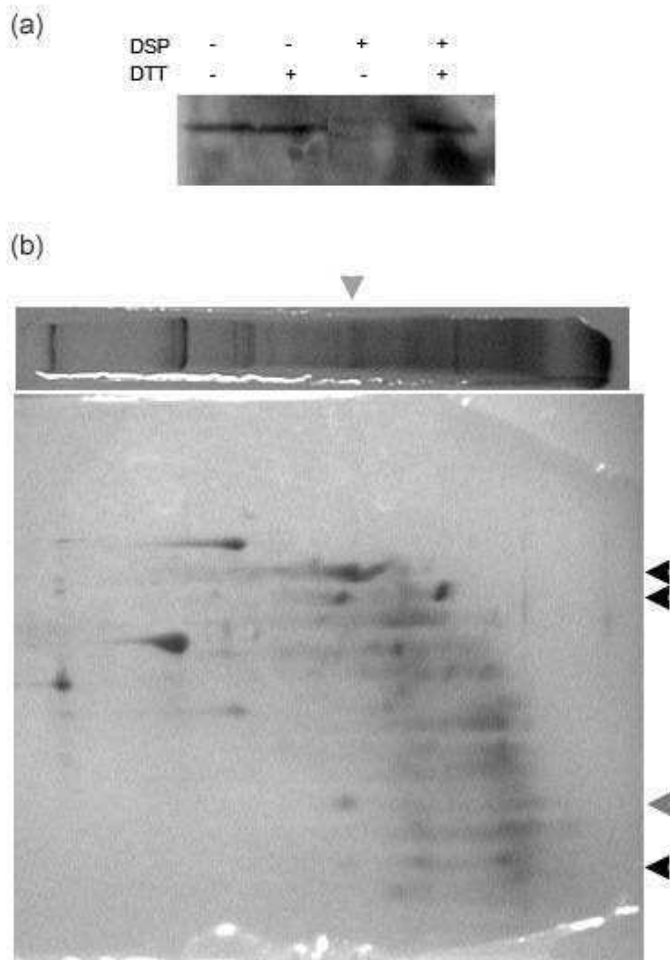


Figura 7.21. GumB forma parte de un complejo macromolecular.

(a) Entrecruzamiento químico *in vivo* con DSP. Inmunodetección con anticuerpos contra GumB. **(b)** Electroforesis azul nativa y segunda dimensión en gel desnaturalizante. En la parte superior de la figura se muestra una calle del gel nativo en el cual se sembraron membranas de XcFC2 solubilizadas con DDM. La flecha indica el complejo identificado mediante inmunodetección con anticuerpos anti-GumB. La segunda dimensión desnaturalizante se muestra en la parte inferior de la figura. La flecha en gris indica a GumB identificada mediante inmunodetección con anticuerpos anti-GumB. Las demás flechas señalan las proteínas del complejo que se identificaron mediante espectrometría de masa.

Para llevar a cabo el ensayo de electroforesis azul nativa en primer lugar se procedió a la solubilización de las membranas de XcFC2 con los detergentes Triton X-100, octilglucósido y DDM. Encontramos que GumB se solubiliza con 72 mM de DDM a 4 °C incubando 18 h. Las membranas de XcFC2 solubilizadas se corrieron en un gel nativo (Figura 7.21b), y posteriormente una segunda dimensión desnaturalizante para separar los complejos formados. Se identificó a GumB mediante inmunodetección tanto en el gel nativo como en la segunda dimensión. Por espectrometría de masa se

confirmó la identidad de GumB y además se identificaron cuatro proteínas como miembros del complejo:

- Piruvato deshidrogenasa E1: Es la primera enzima del complejo piruvato deshidrogenasa, el cual transforma piruvato en acetil-CoA. La acetil-CoA se puede utilizar en el ciclo del ácido cítrico para llevar a cabo la respiración celular, por lo tanto la piruvato deshidrogenasa es un complejo clave que conecta la vía metabólica de la glicólisis con el ciclo del ácido cítrico liberando energía en forma de NADH.
- 2-oxoglutarato deshidrogenasa E1: Componente del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa. Este complejo es clave en el ciclo del ácido cítrico convirtiendo 2-oxoglutarato en succinil-CoA. La actividad de este complejo se encuentra fuertemente regulada y es un determinante importante del flujo metabólico a través del ciclo del ácido cítrico.
- Polinucleótido fosforilasa (PNPasa): es una enzima bifuncional con actividad de exoribonucleasa y oligonucleótido polimerasa. Se encuentra involucrada en el procesamiento y degradación de ARN mensajero.
- ExbB: El complejo proteico ExbB-ExbD-TonB se encuentra anclado en la membrana interna y está involucrado en la energización del transporte en la membrana externa. Por otro lado, también se ha descrito que este complejo puede formar parte de un sistema de transducción de señales.

Las enzimas piruvato y 2-oxoglutarato deshidrogenasas podrían estar involucradas en la regulación de la síntesis del xantano. En *Staphylococcus epidermis* se ha visto que la inactivación del ciclo del ácido cítrico incrementa la síntesis del polisacárido intracelular de adhesión y de N-acetilglucosamina [101]. Los autores sugieren que la bacteria percibe cambios en el ambiente extracelular mediante alteraciones del ciclo del ácido cítrico. De esta manera, el ciclo del ácido cítrico actúa como un sistema de transducción de señales que traduce estímulos externos en señales internas. Se ha encontrado que la 2-oxoglutarato deshidrogenasa interacciona con componentes de la síntesis y secreción del CPS tipo II en *E. coli* [37].

La PNPasa también podría estar involucrada en la regulación de la síntesis de xantano o en la expresión de proteínas de membrana. En *E. coli* se ha visto que la PNPasa regula negativamente al operón *pgaABCD* involucrado en la síntesis de

N-acetilglucosamina [102]. En *E. coli* además, se observó que la PNPasa controla los niveles de pequeños ARN no codificantes que son necesarios para la expresión de proteínas de membrana externa [103].

Por otro lado, ExbB podría estar implicada, junto a TonB y ExbD, en el aporte de energía a la membrana externa para posibilitar la secreción del xantano. Sin embargo, hasta el momento sólo se ha descrito este sistema para aportar energía a la membrana externa en la importación pero no para la exportación de sustancias. Por otro lado, este sistema también podría estar involucrado en la regulación ya que se ha visto que estos sistemas actúan como transductores de señales [104]. En la banda que se identificó ExbB también se encontraron señales compatibles con la secuencia de GumB, debido probablemente a una incompleta desnaturalización del complejo. Este resultado podría estar indicando que de las proteínas identificadas, GumB interacciona directamente con ExbB.

8. Discusión

Previamente, se demostró que GumB se encuentra involucrada en la síntesis del polisacárido xantano [8, 48]. Una cepa mutante en *gumB* no produce polisacárido *in vivo* pero es capaz de sintetizar unidades repetitivas *in vitro*. Además, se demostró su localización en membrana, especialmente en membrana externa, y su carácter de lipoproteína [48]. En esta tesis se profundizó en el análisis estructural de GumB y en la identificación de potenciales proteínas interactuantes.

La sobreexpresión de GumB en cantidades suficientes para ensayos estructurales se logró expresando la proteína en forma soluble en el citoplasma al reemplazar su péptido señal por una etiqueta de histidinas. La cristalización de la proteína nativa y del derivado de selenio-metionina permitió resolver la estructura cristalográfica mediante difracción de rayos X. Esta estructura mostró que GumB es un tetrámero en el cristal, y que cada monómero presenta dos dominios, los cuales poseen homología estructural con los dominios D1 y D2 de Wza, lipoproteína de membrana externa involucrada en la secreción de CPS tipo I.

Dong y colaboradores [26] observaron que el octámero de Wza forma un canal en el cual los dominios D4 de cada monómero son los que atraviesan la membrana externa. Mediante el alineamiento de los dominios D2 de His-GumB en el octámero de Wza fue posible construir un modelo de Wza en su conformación abierta alcanzando en su punto más angosto un diámetro de aproximadamente 26 Å, mientras que la estructura de Wza reportada presenta un diámetro de aproximadamente 6 Å. Este modelo de conformación abierta de Wza permitiría el pasaje del CPS al exterior celular. El análisis estructural de este modelo puede ser relevante para el diseño de drogas que arresten a Wza en su conformación cerrada y de esta manera, inhiban la secreción de CPS generando que la bacteria sea más susceptible al ataque por el sistema inmunológico humano.

Debido a que GumB no posee los dominios D3 y D4 presentes en Wza, se realizaron búsquedas por homología de secuencia de estos dominios en el genoma de *Xanthomonas*, sin embargo no fue posible encontrar ninguna proteína homóloga. En el caso de la síntesis y secreción del CPS tipo IV, la OPX involucrada (GfcC) presenta homología estructural con los dominios D2 a D4 de Wza. En este caso, el dominio D4 no forma un poro como en el caso de Wza sino que se pliega junto con D3. El poro en la membrana externa para la secreción del polímero es formado por otra proteína del tipo barril β [89]. Probablemente, la secreción del xantano dependa de otra proteína de

membrana externa como en este último caso, lo que implica una modificación al modelo actualmente propuesto (Figura 4.5). Los resultados obtenidos indicarían que las proteínas codificadas por el operón *gum* son necesarias pero no suficientes para la síntesis/secreción del xantano.

El análisis del estado oligomérico de GumB en solución mostró que es un tetrámero y que su organización sería la misma que la observada en el cristal. El estado oligomérico de GumB *in vivo* no pudo determinarse mediante entrecruzamiento químico porque GumB se entrecruzaría con otras proteínas formando complejos de alto peso molecular. El tetrámero de GumB mostró una región electropositiva, que podría estar involucrada en la interacción con el polisacárido mediante sus cargas negativas. Este tipo de interacción electrostática se ha observado entre AlgE, proteína de membrana externa tipo barril β , y el polisacárido alginato [90]. Estas regiones electropositivas de GumB a su vez coinciden con una gran cavidad en forma de canaleta que permitiría acomodar un fragmento de la molécula de xantano. Cada tetrámero de GumB presenta dos de estas regiones electropositivas lo cual le permitiría interaccionar con dos moléculas de xantano nacientes y direccionarlas a la membrana externa. Mediante dicroísmo circular se observó que el xantano produce un incremento en la señal, pero no se encontró que modifique la estabilidad térmica de la proteína. Tampoco se observó que el xantano ejerza ningún efecto protector frente a la digestión con proteasas. Mutaciones a alanina de residuos básicos localizados en las cavidades electropositivas de GumB provocaron una reducción en la cantidad de xantano producido, indicando que los mismos son necesarios para que GumB sea funcional. Estas mutaciones generaron una disminución de aproximadamente el 50 % en la cantidad de polímero producido, lo cual puede atribuirse a una interacción más débil entre GumB y el polímero o a una disminución en la estabilidad de GumB. La realización de un ensayo de competencia expresando las proteínas mutadas sobre un fondo salvaje, como así también el análisis estructural de estas proteínas mediante dicroísmo circular y/o cristalografía de rayos X podrían dar más información en cuanto al efecto de estas mutaciones sobre GumB.

En base a estas observaciones, se construyeron dos posibles modelos en los cuales GumB participaría para permitir la secreción del xantano. Según lo observado por cristalografía de rayos X, cada tetrámero de GumB poseería dos sitios de unión a xantano pero estas cavidades no se encontrarían cerradas. Una posibilidad es que se unan tetrámeros de GumB entre sí para formar una cavidad cerrada (Figura 8.1a). Lo cuestionable de este modelo es que se podrían generar infinitas cavidades por unión

de infinitos tetrámeros. Otra posibilidad, es que las dos cavidades que posee el tetrámero de GumB sean cerradas por otra proteína. Ensayos de proteólisis en células de XcFC2 mostraron que GumB no se encontraría expuesta en la superficie celular, con lo cual esta proteína adicional podría a su vez ser la encargada de formar el poro para atravesar la membrana externa (Figura 8.1b). Las cavidades observadas en GumB poseen una dirección diagonal lo que permitiría acompañar las vueltas propias de la cadena del xantano. Sin embargo, se ha postulado que las moléculas de xantano formarían una doble hélice y GumB solo podría acomodar de a una cadena simple por cavidad. Debido a que GumB poseería dos sitios de unión para cadenas simples de xantano, es probable que éstas se junten formando una doble hélice luego de subir por las cavidades de GumB. De esta manera, el xantano sería secretado en forma de doble hélice (Figura 8.1). Según estos modelos planteados, GumB interactuaría con moléculas simples de xantano explicando por qué no se pudo detectar interacción entre His-GumB y xantano mediante ensayos biofísicos. Sería importante poner más esfuerzo en la síntesis química de la unidad repetitiva que compone al xantano para determinar una posible interacción entre His-GumB y la unidad repetitiva, y analizar si la misma es afectada por las mutaciones en residuos básicos introducidas en GumB.

Con el objetivo de identificar los lípidos unidos a GumB, se sobreexpresó GumB-acilada manteniendo su péptido señal, que es reconocido por peptidasa señal II. El agregado de una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal de la proteína para facilitar la purificación afectó su funcionalidad. Mediante ensayos de complementación de una cepa mutante en *gumB* se observó que la complementación en *trans* con esta proteína no restaura el fenotipo productor de xantano. Este resultado podría estar indicando que GumB interactúa a través de su extremo C-terminal con otra proteína permitiendo así la secreción del polímero. Por otro lado, en el caso que GumB forme un tetrámero (como lo hace His-GumB) u otro tipo de oligómero *in vivo*, la etiqueta de histidinas podría interferir en la formación de los oligómeros afectando así la funcionalidad de GumB. Por lo tanto, GumB-acilada se sobreexpresó sin etiquetas para no afectar su funcionalidad. Luego de varios pasos de purificación, se observó mediante SDS-PAGE, una única banda con masa molecular compatible con GumB; sin embargo, al analizar esta banda por espectrometría de masa se identificó junto con GumB a la proteína Ax21. Esta proteína fue inicialmente descrita en *Xanthomonas oryzae oryzae* como ligando del receptor XA21 en planta de arroz [94]. La unión de Ax21 a este receptor activa el proceso de inmunidad innata en la planta. Recientemente, se observó que además actúa como factor de QS, regulando la

expresión del 10 % del genoma al comparar la expresión de genes a distintas densidades celulares [93]. Los genes regulados identificados codifican para proteínas involucradas en el recambio de c-di-GMP, en la síntesis de polisacárido, en la quimiotaxis y para proteínas de flagelo. Se ha propuesto que el receptor de Ax21 en *Xoo* es RaxH; una cepa mutante en *raxH* es incapaz de formar biofilm y no restaura el fenotipo por el agregado de Ax21, indicando que la bacteria es incapaz de sensar a Ax21. RaxH es una quinasa de membrana interna cuyo dominio sensor se localiza en el periplasma sin embargo, hasta el momento se desconoce cómo Ax21 ingresa al periplasma o cómo RaxH sensa la presencia de Ax21. Considerando una posible interacción entre Ax21 y GumB, es probable que GumB actué como receptor de Ax21 y sea quien transmita la señal de unión de Ax21 al dominio sensor de RaxH. Con el fin de identificar qué efecto tiene Ax21 sobre la producción de xantano y en la transcripción del operón *gum* actualmente estamos realizando la mutante correspondiente.

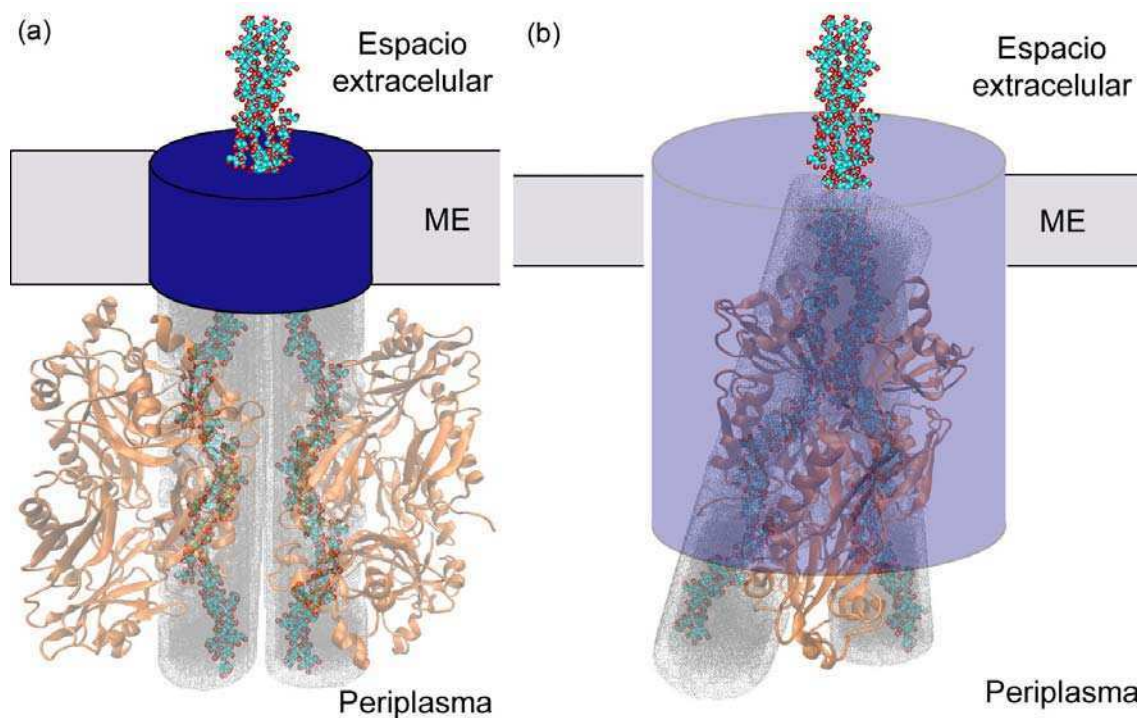


Figura 8.1. Modelos de la participación de GumB en la secreción del xantano. (a) Dos tetrámeros de GumB (naranja) enfrentados formarían una cavidad cerrada para acomodar dos cadenas simples de xantano. El poro en la membrana externa lo formaría otra proteína (azul). **(b)** El tetrámero de GumB (naranja) podría funcionar como dominio adicional de una proteína de membrana externa (violeta). Ambas cavidades del tetrámero de GumB acomodarían una molécula simple de xantano. En este caso, las cavidades estarían delimitadas por GumB y la proteína de membrana externa, esta última, además, formaría el poro en la membrana externa.

Mediante electroforesis azul nativa se encontró que GumB interaccionaría directamente con la proteína de membrana interna ExbB. Esta proteína junto a ExbD y TonB son capaces de energizar a receptores de membrana externa dependientes de TonB (TBDR, *TonB-dependent receptor*) para permitir el transporte de moléculas. Por otro lado, el complejo formado por TBDR y TonB-ExbB-ExbD es capaz de actuar como un sistema de transducción de señales activando la transcripción de genes blanco [104]. Estos receptores, que se encuentran asociados a la patogenicidad y que son importantes para la percepción de señales ambientales, se encuentran sobrerrepresentados en cepas de *Xanthomonas*, permitiéndoles adaptarse a los complejos y cambiantes ambientes a los que estas bacterias deben enfrentarse en su hospedador [105]. Teniendo en cuenta los procesos en los que se encuentra involucrado el sistema TonB-ExbB-ExbD, es posible que GumB interaccione con este sistema para obtener la energía necesaria para el transporte del polisacárido al exterior celular o para regular la síntesis de xantano. Si la primera hipótesis fuera cierta, explicaría de dónde proviene la energía necesaria para la síntesis y exportación del xantano; sin embargo, hasta el momento sólo se ha observado la utilización de este sistema para la importación de moléculas pero no para la exportación. Además, mediante electroforesis azul nativa también se identificaron otras proteínas con características regulatorias, con lo cual la segunda hipótesis pareciera tener más fuerza. Entre las proteínas identificadas en el complejo se encuentra PNPasa, ribonucleasa involucrada en la regulación de pequeños ARN no codificantes (sRNAs, *small noncoding RNAs*) que a su vez regulan transcritos de proteínas de membrana externa [103]. En *E. coli* se observó que PNPasa regula a los sRNAs MicA y RybB, los cuales a su vez regulan a las porinas de membrana externa OmpA, y OmpC y OmpW, respectivamente. Se ha visto que los sRNAs juegan un papel importante en el comportamiento fisiológico de la bacteria, luego de sensar cambios en el ambiente los sRNAs son los encargados de transmitir las señales mediante la interacción con mRNAs o con proteínas. Se ha visto que los sRNAs están involucrados en diferentes procesos que están asociados con la formación de biofilm, como lo es la producción de polisacárido. Además, se observó que la mutante en *pnp* posee alterado su perfil de proteínas de membrana externa indicando que regula a distintas proteínas de membrana. Por otro lado, se ha observado que PNPasa regula la expresión del transcripto *pgaABCD*, que codifica para las proteínas necesarias para la síntesis del polisacárido N-acetilglucosamina [102].

Además de ExbB y PNPasa, se identificaron dos enzimas involucradas en el ciclo del ácido cítrico, las piruvato y 2-oxoglutarato deshidrogenasas. La oxoglutarato deshidrogenasa también ha sido encontrada asociada con componentes de la síntesis de CPS tipo II en *E. coli* [37]. En *S. epidermis* se observó que al inactivar el ciclo del ácido cítrico se producen cambios transcripcionales que direccionan el flujo de carbono hacia la síntesis de N-acetilglucosamina, precursor del polisacárido intracelular de adhesión [101]. Los autores proponen que la bacteria es capaz de sensar cambios en el ambiente mediante el ciclo del ciclo del ácido cítrico y transmitir estas señales en cambios transcripcionales.

En resumen, los ensayos de entrecruzamiento químico *in vivo* y de electroforesis azul nativa mostraron que GumB forma parte de un complejo de alto peso molecular. Logramos separar los componentes del complejo e identificar a algunos de ellos. Las proteínas identificadas sugieren la presencia de mecanismos de regulación de la síntesis del xantano del cual GumB formaría parte. Cabe destacar que no fue posible la identificación de todos los componentes del complejo, sino solo de aquellas proteínas que se encontraron en cantidades suficientes para ser detectadas por tinción con *Coomassie blue*. En principio, con los datos obtenidos hasta el momento GumB interaccionaría directamente con ExbB, y de esta manera podría estar regulando la transcripción del operón *gum*. Para corroborar esta hipótesis se está realizando la mutante de *Xanthomonas* en ExbB para determinar si se encuentra afectada la producción de xantano y/o el nivel de transcripción del operón *gum*.

Los resultados bioquímicos y estructurales presentados en esta tesis contribuyen a comprender cómo el transporte de macromoléculas al exterior celular es llevado a cabo. En particular, se ha profundizado en el análisis de la síntesis/secreción del xantano. El conocimiento adquirido podrá ser utilizado para el desarrollo de nuevas drogas que inhiban la secreción de este factor de virulencia. Asimismo, el conocimiento detallado del mecanismo involucrado en la síntesis/secreción del xantano es de gran utilidad para la modificación de las propiedades del mismo, con su consecuente aplicación en la industria.

9. Referencias

1. Costerton, J.W., R.T. Irvin, and K.J. Cheng, *The role of bacterial surface structures in pathogenesis*. Crit Rev Microbiol, 1981. **8**(4): p. 303-38.
2. Webb, S.A. and C.M. Kahler, *Bench-to-bedside review: Bacterial virulence and subversion of host defences*. Crit Care, 2008. **12**(6): p. 234.
3. Freitas, F., V.D. Alves, and M.A. Reis, *Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications*. Trends Biotechnol, 2011. **29**(8): p. 388-98.
4. Nwodo, U.U., E. Green, and A.I. Okoh, *Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(11): p. 14002-15.
5. Denny, T.P., *Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis*. Annu Rev Phytopathol, 1995. **33**: p. 173-97.
6. D'Haese, W. and M. Holsters, *Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity*. Trends Microbiol, 2004. **12**(12): p. 555-61.
7. Yun, M.H., P.S. Torres, M. El Oirdi, L.A. Rigano, R. Gonzalez-Lamothe, M.R. Marano, A.P. Castagnaro, M.A. Dankert, K. Bouarab, and A.A. Vojnov, *Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition*. Plant Physiol, 2006. **141**(1): p. 178-87.
8. Katzen, F., D.U. Ferreira, C.G. Oddo, M.V. Ielmini, A. Becker, A. Puhler, and L. Ielpi, *Xanthomonas campestris pv. campestris gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence*. J Bacteriol, 1998. **180**(7): p. 1607-17.
9. Dunger, G., V.M. Relling, M.L. Tondo, M. Barreras, L. Ielpi, E.G. Orellano, and J. Ottado, *Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to Xanthomonas epiphytic survival*. Arch Microbiol, 2007. **188**(2): p. 127-35.
10. Remminghorst, U. and B.H. Rehm, *Bacterial alginates: from biosynthesis to applications*. Biotechnol Lett, 2006. **28**(21): p. 1701-12.
11. Sutherland, I.W., *Novel and established applications of microbial polysaccharides*. Trends Biotechnol, 1998. **16**(1): p. 41-6.
12. Gerlach, R.G. and M. Hensel, *Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens*. Int J Med Microbiol, 2007. **297**(6): p. 401-15.
13. Collins, R.F. and J.P. Derrick, *Wza: a new structural paradigm for outer membrane secretory proteins?* Trends Microbiol, 2007. **15**(3): p. 96-100.
14. Keiski, C.L., M. Harwich, S. Jain, A.M. Neculai, P. Yip, H. Robinson, J.C. Whitney, L. Riley, L.L. Burrows, D.E. Ohman, and P.L. Howell, *AlgK is a TPR-containing protein and the periplasmic component of a novel exopolysaccharide secretin*. Structure, 2010. **18**(2): p. 265-73.
15. Whitfield, C., *Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in Escherichia coli*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 39-68.
16. Cuthbertson, L., I.L. Mainprize, J.H. Naismith, and C. Whitfield, *Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria*. Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(1): p. 155-77.
17. Cuthbertson, L., V. Kos, and C. Whitfield, *ABC transporters involved in export of cell surface glycoconjugates*. Microbiol Mol Biol Rev, 2010. **74**(3): p. 341-62.
18. Blatch, G.L. and M. Lasse, *The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions*. Bioessays, 1999. **21**(11): p. 932-9.
19. Paulsen, I.T., A.M. Beness, and M.H. Saier, Jr., *Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria*. Microbiology, 1997. **143** (Pt 8): p. 2685-99.
20. Raetz, C.R. and C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 635-700.

21. Drummelsmith, J. and C. Whitfield, *Gene products required for surface expression of the capsular form of the group 1 K antigen in Escherichia coli (O9a:K30)*. Mol Microbiol, 1999. **31**(5): p. 1321-32.
22. Drummelsmith, J. and C. Whitfield, *Translocation of group 1 capsular polysaccharide to the surface of Escherichia coli requires a multimeric complex in the outer membrane*. Embo J, 2000. **19**(1): p. 57-66.
23. Nesper, J., C.M. Hill, A. Paiment, G. Harauz, K. Beis, J.H. Naismith, and C. Whitfield, *Translocation of group 1 capsular polysaccharide in Escherichia coli serotype K30. Structural and functional analysis of the outer membrane lipoprotein Wza*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 49763-72.
24. Marciano, D.K., M. Russel, and S.M. Simon, *An aqueous channel for filamentous phage export*. Science, 1999. **284**(5419): p. 1516-9.
25. Nouwen, N., N. Ranson, H. Saibil, B. Wolpensinger, A. Engel, A. Ghazi, and A.P. Pugsley, *Secretin PulD: association with pilot PulS, structure, and ion-conducting channel formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 8173-7.
26. Dong, C., K. Beis, J. Nesper, A.L. Brunkan-Lamontagne, B.R. Clarke, C. Whitfield, and J.H. Naismith, *Wza the translocon for E. coli capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein*. Nature, 2006. **444**(7116): p. 226-9.
27. Ford, R.C., A.L. Brunkan-LaMontagne, R.F. Collins, B.R. Clarke, R. Harris, J.H. Naismith, and C. Whitfield, *Structure-function relationships of the outer membrane translocon Wza investigated by cryo-electron microscopy and mutagenesis*. J Struct Biol, 2009. **166**(2): p. 172-82.
28. Collins, R.F., K. Beis, C. Dong, C.H. Botting, C. McDonnell, R.C. Ford, B.R. Clarke, C. Whitfield, and J.H. Naismith, *The 3D structure of a periplasm-spanning platform required for assembly of group 1 capsular polysaccharides in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(7): p. 2390-5.
29. Wugeditsch, T., A. Paiment, J. Hocking, J. Drummelsmith, C. Forrester, and C. Whitfield, *Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assembly of group 1 capsular polysaccharides in Escherichia coli*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2361-71.
30. Kong, L., L. Harrington, Q. Li, S. Cheley, B.G. Davis, and H. Bayley, *Single-molecule interrogation of a bacterial sugar transporter allows the discovery of an extracellular inhibitor*. Nat Chem, 2013. **5**(8): p. 651-9.
31. Rigg, G.P., B. Barrett, and I.S. Roberts, *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, 1998. **144** (Pt 10): p. 2905-14.
32. Whitfield, C. and I.S. Roberts, *Structure, assembly and regulation of expression of capsules in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1999. **31**(5): p. 1307-19.
33. Petit, C., G.P. Rigg, C. Pazzani, A. Smith, V. Sieberth, M. Stevens, G. Boulnois, K. Jann, and I.S. Roberts, *Region 2 of the Escherichia coli K5 capsule gene cluster encoding proteins for the biosynthesis of the K5 polysaccharide*. Mol Microbiol, 1995. **17**(4): p. 611-20.
34. Arrecubieta, C., T.C. Hammarton, B. Barrett, S. Chareonsudjai, N. Hodson, D. Rainey, and I.S. Roberts, *The transport of group 2 capsular polysaccharides across the periplasmic space in Escherichia coli. Roles for the KpsE and KpsD proteins*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 4245-50.
35. Silver, R.P., K. Prior, C. Nsahlai, and L.F. Wright, *ABC transporters and the export of capsular polysaccharides from gram-negative bacteria*. Res Microbiol, 2001. **152**(3-4): p. 357-64.
36. Bronner, D., V. Sieberth, C. Pazzani, A. Smith, G. Boulnois, I. Roberts, B. Jann, and K. Jann, *Synthesis of the K5 (group II) capsular polysaccharide in*

- transport-deficient recombinant Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 1993. **113**(3): p. 279-84.
37. McNulty, C., J. Thompson, B. Barrett, L. Lord, C. Andersen, and I.S. Roberts, *The cell surface expression of group 2 capsular polysaccharides in Escherichia coli: the role of KpsD, RhsA and a multi-protein complex at the pole of the cell*. Mol Microbiol, 2006. **59**(3): p. 907-22.
 38. Pazzani, C., C. Rosenow, G.J. Boulnois, D. Bronner, K. Jann, and I.S. Roberts, *Molecular analysis of region 1 of the Escherichia coli K5 antigen gene cluster: a region encoding proteins involved in cell surface expression of capsular polysaccharide*. J Bacteriol, 1993. **175**(18): p. 5978-83.
 39. Silver, R.P., W. Aaronson, and W.F. Vann, *Translocation of capsular polysaccharides in pathogenic strains of Escherichia coli requires a 60-kilodalton periplasmic protein*. J Bacteriol, 1987. **169**(12): p. 5489-95.
 40. Oglesby, L.L., S. Jain, and D.E. Ohman, *Membrane topology and roles of Pseudomonas aeruginosa Alg8 and Alg44 in alginate polymerization*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 6): p. 1605-15.
 41. Remminghorst, U. and B.H. Rehm, *In vitro alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(1): p. 298-305.
 42. Rehm, B.H., G. Boheim, J. Tommassen, and U.K. Winkler, *Overexpression of algE in Escherichia coli: subcellular localization, purification, and ion channel properties*. J Bacteriol, 1994. **176**(18): p. 5639-47.
 43. Jansson, P.E., L. Kenne, and B. Lindberg, *Structure of extracellular polysaccharide from Xanthomonas campestris*. Carbohydr Res, 1975. **45**: p. 275-82.
 44. Becker, A., F. Katzen, A. Puhler, and L. Ielpi, *Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective*. Appl Microbiol Biotechnol, 1998. **50**(2): p. 145-52.
 45. Barreras, M., S.R. Salinas, P.L. Abdian, M.A. Kampel, and L. Ielpi, *Structure and mechanism of GumK, a membrane-associated glucuronosyltransferase*. J Biol Chem, 2008. **283**(36): p. 25027-35.
 46. Ielpi, L., R.O. Couso, and M.A. Dankert, *Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in Xanthomonas campestris*. J Bacteriol, 1993. **175**(9): p. 2490-500.
 47. Salinas, S.R., M.I. Bianco, M. Barreras, and L. Ielpi, *Expression, purification and biochemical characterization of GumI, a monotopic membrane GDP-mannose:glycolipid 4- β -D-mannosyltransferase from Xanthomonas campestris pv. campestris*. Glycobiology, 2011. **21**(7): p. 903-13.
 48. Galvan, E.M., M.V. Ielmini, Y.N. Patel, M.I. Bianco, E.A. Franceschini, J.C. Schneider, and L. Ielpi, *Xanthan chain length is modulated by increasing the availability of the polysaccharide copolymerase protein GumC and the outer membrane polysaccharide export protein GumB*. Glycobiology, 2013. **23**(2): p. 259-72.
 49. Vorholter, F.J., S. Schneiker, A. Goesmann, L. Krause, T. Bekel, O. Kaiser, B. Linke, T. Patschkowski, C. Ruckert, J. Schmid, V.K. Sidhu, V. Sieber, A. Tauch, S.A. Watt, B. Weisshaar, A. Becker, K. Niehaus, and A. Puhler, *The genome of Xanthomonas campestris pv. campestris B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis*. J Biotechnol, 2008. **134**(1-2): p. 33-45.
 50. Ielmini, M.V., *Genética molecular y bioquímica de la síntesis de exopolisacáridos bacterianos*, in *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*. 2007, Universidad de Buenos Aires.

51. Tokuda, H., *Biogenesis of outer membranes in Gram-negative bacteria*. Biosci Biotechnol Biochem, 2009. **73**(3): p. 465-73.
52. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
53. Wilkins, M.R., E. Gasteiger, A. Bairoch, J.C. Sanchez, K.L. Williams, R.D. Appel, and D.F. Hochstrasser, *Protein identification and analysis tools in the ExPASy server*. Methods Mol Biol, 1999. **112**: p. 531-52.
54. Miroux, B. and J.E. Walker, *Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels*. J Mol Biol, 1996. **260**(3): p. 289-98.
55. Metcalf, W.W., W. Jiang, and B.L. Wanner, *Use of the rep technique for allele replacement to construct new Escherichia coli hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers*. Gene, 1994. **138**(1-2): p. 1-7.
56. Capage, M.A., D.H. Doherty, M.R. Betlach, and R.W. Vanderslice, *Recombinant-DNA mediated production of xanthan gum*. 1987.
57. Sukchawalit, R., P. Vattanaviboon, R. Sallabhan, and S. Mongkolsuk, *Construction and characterization of regulated L-arabinose-inducible broad host range expression vectors in Xanthomonas*. FEMS Microbiol Lett, 1999. **181**(2): p. 217-23.
58. Becker, A., K. Niehaus, and A. Puhler, *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*. Mol Microbiol, 1995. **16**(2): p. 191-203.
59. Scott, H.N., P.D. Laible, and D.K. Hanson, *Sequences of versatile broad-host-range vectors of the RK2 family*. Plasmid, 2003. **50**(1): p. 74-9.
60. Patel, Y., J.C. Schneider, L. Ielpi, and M.V. Ielmini, *International patent US 7,439,044 B2*, I. CP Kelco U.S., Atlanta, GA (US), Editor. 2008.
61. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. 1989: Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
62. Coligan, J.E., *Current protocols in protein science*. Brooklyn, N.Y., Wiley. 2001.
63. Harlow, E. and D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*. 1988: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
64. Simon, R., *High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob transposon*. Mol Gen Genet, 1984. **196**(3): p. 413-20.
65. Doublet, S., *Production of selenomethionyl proteins in prokaryotic and eukaryotic expression systems*. Methods Mol Biol, 2007. **363**: p. 91-108.
66. Dauter, Z., M. Dauter, and K.R. Rajashankar, *Novel approach to phasing proteins: derivatization by short cryo-soaking with halides*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2000. **56**(Pt 2): p. 232-7.
67. Nagem, R.A., Z. Dauter, and I. Polikarpov, *Protein crystal structure solution by fast incorporation of negatively and positively charged anomalous scatterers*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2001. **57**(Pt 7): p. 996-1002.
68. Leslie, A.G.W. and H.R. Powell, *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*. Vol. 245. 2007. 41-51.
69. Potterton, E., P. Briggs, M. Turkenburg, and E. Dodson, *A graphical user interface to the CCP4 program suite*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003. **59**(Pt 7): p. 1131-7.
70. Winn, M.D., C.C. Ballard, K.D. Cowtan, E.J. Dodson, P. Emsley, P.R. Evans, R.M. Keegan, E.B. Krissinel, A.G. Leslie, A. McCoy, S.J. McNicholas, G.N. Murshudov, N.S. Pannu, E.A. Potterton, H.R. Powell, R.J. Read, A. Vagin, and

- K.S. Wilson, *Overview of the CCP4 suite and current developments*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2011. **67**(Pt 4): p. 235-42.
71. Otwinowski, Z. and W. Minor, *Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode*. Macromolecular Crystallography, part A, 1997. **276**: p. 307-326.
72. McCoy, A.J., R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, M.D. Winn, L.C. Storoni, and R.J. Read, *Phaser crystallographic software*. J Appl Crystallogr, 2007. **40**(Pt 4): p. 658-674.
73. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: visual molecular dynamics*. J Mol Graph, 1996. **14**(1): p. 33-8, 27-8.
74. Krissinel, E. and K. Henrick, *Inference of macromolecular assemblies from crystalline state*. J Mol Biol, 2007. **372**(3): p. 774-97.
75. Dolinsky, T.J., J.E. Nielsen, J.A. McCammon, and N.A. Baker, *PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W665-7.
76. Baker, N.A., D. Sept, S. Joseph, M.J. Holst, and J.A. McCammon, *Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10037-41.
77. Dundas, J., Z. Ouyang, J. Tseng, A. Binkowski, Y. Turpaz, and J. Liang, *CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Web Server issue): p. W116-8.
78. Ho, B.K. and F. Gruswitz, *HOLLOW: generating accurate representations of channel and interior surfaces in molecular structures*. BMC Struct Biol, 2008. **8**: p. 49.
79. Zgurskaya, H.I. and H. Nikaido, *Cross-linked complex between oligomeric periplasmic lipoprotein AcrA and the inner-membrane-associated multidrug efflux pump AcrB from Escherichia coli*. J Bacteriol, 2000. **182**(15): p. 4264-7.
80. Slotboom, D.J., R.H. Duurkens, K. Olieman, and G.B. Erkens, *Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution*. Methods, 2008. **46**(2): p. 73-82.
81. Franke, D. and D.I. Svergun, *DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering*. J. Appl. Cryst., 2009. **42**: p. 342-346.
82. Svergun, D.I., M.V. Petoukhov, and M.H. Koch, *Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering*. Biophys J, 2001. **80**(6): p. 2946-53.
83. Wriggers, W., *Using Situs for the integration of multi-resolution structures*. Biophys Rev, 2010. **2**(1): p. 21-27.
84. Svergun, D.I., S. Richard, M.H. Koch, Z. Sayers, S. Kuprin, and G. Zaccai, *Protein hydration in solution: experimental observation by x-ray and neutron scattering*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2267-72.
85. Reisinger, V. and L.A. Eichacker, *Isolation of membrane protein complexes by blue native electrophoresis*. Methods Mol Biol, 2008. **424**: p. 423-31.
86. Filip, C., G. Fletcher, J.L. Wulff, and C.F. Earhart, *Solubilization of the cytoplasmic membrane of Escherichia coli by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate*. J Bacteriol, 1973. **115**(3): p. 717-22.
87. Burroughs, A.M., S. Balaji, L.M. Iyer, and L. Aravind, *A novel superfamily containing the beta-grasp fold involved in binding diverse soluble ligands*. Biol Direct, 2007. **2**: p. 4.
88. Burroughs, A.M., S. Balaji, L.M. Iyer, and L. Aravind, *Small but versatile: the extraordinary functional and structural diversity of the beta-grasp fold*. Biol Direct, 2007. **2**: p. 18.
89. Sathiyamoorthy, K., E. Mills, T.M. Franzmann, I. Rosenshine, and M.A. Saper, *The crystal structure of Escherichia coli group 4 capsule protein GfcC reveals a*

- domain organization resembling that of Wza*. Biochemistry, 2011. **50**(24): p. 5465-76.
90. Whitney, J.C., I.D. Hay, C. Li, P.D. Eckford, H. Robinson, M.F. Amaya, L.F. Wood, D.E. Ohman, C.E. Bear, B.H. Rehm, and P.L. Howell, *Structural basis for alginate secretion across the bacterial outer membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(32): p. 13083-8.
 91. McNeil, M., J. Davill, A.G. Davill, P. Albersheim, R. van Veen, P. Hooykaas, R. Schilperoort, and A. Dell, *The discernible, structural features of the acidic polysaccharides secreted by different Rhizobium species are the same*. Carbohydrate Research, 1986. **146**(2): p. 307-326.
 92. Lee, S.W., S.W. Han, M. Sririyanum, C.J. Park, Y.S. Seo, and P.C. Ronald, *A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity*. Science, 2009. **326**(5954): p. 850-3.
 93. Han, S.W., M. Sririyanun, S.W. Lee, M. Sharma, O. Bahar, Z. Bower, and P.C. Ronald, *Small protein-mediated quorum sensing in a Gram-negative bacterium*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e29192.
 94. da Silva, F.G., Y. Shen, C. Dardick, S. Burdman, R.C. Yadav, A.L. de Leon, and P.C. Ronald, *Bacterial genes involved in type I secretion and sulfation are required to elicit the rice Xa21-mediated innate immune response*. Mol Plant Microbe Interact, 2004. **17**(6): p. 593-601.
 95. Shen, Y., P. Sharma, F.G. da Silva, and P. Ronald, *The Xanthomonas oryzae pv. lozengeoryzae raxP and raxQ genes encode an ATP sulphurylase and adenosine-5'-phosphosulphate kinase that are required for AvrXa21 avirulence activity*. Mol Microbiol, 2002. **44**(1): p. 37-48.
 96. Han, S.W., S.W. Lee, O. Bahar, B. Schwessinger, M.R. Robinson, J.B. Shaw, J.A. Madsen, J.S. Brodbelt, and P.C. Ronald, *Tyrosine sulfation in a Gram-negative bacterium*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 1153.
 97. Burdman, S., Y. Shen, S.W. Lee, Q. Xue, and P. Ronald, *RaxH/RaxR: a two-component regulatory system in Xanthomonas oryzae pv. oryzae required for AvrXa21 activity*. Mol Plant Microbe Interact, 2004. **17**(6): p. 602-12.
 98. Lee, S.W., K.S. Jeong, S.W. Han, S.E. Lee, B.K. Phee, T.R. Hahn, and P. Ronald, *The Xanthomonas oryzae pv. oryzae PhoPQ two-component system is required for AvrXA21 activity, hrpG expression, and virulence*. J Bacteriol, 2008. **190**(6): p. 2183-97.
 99. Ronald, P.C., *Small protein-mediated quorum sensing in a gram-negative bacterium: novel targets for control of infectious disease*. Discov Med, 2011. **12**(67): p. 461-70.
 100. Marczak, M., M. Dzwierzynska, and A. Skorupska, *Homo- and heterotypic interactions between Pss proteins involved in the exopolysaccharide transport system in Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*. Biol Chem, 2013. **394**(4): p. 541-59.
 101. Sadykov, M.R., M.E. Olson, S. Halouska, Y. Zhu, P.D. Fey, R. Powers, and G.A. Somerville, *Tricarboxylic acid cycle-dependent regulation of Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin synthesis*. J Bacteriol, 2008. **190**(23): p. 7621-32.
 102. Carzaniga, T., D. Antoniani, G. Deho, F. Briani, and P. Landini, *The RNA processing enzyme polynucleotide phosphorylase negatively controls biofilm formation by repressing poly-N-acetylglucosamine (PNAG) production in Escherichia coli C*. BMC Microbiol, 2012. **12**: p. 270.
 103. Andrade, J.M. and C.M. Arraiano, *PNPase is a key player in the regulation of small RNAs that control the expression of outer membrane proteins*. Rna, 2008. **14**(3): p. 543-51.

104. Braun, V., *Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins*. FEMS Microbiol Rev, 1995. **16**(4): p. 295-307.
105. Blanvillain, S., D. Meyer, A. Boulanger, M. Lautier, C. Guynet, N. Denance, J. Vasse, E. Lauber, and M. Arlat, *Plant carbohydrate scavenging through tonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria*. PLoS One, 2007. **2**(2): p. e224.