

63330

FERRARI, WALTER

Caracterizacion func

2015

73956



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Ciencias Naturales

**Caracterización funcional de glicosiltransferasas
implicadas en la biosíntesis del core de lipopolisacáridos
de patógenos y simbioses**

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Lic. Walter Ferrari

Dr. Edgardo Jofré
Director

Dr. Antonio Lagares
Codirector

Dra. Gottig, Natalia

Dra. Lisa, Teresita

Dr. Gustavo Parisi

8 de Mayo de 2015

00000

MFN:
Classif:
T.923

*Your work is going to fill a large part of your life,
and the only way to be truly satisfied is to do what you believe is great work.
And the only way to do great work is to love what you do.
If you haven't found it yet, keep looking.
Don't settle...*

Fragmento del discurso *You've got to find what you love*
Steve Jobs en Stanford, 12 de junio de 2005

RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Río Cuarto por brindarme el espacio, en donde desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de la beca que posibilitó mi dedicación exclusiva a la investigación científica.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edgardo Jofré por darme la posibilidad de realizar esta tesis junto a su grupo de investigación, por la confianza depositada en mí para emprender este proyecto, y poner a disposición todos los recursos necesarios para que este trabajo se lleve a cabo.

Al Dr. Antonio Lagares por aceptar desde el primer momento en colaborar para poder obtener la beca. Por sus cuantiosos aportes y sugerencias; y sobre todo por su buena onda y estímulo para seguir adelante.

Al Dr. Bruno Contreras Moreira por aceptarme en su laboratorio durante mi estadía en España.

A los integrantes del laboratorio 22. A los que ya no están, los que aún persisten y a las nuevas incorporaciones: Florencia, Paula, Marina, Analía, Juan Pablo, Sonia, Fernando, Dani, Romi, Agustina, Virgi, Maricruz...

A "los del laboratorio de al lado": Fernando, Laura, Jorge, Sole², Ana, Eli, Vani...

A los muchachos de los pasillos y escaleras del Departamento de Biología Molecular: Gastón, Javi, Martín, Emi, Lucas, Julio, Christian, Lucas, Christopher...

A ese grupo con el que compartimos tantas noches de jarana: María, Maricel, Nico, Vicky, Flor, Caro, Eli, Ramiro...

A Tita y sus hermanitas menores por tantos buenos momentos.

A mis padres adoptivos riocuartenses, por adoptar a este sin vida: Majo y Pato.

A mis amigos de Puerto Rico, a los cuales nunca les pude explicar bien en que trabajaba: Titi, Mónica, Nico, Raúl, Haydee, Vane, Pupo, Mariana, Walter, Lucre, Mauri...

A Escracho por todas aquellas noches en Córdoba junto a los mejores DJs del mundo.

A Pascual, el Tano y Sergio por alojarme en su departamento todas las veces que viajaba a Buenos Aires para tomar cursos.

A los grandes amigos que hice en la carrera, y a quienes veo muy poco últimamente: Roberto, Mariano, Ariel, Carol, Laura, la Eli, Gastoncito, Jampi, Marquitos, Analía, Mariela, Jona, etc...

A mis amigos de la AFRC por todos los buenos momentos: Pato, Yoni, Emi, Blas, Vicky, Leo, Lucila, Mario, Martin...

A todos los amigos y conocidos que hice gracias a la fotografía: Luciano, Euge, Vero, Silvana, Hugo, Sofi, Magda, Raul, Daniela, Anita, Vivi, etc...

INDICE DE CONTENIDOS

Introducción General

INTRODUCCIÓN	1
1. Generalidades de la Simbiosis Rizobio-Leguminosa	1
1.1. El proceso de nodulación	3
1.2. Preinfección	4
1.3. Infección y Formación del Nódulo	5
1.4. Fijación Biológica de Nitrógeno	6
2. Polisacáridos bacterianos requeridos para la simbiosis	7
2.1. Exopolisacáridos (EPS)	8
2.2. Glucanos cíclicos	9
2.3. Polisacáridos capsulares (KPS)	10
2.4. Lipopolisacáridos	12
2.4.1. Lípido A	12
2.4.2. Core	15
2.4.3. Antígeno O	17
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

Objetivos

Objetivo General	29
Objetivos específicos	29

Capítulo I-Análisis de la diversidad funcional de Glicosiltransferasas del core interno en el LPS de *Rhizobiales*

INTRODUCCIÓN	32
I-1. Biosíntesis del LPS	32
I-1.1. Biosíntesis del Lípido A	32
I-1.2. Biosíntesis del Core	34
I-1.3. Biosíntesis del antígeno O	37
I-1.4. Exporte del LPS	39
I-2. Los polisacáridos de superficie y la formación de biofilm	41
I-3. La estructura del LPS afecta la hidrofobicidad superficial bacteriana	42
MATERIALES Y MÉTODOS	44
I-4. Modelo de estudio	44
I-4.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	44

I-4.2. Medios y condiciones para el cultivo de rizobios y <i>E. coli</i>	51
I-4.2.1. Medios de cultivo para rizobios	51
I-4.2.2. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	53
I-4.2.3. Antibióticos empleados	53
I-5. Extracción de ADN bacteriano	54
I-5.1. Extracción de ADN genómico de rizobios	54
I-5.2. Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina	55
I-5.2.3. Soluciones Minipreps para extracción de ADN plasmídico	55
I-6. Reacción en Cadena de la Polimerasa	56
I-6.1. Amplificación de <i>lpsB/lpcC</i> y <i>rfaC</i> mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	56
I-7. Transformación bacteriana y ensayos de Conjugación	57
I-7.1. Obtención de células Competentes Químicas	57
I-7.2. Transformación bacteriana	57
I-7.3. Ensayos de Conjugación	57
I-8. Obtención de mutantes <i>lpsB/lpcC</i> y <i>rfaC</i>	58
I-8.1. Mutagénesis Sitio-Dirigida mediante integración de plásmido	58
I-8.2. Mutagénesis Sitio-Dirigida mediante doble recombinación homóloga	59
I-9. Complementación Heteróloga	60
I-10. Evaluación de la capacidad de mutantes afectados en el LPS para crecer en medios suplementados con SDS	60
I-11. Lipopolisacáridos: Aislamiento y Análisis	61
I-11.1. Aislamiento de Lipopolisacáridos (LPS)	61
I-11.2. Aislamiento con Polimixina B	61
I-11.3. Aislamiento de LPS mediante el método Fenol-Agua	62
I-11.4. Electroforesis de LPS en geles de Poliacrilamida	62
I-11.5. Tinción con Azul Alcian-Plata (AAP)	63
I-12. Hidrofobicidad superficial	64
I-13. Formación de biofilm	64
I-14. Ensayos de infección de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	65
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
I-15. Generación de Mutantes en <i>lpcC</i>	66
I-15.1. Generación de mutantes <i>lpcC</i> de <i>B. japonicum</i>	66
I-15.2. Generación de mutantes <i>lpcC</i> de <i>A. tumefaciens</i>	67
I-15.3. Generación de mutantes <i>rfaC</i> de <i>M. loti</i>	68
I-16. Generación de Plásmidos conteniendo diferentes ortólogos a <i>lpsB</i> para estudios de complementación heteróloga	69
I-17. Evaluación de la sensibilidad a detergentes en Mutantes <i>lpsB</i> , <i>lpcC</i> y <i>rfaC</i>	70
I-17.1. Evaluación de la capacidad de <i>S. meliloti</i> para crecer en medios con SDS	71

I-17.2. Evaluación de la capacidad de <i>A. tumefaciens</i> para crecer en medios con SDS	72
I-17.3. Evaluación de la capacidad de <i>B. japonicum</i> para crecer en medios con SDS	73
I-17.4. Evaluación de la capacidad de <i>R. leguminosarum</i> para crecer en medios con SDS	74
I-17.5. Evaluación de la capacidad de <i>M. loti</i> para crecer en medios con SDS	74
I-18. Efecto de mutaciones en <i>lpsB</i> o <i>lpcC</i> sobre la estructura del LPS en rizobios	76
I-18.1. Complementación heteróloga del mutante <i>lpsB</i> de <i>Sinorhizobium meliloti</i> con ortólogos de <i>R. leguminosarum</i>, <i>B. japonicum</i>, <i>A. tumefaciens</i>, <i>B. melitensis</i>, <i>B. henselae</i> y <i>rfaC</i> de <i>M. loti</i> y <i>B. bronchiseptica</i>: Análisis del perfil electroforético de los LPS mediante DOC-PAGE	76
I-18.2. Complementación heteróloga del mutante <i>lpcC</i> de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con ortólogos de <i>R. leguminosarum</i> , <i>B. japonicum</i> , <i>S. meliloti</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. henselae</i> y <i>rfaC</i> de <i>M. loti</i> y <i>B. bronchiseptica</i> : Análisis del perfil electroforético de los LPS mediante DOC-PAGE	77
I-18.3. Complementación heteróloga del mutante <i>lpcC</i> de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> con ortólogos de <i>R. leguminosarum</i>, <i>A. tumefaciens</i>, <i>S. meliloti</i>, <i>B. melitensis</i>, <i>B. henselae</i> y <i>rfaC</i> de <i>M. loti</i> y <i>B. bronchiseptica</i>: Análisis del perfil electroforético de los LPS mediante DOC-PAGE.	80
I-18.4. Complementación heteróloga del mutante <i>lpcC</i> de <i>Rhizobium leguminosarum</i> con ortólogos de <i>B. japonicum</i> , <i>S. meliloti</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>A. tumefaciens</i> : Análisis del perfil electroforético de los LPS mediante DOC-PAGE	81
I-18.5. Obtención de los mutantes <i>rfaC</i> y <i>rfaF</i> de <i>M. loti</i> y análisis del perfil electroforético de los LPS mediante DOC-PAGE	84
I-19. Alteraciones estructurales en el LPS resultan en cambios en la hidrofobicidad superficial y capacidad de formación de biofilm en rizobios	85
I-19.1. Determinación de la hidrofobicidad superficial en rizobios	86
I-19.2. Determinación de la capacidad de formar biofilm en rizobios	88
I-20. Análisis de la infectividad del mutante <i>lpcC</i> de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en <i>Kalanchoe daigremontiana</i>	91
I-21. Consideraciones finales	92
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	94

Capítulo II-La simbiosis *Bradyrhizobium japonicum* y *Glycine max*: Análisis del rol del LPS

INTRODUCCIÓN	103
MATERIALES Y MÉTODOS	105
II-1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	105
II-2. Medios y condiciones para el cultivo de <i>B. japonicum</i>	107
II-3. Curvas de crecimiento y viabilidad	108

II-4. Cálculo del tiempo de generación	108
II-5. Extracción y cuantificación de exopolisacáridos (EPS)	108
II-6. Ensayos de motilidad	109
II-7. Ensayos de autoagregación	109
II-8. Microscopia electrónica de transmisión de células de <i>B. japonicum</i>	109
II-9. Ensayos de nodulación en plantas de soja	109
II-10. Preparación de nódulos para microscopia electrónica	110
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	112
II-11. Efecto de la mutación <i>lpcC</i> de <i>B. japonicum</i> sobre los parámetros de crecimiento	112
II-4.2. Alteraciones en la estructura del LPS de <i>B. japonicum</i> resultan en un incremento de la producción de exopolisacáridos	113
II-4.3. Cambios en la estructura del LPS alteran la motilidad y capacidad de autoagregación	114
II-4.4. La presencia de flagelos en <i>B. japonicum</i> no se encuentra afectada por las alteraciones en el LPS.	115
II-4.5. Una estructura de LPS intacta es requerida para el establecimiento de una simbiosis funcional entre <i>B. japonicum</i> y <i>Glycine max</i>	117
II-4.6. Observaciones microscópicas de cortes de nódulos de soja	118
II-4.6.1. Los pseudonódulos inducidos por <i>B. japonicum</i> con LPS alterado presentan signos de defensa por parte de la planta	119
II-4.6.2. Las células vegetales que forman los pseudonódulos no poseen bacteroides en su interior	120
II-5. Consideraciones Generales	123
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	124

Capítulo III- Caracterización bioquímica y estructural de LpsB y LpcC

INTRODUCCIÓN	128
III-1. Glicosiltransferasas	128
III-1.1. Mecanismo de las glicosiltransferasas	130
III-1.2. WaaG de <i>E. coli</i>	131
III-1.3. WaaC de <i>E. coli</i>	132
MATERIALES Y MÉTODOS	
III-2. Programas y servidores utilizados para el modelado de LpsB, LpcC y RfaC	135
III-3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	136
III-4. Tinción de geles de proteínas	137
III-5. Purificación de LpsB de <i>S. meliloti</i> , LpcC de <i>R. leguminosarum</i> y RfaC de <i>M. loti</i> por cromatografía de afinidad utilizando el sistema pET	138
III-5.1. Obtención de los Clones Recombinantes	138

III-5.2. Sobreexpresión heteróloga de <i>lpsB</i> , <i>lpcC</i> y <i>rfaC</i>	139
III-5.3. Purificación de LpsB, LpcC y RfaC	139
III-6. Determinación de actividad enzimática in vitro de LpsB	140
III-6.1. Determinación de V_{max} y K_m	142
RESULTADOS y DISCUSIÓN	143
III-7. Análisis <i>in silico</i> de glicosiltransferasas involucradas en la biosíntesis del core interno del LPS	143
III-7.1. Análisis de Identidad y Similitud entre glicosiltransferasas	145
III-7.2. Organización genómica de la región que comprende a <i>lpsB/lpcC</i> en distintos genomas	146
III-7.3. Organización genómica de la región que comprende a <i>rfaC</i> en distintos genomas	147
III. 8. Búsqueda de los moldes más probables para LpsB y LpcC	148
III. 8.1. Búsqueda de los moldes más probables para RfaC	149
III. 9. Alineamientos de secuencias de glicosiltransferasas	149
III. 9.1. Alineamientos de Hexosiltransferasas	149
III. 9.2. Alineamientos de Heptosiltransferasas	153
III. 10. Modelado de LpsB	154
III. 10.1. Generación de modelo ab initio de LpsB	157
III. 11. Modelado de LpcC	158
III. 11.1. Generación de modelo ab initio de LpcC	161
III. 12. Modelado de RfaC	162
III. 12.1. Generación de modelo ab initio de RfaC	163
III. 13. Sobreexpresión de <i>lpsB</i> , <i>lpcC</i> y <i>rfaC</i>	164
III. 13.1. Clonado y sobreexpresión de <i>lpsB</i> , <i>lpcC</i> y <i>rfaC</i> utilizando el sistema pET	164
III-13.1.1. Clonado de <i>lpsB</i> en el vector de expresión pET28a+	165
III-13.1.2. Sobreexpresión de <i>lpsB</i> utilizando el sistema pET	166
III-13.2 Purificación de LpsB por cromatografía de afinidad	168
III-13.3. Sobreexpresión de <i>lpcC</i> de <i>R. leguminosarum</i>	169
III-13.4. Sobreexpresión y purificación de RfaC por cromatografía de afinidad	170
III-14. Determinación de actividad glicosiltransferasa <i>in vitro</i>	171
III-14.1. Determinación de actividad glucosiltransferasa de LpsB	172
III-14.2. Determinación de actividad manosiltransferasa de LpsB y LpcC	175
III-15. Consideraciones generales	177
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	178

Conclusiones

CONCLUSIONES FINALES	183
----------------------	-----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de nodulación en leguminosas	4
Figura 2. Esquema de la superficie celular de rizobios, mostrando la posición de los polisacáridos de superficie que están involucrados en la simbiosis.	7
Figura 3. Estructura del lípido A	14
Figura 4. Estructura del Core-Lípido A de <i>E. coli</i> y <i>R. leguminosarum</i>	16
Figura 5. Diferentes formas del LPS de <i>E. coli</i> separados por SDS-PAGE	18
Figura 6. Estructura y biosíntesis del Kdo ₂ -lípido IV _A en <i>E. coli</i> K12	33
Figura 7. Estructura y biosíntesis del Core de <i>E. coli</i> R1	35
Figura 8. Manosilación del Kdo ₂ -Lípido IV _A catalizada por LpcC, de <i>R. leguminosarum</i>	36
Figura 9. Diagrama ilustrativo de las cuatro vías conocidas para el ensamblaje del antígeno O	39
Figura 10. Esquema propuesto de la vía de exporte de lipopolisacáridos	40
Figura 11. Biofilm	41
Figura 12. Análisis de los productos de digestión de pK18mob2- <i>lpcC</i> con <i>Hind</i> III y <i>Kpn</i> I y pFJ210 con <i>Sal</i> I mediante electroforesis en geles de agarosa	67
Figura 13. Análisis de los productos de digestión de los plásmidos pK18mob2-<i>lpcC</i> (<i>Hind</i>III y <i>Eco</i>RI) y pFJ220 (<i>Kpn</i>I).	68
Figura 14. Análisis de los productos de digestión del plásmido pK18mob2- <i>rfaC</i>	69
Figura 15. Electroforesis en geles de agarosa donde se muestra la movilidad de los posibles plásmidos recombinantes	70
Figura 16. Crecimiento de <i>S. meliloti</i> en medios suplementados con SDS 0,1% (p/v)	71
Figura 17. Crecimiento de <i>A. tumefaciens</i> en medios suplementados con SDS 0,075% (p/v)	72
Figura 18. Crecimiento de <i>B. japonicum</i> en medios suplementados con SDS 0,05% (p/v)	73
Figura 19. Crecimiento de <i>R. leguminosarum</i> en medios suplementados con SDS 0,075% (p/v)	74
Figura 20. Crecimiento de <i>M. loti</i> en medios suplementados con SDS 0,15 % (p/v)	75
Figura 21. Análisis del LPS de <i>S. meliloti</i> mediante DOC-PAGE	77
Figura 22. Análisis del LPS de <i>A. tumefaciens</i> mediante DOC-PAGE	78
Figura 23. Análisis del LPS de <i>B. japonicum</i> mediante DOC-PAGE	80
Figura 24. Análisis del LPS de <i>R. leguminosarum</i> mediante DOC-PAGE	82
Figura 25. Análisis del LPS de <i>M. loti</i> mediante DOC-PAGE	85
Figura 26. Efecto de la mutación en <i>lpcC</i> de <i>B. japonicum</i> sobre la hidrofobicidad superficial	86

Figura 27. Efecto de la mutación en <i>lpsB</i> de <i>S. meliloti</i> sobre la hidrofobicidad superficial	86
Figura 28. Efecto de la mutación en <i>lpcC</i> de <i>A. tumefaciens</i> sobre la hidrofobicidad superficial	87
Figura 29. Efecto de la mutación en <i>lpcC</i> de <i>R. leguminosarum</i> sobre la hidrofobicidad superficial	87
Figura 30. Cuantificación de la capacidad de formar biofilm en <i>A. tumefaciens</i>	89
Figura 31. Cuantificación de la capacidad de formar biofilm en <i>B. japonicum</i>	89
Figura 32. Cuantificación de la capacidad de formar biofilm en <i>S. meliloti</i>	89
Figura 33. Cuantificación de la capacidad de formar biofilm en <i>R. leguminosarum</i>	89
Figura 34. Tumores (agallas) inducidas por la infección con <i>A. tumefaciens</i>	92
Figura 35. Efecto de la mutación en el gen <i>lpcC</i> sobre el crecimiento de <i>B. japonicum</i>	112
Figura 36. Efecto de la mutación en <i>lpcC</i> de <i>B. japonicum</i> sobre la producción de EPS	113
Figura 37. Motilidad de <i>B. japonicum</i>	114
Figura 38. Ensayos de autoagregación	115
Figura 39. Microscopía electrónica de transmisión de <i>B. japonicum</i>	116
Figura 40. Cinética de nodulación de plantas de soja por <i>B. japonicum</i> salvaje y mutante <i>lpcC</i>	117
Figura 41. Imágenes de nódulos y pseudonódulos de raíces de plantas de soja inoculadas con <i>B. japonicum</i>	118
Figura 42. Microscopía óptica de cortes semifinos de nódulos de soja	121
Figura 43. Microscopía electrónica de transmisión de cortes ultrafinos de nódulos de soja	122
Figura 44. Diagrama de cintas de las estructuras representativas de dos superfamilias de glicosiltransferasas y diagrama de la topología propuesta para una GT-C. GT-A	130
Figura 45. Posibles mecanismos catalíticos de las glicosiltransferasas	130
Figura 46. Estructura de WaaG	132
Figura 47. Estructura de WaaC	133
Figura 48. Detección de hexosil- heptosiltransferasas de la biosíntesis del core en Proteobacterias	145
Figura 49. Organización genómica de la región comprendida entre <i>greA</i> , <i>lpsB/lpcC</i> y <i>lrp</i> en distintos genomas	147
Figura 50. Organización genómica de la región comprendida por <i>rfaD</i> , <i>rfaF</i> , <i>rfaC</i> y <i>rfaL</i>	148
Figura 51. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de hexosiltransferasas utilizadas como moldes para determinar la posible estructura de LpsB y LpcC	150
Figura 52. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de hexosiltransferasas involucradas en la síntesis del core del LPS	150

Figura 53. Alineamiento múltiple de la secuencia consenso de aminoácidos de hexosiltransferasas de <i>Rhizobiales</i> comparada con las secuencias utilizadas como moldes para determinar la estructura de LpsB y LpcC	151
Figura 54. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de heptosiltransferasas de estructura resuelta y RfaC de <i>M. loti</i>	152
Figura 55. Modelado por homología de LpsB	155
Figura 56. Modelado por homología de LpsB	156
Figura 57. Vista parcial de la región que posiblemente pertenezca al sitio catalítico de LpsB	157
Figura 58. Superposición de dos modelos de LpsB	158
Figura 59. Modelado por homología de LpcC	159
Figura 60. Modelado por homología de LpcC	160
Figura 61. Vista parcial de la región que posiblemente pertenezca al sitio catalítico de LpcC	160
Figura 62. Superposición de dos modelos de LpcC	161
Figura 63. Modelado por homología de RfaC	162
Figura 64. Vista parcial de la región que posiblemente conforme el sitio catalítico de RfaC	163
Figura 65. Superposición de dos modelos de RfaC	164
Figura 66. Electroforesis en geles de agarosa donde se muestra la movilidad de los posibles plásmidos recombinantes	166
Figura 67. Análisis de restricción (<i>Bam</i>HI y <i>Nde</i>I,) de los vectores con menor movilidad mostrados en la Figura 66	166
Figura 68. Determinación de solubilidad de 6XHis-LpsB	167
Figura 69. Purificación de LpsB	169
Figura 70. Sobreexpresión y purificación de LpcC	170
Figura 71. Sobreexpresión y purificación de RfaC	171
Figura 72. Curva de reacción en el tiempo	173
Figura 73. Relación entre la concentración de membranas como fuente de enzimas y la velocidad reacción.	174
Figura 74. Cinética de reacción	174

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo	44
Tabla 2. Plásmidos empleados en el presente trabajo	48
Tabla 3. Cebadores empleados en este trabajo	49
Tabla 4. Cepas de <i>B. japonicum</i> empleadas en este capítulo	105
Tabla 5. Plásmidos empleados en el presente trabajo	106
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en este trabajo	106
Tabla 7. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo	106
Tabla 8. Plásmidos empleados en el presente capítulo	134
Tabla 9. Oligonucleótidos empleados en este trabajo	135
Tabla 10. Comparación de similitud e identidad entre las proteínas en estudio de diferentes especies de bacterias, tanto simbióticas como patógenas	146
Tabla 11. Aminoácidos del sitio activo de hexosiltransferasas con estructura resuelta y la interacción con sus correspondientes ligandos	152
Tabla 12. Aminoácidos del sitio activo de la heptosiltransferasa WaaC y la interacción con las subunidades de su ligando	154
Tabla 13. Actividad manosiltransferasa de LpsB y LpcC	176

ABREVIATURAS

A:	Adenina
ABC:	<i>ATP Binding Cassette</i>
ADN:	Acido Desoxirribonucleico
ADP:	Adenosin Difosfato
ACP:	<i>Acil Carrier Protein</i>
APS:	Persulfato de Amonio
Ara:	Arabinosa
DNasa:	Desoxirribonucleasa
DO:	Densidad Óptica
DOC:	Ácido Deoxicólico
DPM:	Desintegraciones por Minuto
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EPS:	Exopolisacárido
EPS I:	Exopolisacárido I (succinoglucano)
EPS II:	Exopolisacárido II (galactoglucano)
FBN:	Fijación Biológica del Nitrógeno
g:	Gramo
Gal:	Galactosa
GalUA:	Acido Galacturónico
GDP:	Guanosin Difosfato
Glc:	Glucosa
GlcN:	Glucosamina
GlcNato:	Gluconato
GlcUA:	Acido Glucurónico
Gm:	Gentamicina
GT:	Glicosiltransferasa
Hep:	Heptosa
HMW:	<i>Alto Peso Molecular</i>
kDa:	Kilo Daltons
Kdo:	Acido 2-ceto-3-deoxioctanoico
kHz:	Kilo Hertz

Km:	Kanamicina
KPS:	Polisacárido capsular
LMW:	<i>Bajo Peso Molecular</i>
LPS:	Lipopolisacárido
LPS I:	Forma Lisa de Lipopolisacárido (lípidos A + core + antígeno O)
LPS II:	Forma Rugosa del Lipopolisacárido (lípidos A + core)
M:	Molar
mA:	Miliamperes
Man:	Manosa
ManNac:	Acetil-Manosamina
MeMan:	Metil-manosa
mg:	Miligramo
min:	Minutos
ml:	Mililitro
mM:	Milimolar
N:	Normal
Nm:	Neomicina
° C:	Grados Celsius
PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb:	Pares de bases de nucleótidos
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH:	Potencial Hidrógeno
PHB:	Polihidroxi butirato
pI:	Punto isoeléctrico
PPEtN:	Pirofosforiletanolamina
p/v:	Peso en volumen
Rib:	Ribosa
Rif:	Rifampicina
Rha:	Ramnosa
RNasa:	Ribonucleasa
rpm:	Revoluciones por minuto
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
Sm:	Streptomicina
TEMED:	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina

Tc:	Tetraciclina
UDP:	Uridina-Difosfato
und-P:	Undecaprenil-Fosfato
μg:	Microgramo
μl:	Microlitro
μm:	Micrómetro
v/v:	Volumen en volumen
X-Gal:	5-bromo-4cloro-3indolil-β-galactopiranosido
%:	Por ciento
¹⁴ C:	Carbono 14

Introducción General

INTRODUCCION

1. Generalidades de la Simbiosis Rizobio-Leguminosa

El nitrógeno constituye el 78% del volumen del aire de nuestro planeta, sin embargo, este elemento es uno de los principales factores limitantes del crecimiento vegetal. Las plantas sólo pueden utilizar formas de nitrógeno combinado, generalmente amonio o nitrato; que son derivadas del N₂ atmosférico a través del proceso denominado fijación de nitrógeno. Este término incluye la reducción del N₂ hasta óxidos de nitrógeno o hasta amonio, ya sean por procesos físico-químicos (naturales o inducidos por el hombre) o por procesos biológicos. La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) es una propiedad atribuible sólo a organismos procariontas, y es responsable de aproximadamente dos tercios del total de nitrógeno fijado en la biósfera. Las plantas de la familia *Leguminosae* tienen la capacidad de asociarse simbióticamente con bacterias Gram negativas del suelo, pertenecientes al orden *Rhizobiales*. Este orden incluye al género fitopatógeno *Agrobacterium*, como también a los géneros *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*, a los que comúnmente se denominan Rizobios. Estos rizobios, poseen la capacidad de inducir la formación de nódulos en la raíz de dichas leguminosas. Estos nódulos son los órganos de la planta en donde, como consecuencia de albergar rizobios en un estado particular de diferenciación, se produce la fijación simbiótica de nitrógeno (Burns & Hardy 1975). La FBN es de considerable importancia en la agricultura, porque aporta una cantidad significativa de nitrógeno combinado al suelo. Se estima que la FBN aporta 40 millones de toneladas de nitrógeno, cada año (Herridge *et al.*, 2008). Dado que la carencia de éste elemento suele darse en suelos desnudos y sin abonar, las leguminosas “noduladas” ofrecen una ventaja selectiva en tales condiciones y pueden crecer bien en zonas donde no lo harían otras plantas. En la agricultura actual, sólo unas pocas especies de leguminosas se cultivan a gran escala, pero estos cultivos contribuyen más del 25 por ciento de la producción mundial, destinados a alimentos básicos, forraje para el ganado y la producción de biocombustibles emergentes (Ferguson *et al.*, 2010)

Por otra parte, el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados en la agricultura moderna ha ocasionado graves problemas de contaminación debido a que no todo el

fertilizante que se aplica es aprovechado por las plantas, sino que cantidades considerables son vertidas en lagos, ríos y arroyos. Por el interés que estas bacterias representan para la agricultura, empleándose como Inoculantes (Bio-Fertilizantes) en los cultivos, se han realizado investigaciones extensas sobre este sistema simbiótico (Deaker *et al.*, 2004), incluyendo estudios sobre la diversidad y la taxonomía de los rizobios.

En 1888, Beijerinck obtuvo el primer cultivo bacteriano puro de un nódulo de la raíz de una leguminosa y lo llamó *Bacillus radicicola*. En 1929 Baldwin y Fred propusieron el nombre *Rhizobium* para estos aislamientos. Las bacterias del género *Rhizobium* fueron las primeras en ser añadidas como inoculante por más de 100 años a diversos cultivos agrícolas, con resultados exitosos en muchos de los casos (Brockwel, 1962; Roughley, 1970).

En general, cada rizobio es capaz de formar nódulos en un número limitado de leguminosas y cada planta leguminosa es nodulada por un pequeño grupo de rizobios (Denison, 2000). Esto indica que la interacción simbiótica entre rizobios y leguminosas para generar nódulos fijadores de nitrógeno tiene un alto grado de especificidad.

Las células bacterianas dentro de los nódulos adoptan formas irregulares y son conocidas como bacteroides. Estos bacteroides son las formas diferenciadas que fijan nitrógeno (Sutton *et al.*, 1981), además difieren de los rizobios de vida libre tanto en su morfología, como en ciertas características bioquímicas. La diferenciación del rizobio a bacteroide va acompañada por una disminución en la rigidez y en el espesor de la envoltura celular (MacKenzie *et al.*, 1973), dando como consecuencia un mayor tamaño y una morfología irregular (Brewin *et al.*, 1985; Roth *et al.*, 1988); además de un aumento en el contenido de ácidos nucleicos (Bisseling *et al.*, 1977). Estos bacteroides son nutricionalmente dependientes de la planta hospedadora, siendo el suministro de carbono por parte de la planta esencial para la fijación biológica de nitrógeno (McRae *et al.*, 1989). En el bacteroide se lleva a cabo la reducción del dinitrógeno hasta amonio, el cual es exportado a la célula vegetal.

1.1. El proceso de nodulación

El establecimiento de una interacción simbiótica efectiva entre rizobios y leguminosas es un proceso complejo y requiere de un reconocimiento mutuo mediado por el intercambio de varias señales que permiten el avance de la asociación y conducen

finalmente a la formación de los nódulos fijadores de nitrógeno (Hirsch, *et al.*, 1992; Long, 1996). Si bien la formación del nódulo maduro es un proceso continuo, para facilitar la comprensión se ha sido dividido en tres etapas que pueden nombrarse de la siguiente manera (Figura 1):

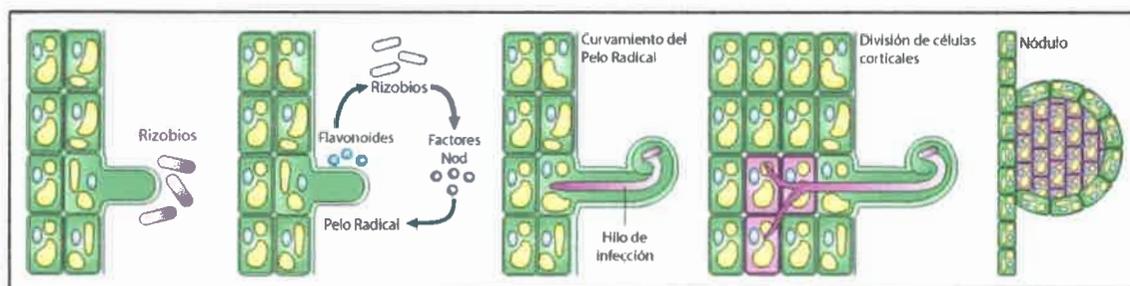


Figura 1. Proceso de nodulación en leguminosas. Señales liberadas por la planta hospedadora desencadenan una serie de acontecimientos que conducen a la invasión de células de la raíz de la planta por los rizobios. Adaptado de Deakin & Broughton 2009.

1.2. Preinfección:

Antes de llevarse a cabo la infección de las raíces de leguminosas por los rizobios, debe haber un crecimiento bacteriano en la rizósfera (Hirsch *et al.*, 1992), inducido por compuestos exudados por las raíces de las leguminosas. Estos compuestos, entre los que se encuentran ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos y flavonoides, actúan como quimioatrayentes y estimulan el crecimiento de los rizobios circundantes a la raíz. De especial importancia durante las etapas iniciales son los compuestos de tipo flavonoide, ya que son la primera señal producida por la planta dentro de este “diálogo molecular” entre los rizobios y las leguminosas. Los flavonoides se unen a las proteínas bacterianas NodD, que se expresan constitutivamente, las cuales actúan como un regulador transcripcional induciendo la transcripción de genes *nod*, también conocido como Factores Nod (Bernett & Fischer 2006; Ferguson *et al.*, 2010). Los genes del operón *nodABC* codifican las proteínas necesarias para sintetizar el esqueleto del factor Nod (Jones *et al.*, 2007). En la mayoría de las especies de *Rhizobium* y *Sinorhizobium* estudiadas, los genes de *nod* se encuentran en el plásmido simbiótico (pSym), en donde también se encuentran genes *nif* y *fix* necesarios para la fijación de nitrógeno (Lindström *et al.*, 2002). Por su parte, *M. loti*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, presentan estos genes simbióticos en el cromosoma (Appelbaum *et al.*, 1988; Goethals *et al.*, 1989).

Los factores Nod disparan múltiples respuestas que son esenciales para la invasión de los rizobios a la leguminosa hospedadora, entre ellas la deformación de pelos radicales



e inducción de un primordio de nódulo, el incremento de los niveles intracelulares de calcio en los pelos radicales y alteraciones en el citoesqueleto de los mismos (Timmers *et al.*, 1998; Sieberer *et al.*, 2005).

Luego de la colonización de la superficie de la raíz, los rizobios se adhieren principalmente a los pelos radicales jóvenes. En el proceso de adhesión pueden estar implicados componentes superficiales de las células bacterianas ya sean de naturaleza sacárida o proteica, como exopolisacáridos (EPS) y ricadhesinas, respectivamente. Por parte de la planta, parecen ser necesarios compuestos como lectinas (Swart *et al.*, 1994). Estas lectinas estarían implicadas en la adhesión utilizando los componentes superficiales bacterianos como sitios de unión (Dazzo & Truchet 1987; Kijne *et al.*, 1997).

1.3. Infección y Formación del Nódulo:

Luego de que la leguminosa percibe los factores Nod secretados por los rizobios, y de la adsorción de estos a los pelos radicales emergentes, la punta de los mismos se curva fuertemente y los rizobios quedan atrapados en dicha curvatura. Allí ocurre la hidrólisis de la pared celular de las células de la raíz, la membrana plasmática se invagina y se deposita pared celular formando una estructura tubular. Esta estructura es conocida como hilo de infección y dentro del mismo, los rizobios penetran en la raíz de la planta (Kijne, 1992; Jones *et al.*, 2007). Desde el extremo del hilo de infección, los rizobios son incorporados al citoplasma de las células de la raíz por endocitosis (Roth & Stacey 1989). Mediante este proceso, las bacterias adquieren una membrana que las rodea proveniente de la planta, conocida como membrana peribacteroidal (Robertson & Lyttleton, 1982; Roth *et al.*, 1988). Esta membrana resulta fundamental para el intercambio de metabolitos entre la bacteria y la planta. Una vez dentro de la célula vegetal, los rizobios pueden dividirse una o pocas veces más. La membrana peribacteroidal se divide en sincronía con la división de la bacteria, por lo que finalmente cada bacteroide quedará encerrado en su propia membrana formando la unidad simbiótica denominada simbiosoma (Giles *et al.*, 2011).

Simultáneamente a la formación del hilo de infección, que se describió anteriormente, determinadas células del córtex sufren una serie de cambios morfológicos, como reorganización de los microtúbulos, migración del núcleo hacia el centro de la célula y la formación radial de nuevas paredes celulares, lo que se traduce en una

reactivación de la actividad mitótica, que originará el primordio nodular (Yang *et al.*, 1994; Oldroyd *et al.*, 2011).

Dependiendo de cuáles sean las células del córtex que se dividan, se originará un nódulo de tipo indeterminado o determinado. Los primeros tienen un meristema apical persistente que se origina como consecuencia de la actividad mitótica de células localizadas en la parte interna del córtex. Este tipo de nódulos indeterminados son característicos de leguminosas de clima templado, como alfalfa y arveja. En cambio, las leguminosas de origen tropical, tales como soja y poroto, forman nódulos determinados en los que la actividad mitótica del córtex externo de la raíz cesa durante el desarrollo, siendo la expansión celular la responsable de la forma globosa del nódulo (Vasse *et al.*, 1990).

1.4. Fijación Biológica de Nitrógeno

La FBN es un proceso enzimático por el cual algunos microorganismos procariontes, los diazotrofos, son capaces de reducir el N₂ atmosférico hasta amonio (NH₄⁺), incorporándolo de este modo a la biosfera en una forma asimilable por las plantas. La capacidad de los diazotrofos para fijar N₂ deriva de un complejo enzimático llamado nitrogenasa. Dicho complejo está constituido por dos componentes, un homodímero de una ferroproteína codificada por el gen *nifH* y un tetrámero de una molibdo-ferro-proteína codificada por los genes *nifD* y *nifK*. (Halbleib & Ludde 2000). Este proceso de fijación de nitrógeno puede resumirse según la siguiente reacción:



Para la planta, el nódulo radicular es un órgano nuevo, que si bien genera fuente de nitrógeno, a su vez demanda una fuente de carbono. La sacarosa es dicha fuente de carbono y es transportada desde las hojas hasta los nódulos. La forma en que el nitrógeno es transportado desde el nódulo al resto de la planta varía según el tipo de leguminosa.

Las que generalmente desarrollan nódulos indeterminados, exportan nitrógeno en forma de amidas; mientras que las leguminosas que desarrollan nódulos determinados, por lo general exportan nitrógeno bajo la forma de ureídos (Burns & Hardy 1975; Giles *et al.*, 2011).

2. Polisacáridos bacterianos requeridos para la simbiosis

Ya hemos mencionado previamente que los rizobios son un grupo de bacterias Gram negativas del suelo, que tienen la capacidad de interactuar específicamente con las raíces de plantas leguminosas para formar nódulos fijadores de nitrógeno. La superficie celular de estas bacterias consiste de una membrana citoplasmática interna y de una segunda membrana (externa), ambas separadas por el espacio periplásmico y peptidoglicano. La membrana externa contiene proteínas y moléculas de carácter sacarídico, entre ellas lipopolisacáridos (LPS) y polisacáridos capsulares (CPS o KPS) (Raetz & Whitfield 2002). Además los rizobios liberan al medio extracelular exopolisacáridos (EPS) y β -1,2-glucanos cíclicos. Si bien los factores Nod tienen un papel clave en la inducción de las etapas iniciales de nodulación, mientras transcurre la interacción simbiótica existe un estrecho contacto entre bacteria y planta a lo largo de todo el proceso. Por esto, las estructuras superficiales de las bacterias han sido muy estudiadas, principalmente los compuestos de naturaleza hidrocarbonada como también los componentes de tipo proteico.

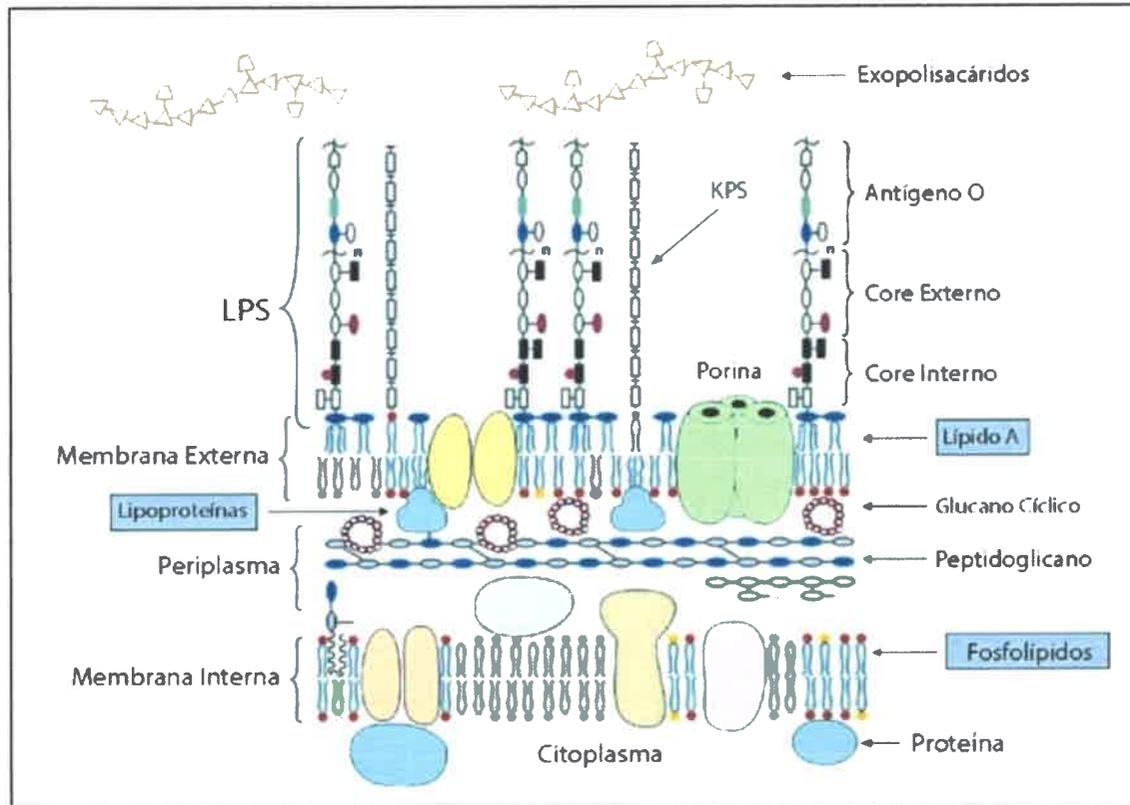


Figura 2. Esquema de la superficie celular de rizobios, mostrando la posición de los polisacáridos de superficie que están involucrados en la simbiosis. Adaptado de Raetz & Whitfield 2002

Dentro de los polisacáridos superficiales de los rizobios a los que se les ha atribuido importancia en la simbiosis se encuentran los exopolisacáridos (EPS) asociados a la superficie externa pero principalmente secretados al medio extracelular, los β -glucanos cíclicos, que son acumulados en el espacio periplásmico y liberados al medio extracelular, el polisacárido capsular (CPS o KPS) que forma una cápsula sobre la superficie celular, y el lipopolisacárido (LPS) principal componente de la membrana externa de todas las bacterias Gram negativas (Figura 2) (Fraysee *et al.*, 2003).

2.1. Exopolisacáridos (EPS)

Las cepas silvestres de rizobios suelen producir grandes cantidades de exopolisacáridos y forman colonias muy mucosas en los medios de cultivo comúnmente empleados en los laboratorios. La composición de los exopolisacáridos rizobianos es específica de especie; son polímeros de azúcares simples que pueden estar sustituidos con residuos de naturaleza no sacárida. Tanto la síntesis, como la modificación, polimerización y exporte a la superficie de las unidades repetitivas de los exopolisacáridos se encuentran controladas por grupos de genes denominados *exo /exs /exp / o pps* y se pueden encontrar localizados en el cromosoma bacteriano o en sus megaplásmidos (Fraysee *et al.*, 2003; Skorupska *et al.*, 2006).

Uno de los exopolisacáridos rizobianos más estudiados es el succinoglicano (EPS I) producido por *S. meliloti*. En la cepa 1021, de esta especie, el EPS I es un polímero de subunidades de octosacáridos repetidos (siete Glc y una Gal) con sustituciones de tipo acetato, piruvato y succinato. La síntesis de EPS I resulta incrementada cuando las bacterias son crecidas bajo limitaciones de ciertos nutrientes como nitrógeno, fósforo o azufre (Ruberg *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 1996;). Dependiendo de las condiciones de cultivo se pueden observar dos formas moleculares de EPS I, una de bajo peso molecular (LMW EPS I) y otra de alto peso molecular (HMW EPS I).

S. meliloti en ciertas condiciones también puede producir un segundo exopolisacárido, el galactoglucano (EPS II). A diferencia del EPS I, el EPS II es un polímero de disacáridos de Glc y Gal con sustituciones de tipo acetato o piruvato. Normalmente los cultivos de *S. meliloti* producen grandes cantidades de EPS I y no producen EPS II, pero cuando existen limitaciones de fósforo en el medio de cultivo, son capaces de producir EPS II (Zhan *et al.*, 1991).

Las cepas de *R. leguminosarum*, biovar *trifolii* y *viciae* conservan el mismo octasacárido compuesto por Glc/GlcUA/Gal en proporciones molares 5:2:1. Sin embargo ciertas cepas de *R. leguminosarum* secretan EPS que pueden presentar variaciones tanto en el contenido de azúcares como en su grado de polimerización. También se han reportado sustituciones piruvato y acetato que difieren según las cepas de *R. leguminosarum* (Skorupska *et al.*, 2006).

Por otra parte *B. japonicum* 2143, en presencia de arabinosa, gluconato o manitol en el medio, produce el EPS I típico de su especie, compuesto por Man/Glc/Gal/ GalUA (1:2:1:1), pero en cultivos en presencia de malato, el EPS cambia su estructura a una forma compuesta solamente por Gal acetilada y esta nueva estructura es conocida como EPS II (Karr *et al.*, 2000). Luego de numerosas investigaciones realizadas por más de treinta años, aún no se ha dilucidado el verdadero rol de los exopolisacáridos en la simbiosis. Sin embargo se han postulado posibles funciones biológicas de los mismos, entre ellas: protección de las bacterias frente a condiciones medioambientales no favorables, también estaría jugando un rol en los primeros estadios de la infección a la planta, estando involucrado en la adhesión de las bacterias a los pelos radiculares, la formación del hilo de infección, liberación de las bacterias del hilo de infección, desarrollo del bacteroide, supresión de respuestas de defensa y protección contra compuestos antimicrobianos por parte de la planta (Becker & Pühler 1998; Fraysse *et al.*, 2003; Skorupska *et al.*, 2006; Jones, 2012).

2.2. Glucanos cíclicos

Son polímeros cíclicos de Glc que en *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Agrobacterium* se encuentran unidos por enlaces glicosídicos β 1-2, sin embargo, en *Bradyrhizobium* los residuos de Glc están unidos tanto por enlaces de tipo β -1,3, como por enlaces β -1,6. El grado de polimerización de estas moléculas varía entre 17 y 40 en *S. meliloti* (Breedveld & Miller 1994) y entre 10 y 13 residuos de azúcares en *B. japonicum* (Choma & Komaniecka 2011). Si bien estas son macromoléculas que se encuentran casi exclusivamente en la familia Rhizobiaceae, también se han encontrado en bacterias patógenas de mamíferos como *Brucella* (Bundle *et al.*, 1988; Martirosyan *et al.*, 2012) y de plantas como *Xanthomonas* (Amemura & Cabrera-Crespo 1986). Los glucanos cíclicos se encuentran predominantemente en el periplasma (Breedveld *et al.*, 1992), pero

también se exportan al medio extracelular. Dicho exporte puede variar dependiendo de la especie, el medio de cultivo, la temperatura y la fase de crecimiento de la bacteria (Hisamatsu, 1992). Los β -1,2-glucanos cíclicos pueden adquirir carga mediante la unión de sustituyentes tales como fosfoglicerol, ácido succínico y ácido metilmalónico. Los β -1,6- β -1,3 glucanos cíclicos de *B. japonicum*, si bien no poseen carga, pueden tener una o dos sustituciones de fosfocolina por anillo y se encuentran altamente decorados con acetato y succinato (Rolin *et al.*, 1992; Choma & Komaniacka 2011).

Se ha demostrado que la biosíntesis de los β -1,2- glucanos cíclicos está regulada por la baja osmolaridad del medio. Esta regulación desencadena un aumento de la síntesis de β -1,2-glucanos cíclicos en diferentes cepas de *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium* y *Bradyrhizobium* (Dylan *et al.*, 1990). A partir de ello se ha sugerido que los β -1,2-glucanos cíclicos tendrían un rol importante en la protección de los rizobios frente a condiciones de baja osmolaridad. Los β -1,2-glucanos cíclicos podrían tener funciones asociadas a la osmoprotección de las bacterias durante la infección, dado que el microsimbionte debe enfrentar ambientes de diferente osmolaridad (Miller *et al.* 1986). La modificación de las cantidades de β -glucano cíclico en el espacio periplásmico es una estrategia que le permite a la bacteria adaptarse a diferentes ambientes. Otro de los posibles roles que se ha sugerido para los glucanos cíclicos es el de regular ciertas respuestas de la planta. Para el desarrollo efectivo de un nódulo fijador de nitrógeno, es esencial que no se desencadene contra el microsimbionte una respuesta de defensa por parte de la planta (Brewin *et al.*, 1993; Niehaus *et al.*, 1993).

2.3. Polisacáridos capsulares (KPS)

En la superficie bacteriana también se encuentran presentes polisacáridos capsulares, o KPS; los cuales son componentes comunes de las enterobacterias y a diferencia de los EPS y glucanos cíclicos están anclados a la superficie celular. En bacterias patógenas se ha propuesto que tanto los KPS como los LPS tienen la función de protección frente a los mecanismos de defensa de sus hospedadores. A diferencia de los LPS, los polisacáridos capsulares se encuentran anclados a fosfolípidos en la membrana externa de la bacteria. Su porción sacárida está compuesta mayormente por el monosacárido ácido 2-ceto-3-deoxioctanoico (Kdo) (Petrovics *et al.*, 1993). Algunos rizobios producen polisacáridos ricos en Kdo que son análogos a los KPS de *E. coli*, y

forman una cápsula alrededor de la célula manteniendo al microorganismo en condiciones de hidratación, lo cual proporcionaría a la bacteria resistencia a condiciones de desecación. Estas últimas condiciones se presentan comúnmente en la rizósfera (Frayssé *et al.*, 2003).

Las primeras estructuras descritas de polisacáridos capsulares en rizobios fueron las de *Sinorhizobium fredii* USDA205 y *S. meliloti*, las cuales son estructuralmente análogas al antígeno K del subgrupo II encontrado en *E. coli* (Rehus, *et al* 1993). Estos difieren en su tamaño y el contenido de unidades de hexosas unidas a residuos de Kdo u otros azúcares relacionados, como ser ácido neuramínico o pseudamínico. Los KPS son antígenos específicos de cepas mientras que los EPS son conservados dentro de las especies. La producción de uno o más KPS dentro de una misma cepa puede depender de las condiciones de crecimiento donde son cultivadas las células. Por otra parte el flavonoide inductor de los genes *nod* en *S. meliloti*, conocido como epigenina causa un aumento en la producción del antígeno K secundario (con alto contenido en 2-O- MeMan) en *S. fredii* USDA205 (Rehus *et al.*, 1994).

El rol de los KPS fue estudiado en detalle en la interacción de *S. meliloti* y alfalfa. Los resultados de estas investigaciones sugieren que podría estar actuando en esta simbiosis en particular, de dos maneras diferentes: una activa (señal) y otra pasiva (enmascaramiento). El polisacárido capsular estaría involucrado en la protección de la bacteria contra los productos de defensa de la leguminosa hospedadora o de microorganismos como fagos. Cuando el mutante *exoB* (que es incapaz de producir EPSII) de *S. meliloti* Rm41 fue expuesto a trece fagos distintos, mostró ser más resistente solamente a uno de estos fagos (comparado a la cepa salvaje), en cambio fue más sensible a los otros doce. Este rol pasivo podría atribuirse a que el polisacárido capsular estaría actuando como determinante en el espectro del rango de hospedador (Campbell *et al.*, 1998). Además, una delección en el *cluster* de genes *rkpM*, *rkpN* y *rkpO* en *S. meliloti* NGR 234, involucrado en la síntesis de ácido pseudamínico, resultó en la incapacidad de producir KPS y como consecuencia mostró una nodulación significativamente reducida (Le Quéré *et al.*, 2006). Por otro lado se demostró que la infiltración de KPS purificados a raíces de alfalfa produjo una acumulación de transcritos de genes que codifican enzimas de la vía biosintética de isoflavonoides. Estos resultados sugieren que los KPS podrían jugar un rol significativo en el reconocimiento temprano de *S. meliloti* por las raíces de alfalfa (Becquart-de-kozak *et al.*, 1997; Frayssé *et al.*, 2003).

2.4. Lipopolisacáridos

Como todas las bacterias Gram-negativas, los rizobios poseen una pared externa de composición asimétrica, en donde la cara interna está compuesta por fosfolípidos y la monocapa externa, además de éstos también posee Lipopolisacáridos (LPS).

Los Lipopolisacáridos son glicolípidos anfipáticos complejos y constituyen el 3,5% del peso seco total de una célula promedio de *Escherichia coli* y el 75% de la superficie de la membrana externa (Neihardt *et al.*, 1990). La estructura general está formada por tres dominios: Lípido A, Core y Antígeno O. Gracias a los LPS la membrana externa tiene la capacidad de excluir compuestos hidrofóbicos, siendo así una barrera de permeabilidad protectora contra muchos antibióticos (Lerogue & Vanderleyden 2002; Firdich & Whitfield, 2005).

La mayor parte del conocimiento sobre los LPS ha derivado de estudios sobre las especies patógenas de la familia *Enterobacteriaceae* (Raetz & Whitfield 2002). Sin embargo, la importancia agronómica de la interacción entre los rizobios con las plantas ha promovido un gran número de estudios sobre los LPS de estas bacterias. En los últimos años el análisis de los LPS en la familia *Rhizobiaceae* se ha enfocado no sólo en la descripción de su composición lipídica y sacárida, sino también en la determinación de la estructura completa de uno o varios de sus dominios. Asimismo, se han realizado avances en la determinación de algunos pasos metabólicos para la biosíntesis de los LPS en estas bacterias.

2.4.1. Lípido A

El lípido A, debido a su naturaleza hidrofóbica, permite el anclaje de los LPS a la cara superficial de la membrana externa de la bacteria. Como se mencionó anteriormente, los LPS de enterobacterias han sido extensamente estudiados y por este motivo constituyen el arquetipo con el que se comparan todos los demás. En estas bacterias el Lípido A está constituido de un disacárido de Glucosamina (GlcN) unidas por un enlace β (1'-6), al que están unidos ácidos grasos en las posiciones 2, 3, 2', 3' que anclan las moléculas de LPS a la membrana externa (Raetz & Whitfield 2002; Wang & Quinn 2010).

Al comparar las estructuras del Lípido A dentro de la familia *Rhizobiaceae* se observa una gran heterogeneidad en los patrones de acilación y de fosforilación. Gran

parte de esta heterogeneidad se encuentra en la unidad proximal del disacárido. En general, el patrón de acilación es diferente al que presenta el típico Lípido A de enterobacterias (Raetz & Whitfield 2002). Además los rizobios presentan un ácido graso hidroxilado extra largo (por ejemplo el ácido 27- hidroxioctacosanoico en *Rizobiaceae*) que en algunos casos es lo suficientemente largo para atravesar la totalidad de la membrana (Figura 3). Este ácido graso extra largo está unido a otro ácido graso por una unión acilo-oxi-acilo, y éste a su vez se une por un enlace amida a la GlcN distal (Hollingsworth & Carlson 1989). También se han encontrado ácidos grasos más largos aún, como el ácido 29-hidroxitriacontanoico de treinta átomos de carbono descrito en *R. tropici* (Gil Serrano *et al.*, 1994). Por su parte en los patógenos *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* (Moreno *et al.*, 1990) y *Bartonella henselae* ATCC49882 (Zähringer *et al.*, 2004) también se ha descrito la presencia de dichos ácidos grasos. Por su parte en *Bradyrhizobium elkanii* se ha reportado que el lípido A presenta tres residuos de Man unidos al dímero de GlcN, además posee dos ácidos grasos extra largos (Komaniecka *et al.*, 2014). Asimismo, en una cepa de *Bradyrhizobium* fotosintética simbiote de leguminosas del género *Aeschynomene*, se ha encontrado unido covalentemente a una de las colas de ácidos grasos extra largos, una molécula de hopanoide; la cual le confiere mayor resistencia al estrés abiótico (Silipo *et al.*, 2014).

Se ha especulado sobre el papel de este ácido graso en la interacción entre estas bacterias y sus hospedadores, proponiendo que podría estabilizar la membrana externa, y proteger ante la respuesta de defensa del hospedador o durante el estrés ácido u osmótico que probablemente enfrenten estas bacterias en los compartimientos intracelulares (Sharypova *et al.*, 2003).

Se han obtenido mutantes de *S. meliloti* en los genes *lpxXL* y *acpXL*, que codifican respectivamente para una acil-transferasa y un acil-transportador, involucrados en la biosíntesis de estos ácidos grasos extraordinariamente largos. En dichos mutantes se observó que eran incapaces de incorporar este ácido graso extra largo al lípido A y a su vez resultaron ser más sensibles *in vitro* a estrés osmótico, ácido y a detergentes. Además presentan una menor competitividad y un retardo en la inducción de la nodulación en comparación a la cepa silvestre. Sin embargo, los nódulos tienen una morfología normal y fijan nitrógeno. Estos resultados sugieren que si bien el ácido graso extra largo es importante, no es indispensable para establecer una simbiosis efectiva (Sharypova *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2005; Haag *et al.*, 2009).

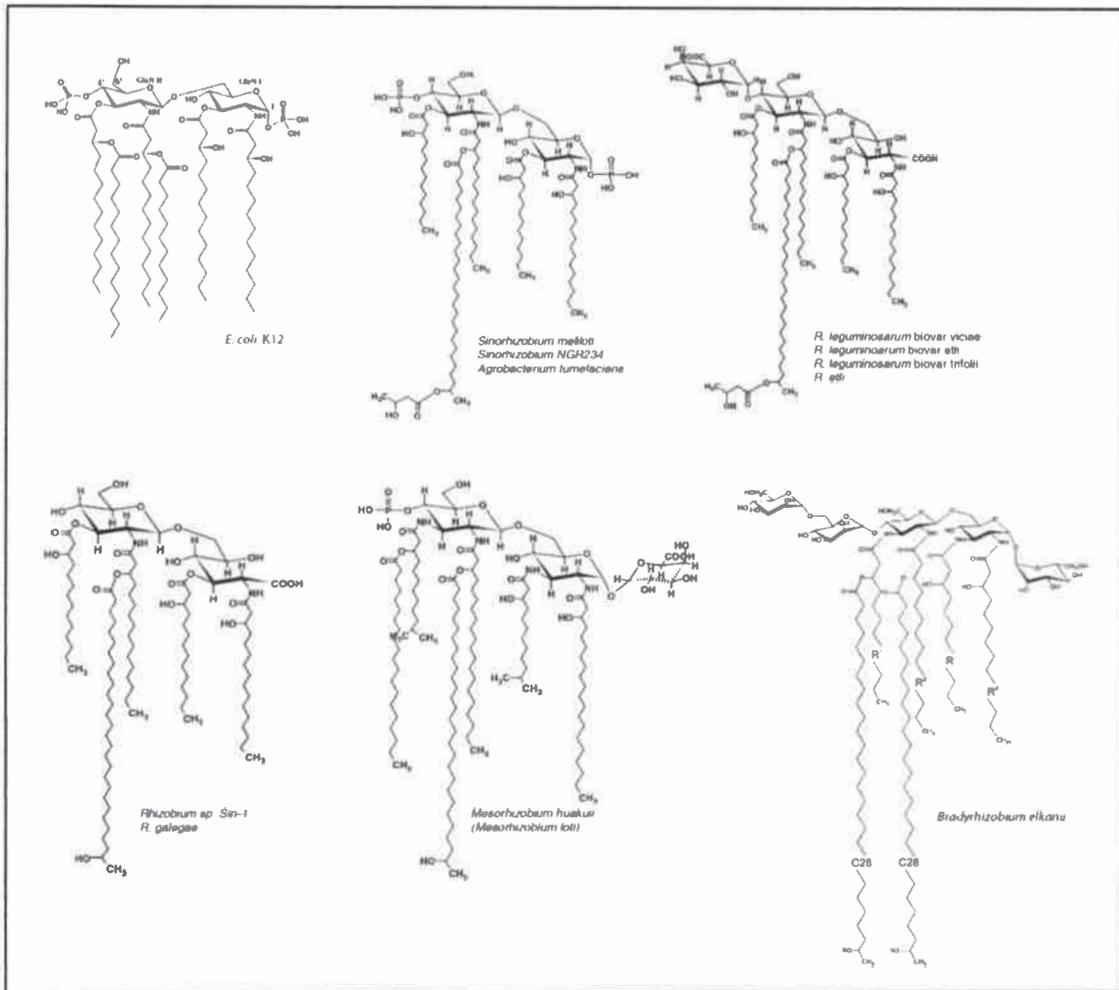


Figura 3. Estructura del lípido A de *E. coli* y las moléculas de Lípido A más comunes producidas por algunos miembros de la familia *Rhizobiaceae*. Los números dentro de los círculos indican la longitud de los grupos acilo. (Adaptado de Carlson *et al.*, 2010 y Komaniecka *et al.*, 2014).

Asimismo se han encontrado diferencias con respecto a enterobacterias en el disacárido de GlcN, entre las cuales se destacan la ausencia de grupos fosfatos en las posiciones 1 y 4' en *R. etli* CE3. La posición 4' está sustituida con un residuo de GalUA y la GlcN proximal está oxidada a aminogluconato (Forsberg & Carlson 1998; Que-Gewirth *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2012).

Brucella melitensis, *B. abortus* y *Bartonella henselae* son bacterias patógenas intracelulares de mamíferos. Las primeras tienen la capacidad de sobrevivir y multiplicarse dentro de los fagocitos, en cambio *B. henselae* es capaz de infectar células endoteliales, produciendo en casos agudos tumores vasculares. En estas tres especies se describió que la estructura del lípido A se encuentra formada por el dímero de diaminoglucosa unidas por un enlace β -(1'-6), típico de enterobacterias (Moreno., *et al* 1990, Gomes Cardoso *et al.*, 2006; Zähringer *et al.*, 2004).

2.4.2. Core

En *E. coli* como en *R. leguminosarum* y *Brucella* spp el lípido A se une al oligosacárido núcleo o core por medio de residuos Kdo que están unidos al O-6 de la GlcN distal. Este core es conceptualmente dividido en dos regiones: core interno (próximo al lípido A) y core externo, al cual se une el antígeno O. Dentro de los géneros o las familias las estructuras de los cores tienden a mantenerse conservadas (Moreno *et al.*, 1990; Forsberg & Carlson 1998).

En enterobacterias el core interno está compuesto mayoritariamente por residuos de Kdo y L, glicero-D-manoheptosa (L,D-Hep), esta estructura básica del core puede estar habitualmente decorada con otros azúcares y grupos fosfato (Mamat *et al.*, 2011).

El core es el dominio de los LPS que ha sido estudiado con menor detalle a nivel estructural. Hasta la fecha no se han determinado muchas estructuras completas de esta subunidad en la familia *Rhizobiaceae*. La primera estructura del core resuelta completamente correspondió a *R. etli* CE3. En esta bacteria el core está constituido por tres residuos de Kdo, tres de GalUA, uno de Man y uno de Gal; y está unido al lípido A mediante uno de los Kdo, y otro de estos residuos de Kdo ocupa la posición terminal donde se une el Antígeno O (Forsberg & Carlson 1998).

La estructura del core interno de las enterobacterias difiere a la de la familia *Rhizobiaceae* (Figura 4). Como se mencionó anteriormente, los primeros poseen grupos fosfatos cuyas cargas negativas permitirían mantener unidas las moléculas de LPS entre sí, utilizando cationes divalentes como intermediarios, y así estabilizar la membrana externa (Friedrich & Whitfield 2005). Por su parte el core de *R. leguminosarum* no posee dichos grupos fosfatos, sin embargo la función de éstos la asumirían los grupos carboxilos de los residuos de GalUA (Brown *et al.*, 2012).

Estudios realizados por Lucas *et al* (1996) demostraron que *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *R. etli* CE3 presentan un core conservado ya que anticuerpos específicos para el core de *R. leguminosarum* reconocen los LPS de *R. etli*. En contraste, los LPS de *R. tropici*, *S. fredii*, *Sinorhizobium* NGR234 y *A. tumefaciens* C58 no fueron reconocidos por estos anticuerpos, sugiriendo que la estructura de sus core difiere de la de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *R. etli* CE3..

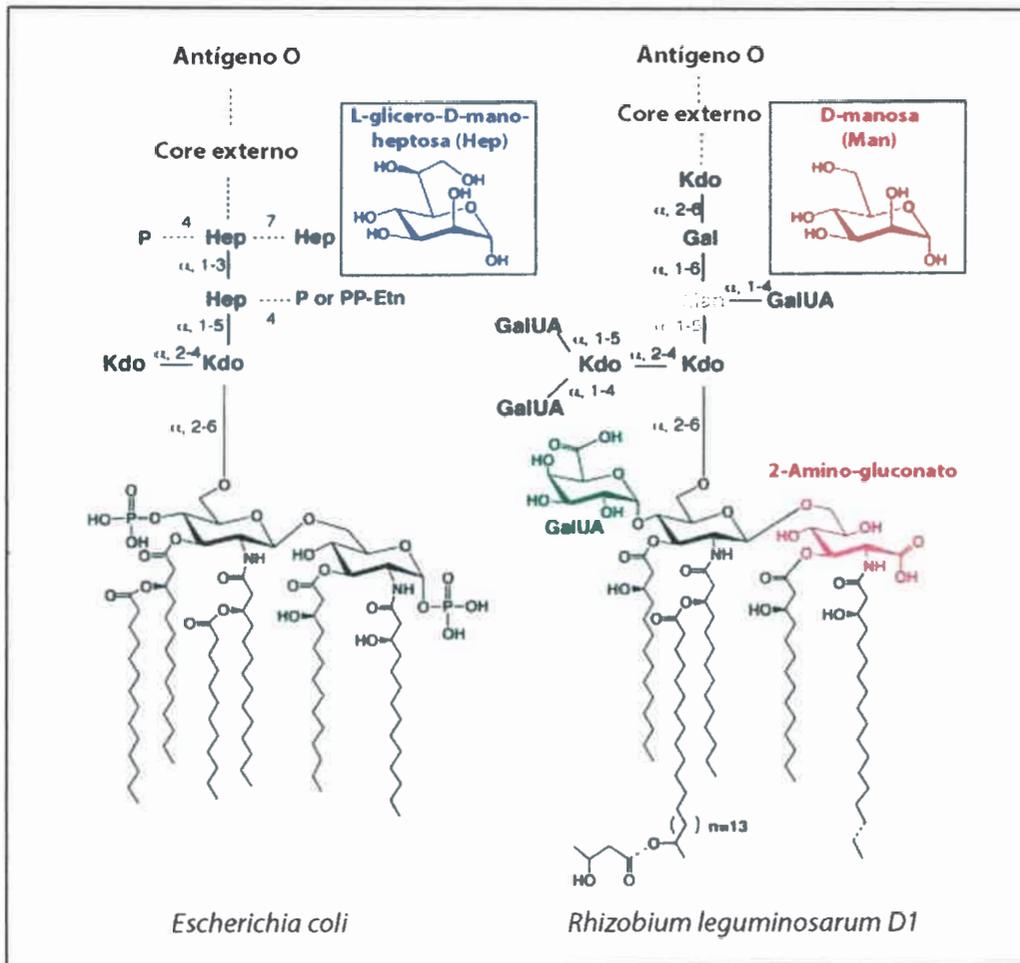


Figura 4. Estructura del Core-Lípido A de *E. coli* y *R. leguminosarum*. (Kanipes, *et al.*, 2003b).

Si bien no se ha determinado la estructura del core de alguna cepa de *Sinorhizobium*, sí se ha podido dilucidar la composición de azúcares en cepas de *S. meliloti* Rm1021 y *S. fredii*. Ambas poseen Kdo, Glc, Gal, GlcUA, GalUA y Man. A diferencia de *Rhizobium* spp., el LPS rugoso es la forma más abundante producida por *Sinorhizobium* spp., y por este motivo el principal determinante antigénico de sus LPS corresponde al core (Reuhs, *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 2003).

Asimismo se han determinado las estructuras del core de varias especies de *Agrobacterium*. Por un lado *Agrobacterium larrymoorei*, que sólo produce LPS rugoso y causa tumores aéreos en *Ficus benjamina*, contiene azúcares encontrados en otros core de la familia *Rhizobiaceae* tales como Kdo, Gal y Glc, pero se reportó que además posee Rha; los ácidos urónicos están presentes como uronamidas y el residuo distal es una quinovosamina (Molinario *et al.*, 2003). De Castro *et al* (2006) describieron la estructura del core de *A. tumefaciens* TT111, esta cepa produce tumores en un amplio espectro de

plantas dicotiledóneas. En este caso el core está compuesto de Man y un tetrasacárido de Rha unidos respectivamente al Kdo proximal. Además se ha determinado la estructura del core de *A. radiobacter*, la cual está compuesta por un tetrasacárido de Man (De Castro *et al.*, 2008). A pesar de la gran heterogeneidad en la estructura del core dentro de las distintas especies de *Agrobacterium*, se observa que el primer residuo de azúcar unido al Kdo, siempre corresponde a una Man.

En *Brucella melitensis*, el agente etiológico de la brucelosis en ovinos y caprinos, no se ha determinado completamente la estructura sacárida de su core, solo se ha reportado que posee Kdo, Man, Glc y quinovosamina (González *et al.*, 2008; Barquero-Calvo *et al.*, 2009).

En *Bartonella henselae* se ha descrito parcialmente el core interno, el cual consiste en un trómero ramificado que contiene un residuo de Glc unido al Kdo proximal por un enlace α -(1-5) y a su vez este Kdo se une a otro residuo homólogo por un enlace α -(2-4), formándose así la estructura ramificada (Zähringer *et al.*, 2004). Por otra parte, solo se ha descrito una pequeña porción del core del LPS de *B. japonicum* 61A101C, el cual posee un residuo de Glc o Man unidos al Kdo (Carlson & Krishnaiah 1992). En cambio, en *Mesorhizobium loti* aún se ha reportado la estructura del core, pero se conoce que posee Hep, GlcN, GalA, Gal, GlcA y Glc (D'Antuono *et al.*, 2005).

El precursor Kdo₂-lípidio IV_A representa la subestructura mínima del LPS requerida para la viabilidad bacteriana. Sin embargo los tres dominios del LPS son importantes para la virulencia durante las etapas de infección de plantas y animales (Raetz & Whitfield 2002).

2.4.3. Antígeno O

El antígeno O es un polisacárido constituido por unidades de monosacáridos u oligosacáridos repetidos, está unido al core y es la subunidad distal y más variable de la molécula de LPS. Esta variabilidad surge por la naturaleza, el orden y los enlaces de los diferentes azúcares que lo componen. La unidad repetitiva puede ser un monosacárido o un oligosacárido de hasta 5 residuos que pueden ser azúcares comunes como Glc, Ara y Man, sin embargo es muy común la presencia de desoxihexosas y aminoazúcares. También sustituciones como metilaciones y acetilaciones, que añaden complejidad a la molécula, son frecuentes (Kannenberg *et al.*, 1998). El Antígeno O puede no estar

presente en algunas especies e incluso en algunas cepas de una misma especie. Cuando esto sucede, generalmente las colonias presentan una apariencia rugosa y el LPS producido se denomina LPS Rugoso o LPS II, ya que migra más rápido en geles de SDS-PAGE que las moléculas con Antígeno O, que son llamadas LPS Liso o LPS I (Raetz & Whitfield 2002) (Figura 5).

El rol primario que cumple el Antígeno O es la protección de la célula bacteriana del medio ambiente que la rodea; en bacterias patógenas este oligosacárido puede contribuir a la evasión del sistema inmune del hospedador, como así también a la invasión de las células blanco (Burns & Hull 1998). En cuanto al rol del Antígeno O en el proceso de nodulación, existen trabajos con mutantes de *R. leguminosarum* y *R. etli* que sugieren que éste componente del LPS es necesario para una correcta nodulación (Noel *et al.*, 2000). También se ha reportado que mutantes en *B. japonicum* carentes de antígeno O son incapaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno en plantas de soja (Lee *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014).

En contraste, estudios realizados con mutantes de *S. meliloti* (Clover *et al.*, 1989) y *R. galegae* (Lipsanen & Linstrom 1989) proponen que el Antígeno O no sería necesario para la simbiosis.

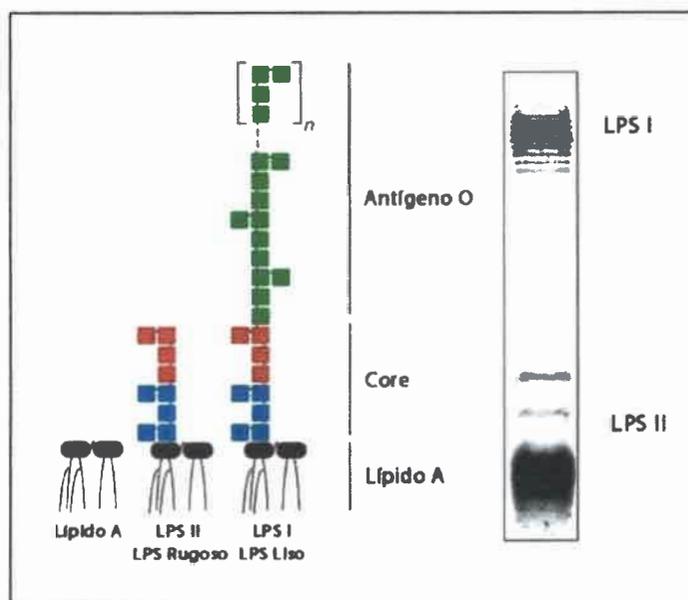


Figura 5. Diferentes formas del LPS de *E. coli* separados por SDS-PAGE. Adaptado de Whitfield & Trent 2014.

La biosíntesis del Antígeno O ocurre en la cara citoplasmática de la membrana interna, para lo cual se requieren enzimas encargadas de sintetizar los azúcares-

nucleótidos precursores y además glicosiltransferasas que los ensamblen (Raetz & Whitfield 2002).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amemura, A., Cabrera-Crespo, J.** (1986). Extracellular and low-Mr polysaccharides containing (1,2)- β -D-glucosidic linkages from strains of *Xanthomonas*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2443-2452.
- Appelbaum, E. R., Thompson, D. V., Idler, K., y Chartrain, N.** (1988). *Bradyrhizobium japonicum* USDA 191 has two *nodD* genes that differ in primary structure and function. *J. Bacteriol.* 170: 12-20.
- Baldwin, I., Fred, E.** (1929). Nomenclature of the root-nodule bacteria of the *leguminosae*. *J. Bacteriol.* 17: 141-150.
- Barquero-Calvo, E., Conde-Alvarez, R., Chacón-Díaz, C., Quesada-Lobo, L., Martirosyan, A., Guzmán-Verri, C., Iriarte, M., Mancek-Keber, M., Jerala, R., Gorvel, J.P., Moriyón, I., Moreno, E., Chaves-Olarte, E.** (2009). The Differential Interaction of *Brucella* and *Ochrobactrum* with Innate Immunity Reveals Traits Related to the Evolution of Stealthy Pathogens. *PLoS ONE.* 4(6).
- Becker, A., Puühler, A.** (1998). Production of exopolysaccharides. En: Spaink, H.P., Kondorosi, A. Hooykaas, J.J. The Rhizobiaceae. pp. 97-118. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Becquart-de Kozak, I., Reuhs, B. L., Buffard, D., Breda, C., Kim, J. S., Esnault, R., Kondorosi, A.** (1997). Role of the K-antigen subgroup of capsular polysaccharides in the early recognition process between *Rhizobium meliloti* and alfalfa leaves. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 114-123.
- Bernett, M.J., Fisher, R.F.** (2006). Global gene expression in the rhizobial-legume symbiosis. *Symbiosis.* 42:1-24.
- Bisseling, T., van den Bos, R., van Kammen, A., van der Ploeg, M., van Duijn, P., Houwers, A.** (1977). Cytofluorometrical determination of the DNA contents of bacteroids and corresponding brothcultured *Rhizobium* bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 101: 79-84.
- Breedveld, M. W., Miller, K. J.** (1994). Cyclic β -glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.* 58: 145-161.
- Breedveld, M. W., Zenenhuizen, L. P. T. M., Zehnder, A. J. B.** (1992). Synthesis of cyclic β -(1,2)-glucans by *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA-1: factors influencing excretion. *J. Bacteriol.* 174: 6336-6342.
- Brewin, N.J., Perroto, S., Kannenberg, E. L., Rae, A. L., Rathbum, E. A., Lucas, M. M., Kardailsky, I., Gunder, A., Bolaños, L., Donovan, N., Drøbak, B. K.** (1993). Mechanisms of cell and tissue invasion by *Rhizobium leguminosarum*: the role of cell surface interaction. En Nester, W., Verma, D.P.S. Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions. pp. 369-380. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.

Brewin, N. J., Robertson, J. G., Wood, E. A., Wells, B., Larkins, A. P., Galfre, G., y Butcher, G. W. (1985). Monoclonal antibodies to antigens in the peribacteroid membrane from *Rhizobium* induced root nodules of pea cross-react with plasma membranes and Golgi bodies. *EMBO J.* 4: 605-611.

Brockwel, J. (1962). Studies on seed pelleting as an aid to legume seed inoculation. *Austral J. Agronom.* 13: 638-649.

Brown, D., Forsberg, L., Kannenberg, E., Carlson, R. (2012). Characterization of galacturonosyl transferase genes *rgtA*, *rgtB*, *rgtC*, *rgtD*, and *rgtE* responsible for lipopolysaccharide synthesis in nitrogen-fixing endosymbiont *Rhizobium leguminosarum*: lipopolysaccharide core and lipid galacturonosyl residues confer membrane stability. *J Biol Chem.* 287(2):935-949.

Bundle, D. R., Cherwonogrodzky, J. W., y Perry M. B. (1988). Characterization of Brucella polysaccharide B. *Infect. Immun.* 56: 1101-1106.

Burns, S., Hull, S. (1998). Comparison of Loss of Serum Resistance by Defined Lipopolysaccharide Mutants and an Acapsular Mutant of Uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5. *Infect. Immun.* 66: 4244-4253.

Burns, R. C., Hardy, R. W. (1975). Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* 21: 1-189.

Campbell, G.O., Reuhs, B.L., Walker, G.C. (1998) Different phenotypic classes of *Sinorhizobium meliloti* mutants defective in synthesis of K antigen. *J. Bacteriol.* 180, 5432-5436.

Campbell, G., Sharypova, L., Scheidle, H., Jones, K., Niehaus, K., Becker, A., Walker, G. (2003). Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. *J. Bacteriol.* 185: 3853-62.

Carlson, R., Forsberg, L. S., Kannenberg, E. L. (2010). Lipopolysaccharides in Rhizobium-Legume Symbioses. En Wang, X., Quinn, P. (Eds). *Endotoxins: Structure, Function and Recognition.* (pp. 3-25). Springer Dordrecht Heidelberg London New York.

Carlson, R., Krishnaiah, B. (1992). Structures of the oligosaccharides obtained from the core regions of the lipopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* 61A101c and its symbiotically defective lipopolysaccharide mutant, JS314. *Carbohydr Res.* 2, 231:205-19.

Choma, A., Komaniecka, I. (2011) Characterization of cyclic β -glucans of *Bradyrhizobium* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Carbohydr. Res.* 346(13):1945-50.

Clover, R., Kieber, J., Signer, E. (1989). Lipopolysaccharide mutants of *Rhizobium meliloti* are not defective in symbiosis. *J. Bacteriol.* 171: 3961-3967.

D'Antuono, A. L., Casabuono, A., Couto, A., Ugalde, R. A., Lepek, V. C. (2005). Nodule development induced by *Mesorhizobium loti* mutant strains affected in polysaccharide synthesis. *Mol Plant Microbe Interact.* 18(5):446-57.

Dazzo, F.B., Truchet, G., (1987). Interactions of lectins and their saccharide receptors in the Rhizobium-legume symbiosis. *J. Membrane Biol.* 73: 1-16.

- Deaker, R., Roughley, R., Kennedy, I.** (2004). Legume seed inoculation technology-a review. *Soil Biol & Biochem* 36: 1275–1288.
- Deakin, W.J., Broughton, W.J.** (2009). Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat Rev Microbiol.* 7(4):312-20.
- De Castro, C., Carannante, A., Rosa, R., Liparoti, V., Molinaro, A., Parrilli, M.** (2006). Core oligosaccharide structure from the highly phytopathogenic *Agrobacterium tumefaciens* TT111 and conformational analysis of the putative rhamnan epitope. *Glycobiology.* 16(12): 1272-1280.
- De Castro, C., Molinaro, A., Lanzetta, R., Silipo, A., Parrilli, M.** (2008). Lipopolysaccharide structures from *Agrobacterium* and *Rhizobiaceae* species. *Carbohydr Res.* 11, (12): 1924-33.
- Denison, R. F.** (2000). Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *American Naturalist* 156:567–576.
- Dylan, T., Helinski, D. R., Ditta, G. S.** (1990). Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires β -(1,2)-glucans. *J. Bacteriol.* 172: 1400-1408.
- Ferguson, G.P., Datta, A., Carlson, R.W., Walker, G.C.** (2005). Importance of unusually modified lipid A in *Sinorhizobium* stress resistance and legume symbiosis. *Mol Microbiol.* 56: 68–80.
- Ferguson, B. J., A. Indrasumunar, S. Hayashi, Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E., Gresshoff, P.M.** (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology.* 52:61–76.
- Ferguson, G.P., Roop, R.M., Walker, G.C.** (2002). Deficiency of a *Sinorhizobium meliloti* BacA mutant in alfalfa symbiosis correlates with alteration of the cell envelope. *J Bacteriol.* 184(20):5625-32.
- Forsberg, L., Carlson, R.** (1998). The structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium etli* strains CE358 and CE359. The complete structure of the core region of *R. etli* lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 273:2747-57.
- Frayse, N., Couderc, F., Poinso, V.** (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270: 1365-1380.
- Friedrich, E., Whitfield, C.** (2005). Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the *Enterobacteriaceae*. *J. Endotoxin Research.* 11: 133-144.
- Gil-Serrano, A. M., Gonzalez-Jimenez, I., Tejero-Mateo, P., Romero-Vazquez, M. J., y Megias, M.** (1994). Analysis of the lipid moiety of lipopolysaccharide from *Rhizobium tropici* CIAT899, identification of 29-hydroxytriacontanoic acid. *J. Bacteriol.* 176: 2454-2457.
- Goethals, K., Gao, M., Tomekpe, K., Van Montagu, M., Holsters, M.** (1989). Common *nodABC* genes in nod locus I of *Rhizobium caulinodans*: nucleotide sequence and plant-inducible expression. *Mol. Gen. Genet.* 219: 289-298.

- Gomes Cardoso, P., Macedo, G.C., Azevedo, V., Costa Oliveira, S.** (2006). *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories*, 5:13.
- González, D., Grilló, M.J., De Miguel, M.J., Ali, T., Arce-Gorvel, V., Delrue, R.M., Conde-Alvarez, R., Muñoz, P., López-Goñi, I., Iriarte, M., Marín, C.M., Weintraub, A., Widmalm, G., Zygmunt, M., Letesson, J.J., Gorvel, J.P., Blasco, J., M. Moriyón, I.** (2008). *Brucellosis* Vaccines: Assessment of *Brucella melitensis* Lipopolysaccharide Rough Mutants Defective in Core and O-Polysaccharide Synthesis and Export. *PLoS ONE*. 3(7).
- González, J. E., York, G. M., Walker, G. C.** (1996). *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gene*. 179: 141-146.
- Haag, A.F., Wehmeier, S., Beck, S., Marlow, V., Fletcher, V., James, E.K., Ferguson, G.P.** (2009), The *Sinorhizobium meliloti* LpxXL and AcpXL Proteins Play Important Roles in Bacteroid Development within Alfalfa. *Journal of Bacteriology*. 191 (14): 4681–4686.
- Halbleib, C. M., Ludde, P. W.** (2000). Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.* 2000 130:1081-1084.
- Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM.** (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil*. 311:1–18.
- Hirsch, A.** (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*. 122: 211-237.
- Hisamatsu, M.** (1992). Cyclic (1,2)- β -D-glucan (ciclosphorans) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* 231: 137-146.
- Hollingsworth, R. I., Carlson, R. W.** (1989). 27-hydroxyoctacosanoic acid is a major structural fatty acyl component of the lipopolysaccharide of *Rhizobium trifolii* ANU843. *J. Biol. Chem.* 246: 9300-9303.
- Jones, K. M.** (2012). Increased production of the exopolysaccharide succinoglycan enhances *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiosis with the host plant *Medicago truncatula*. *J Bacteriol.* Aug, 194(16):4322-31.
- Jones, K., Kobayashi, H., Davies, B., Taga, M., Walker, G.** (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium*–*Medicago* model. *Nat Rev Microbiol.* 5(8): 619–633.
- Kanipes, M., Kalb, S., Cotter, R., Hozbor, D., Lagares, A., Raetz, C.** (2003b). Relaxed sugar donor selectivity of a *Sinorhizobium meliloti* ortholog of the *Rhizobium leguminosarum* mannosyl transferase LpcC. *J. Biol. Chem.* 278:16365-16371.
- Kanipes, M., Ribeiro, A., Lin, S., Cotter, R., Raetz, C.** (2003a). A mannosyl transferase required for lipopolysaccharide inner core assembly in *Rhizobium leguminosarum*. Purification, substrate specificity, and expression in *Salmonella waaC* mutants. *J. Biol. Chem.* 278:16356-64.
- Kannenberg, E., Reuhs, B., Forsberg, L., Carlson, R.** (1998). Lipopolysaccharides and K-antigens: their structures, biosynthesis, and functions. En: Spaink, H. P., Kondorosi,

- A., Hooykaas, P. J. The Rhizobiaceae. (Dordrecht Kluwer Academic Publishers). pp. 150-177.
- Karr, D.B., Liang, R.T., Reuhs, B.L. Emerich, D.W.** (2000). Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation. *Planta*. 211, 218–226.
- Kijne, J. W.** (1992). The Rhizobium infection process. In *Biological Nitrogen Fixation*, G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans, eds. (New York: Chapman and Hall), pp. 349-398.
- Kijne, J.W., Bauchrowitz, M.A., Díaz, C.L.,** (1997). Root lectins in rhizobia. *Plant Physiol*. 115: 869-873.
- Komaniecka, I., Choma, A., Mazur, A., Duda, K. A., Lindner, B., Schwudke, D., Holst, O.** (2014). Occurrence of an unusual hopanoid-containing lipid A among lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium* species. *J Biol Chem*. 289:35644-3555.
- Le Que´re´, A. J. L.: Deakin, W. K., Schmeisser, C., Carlson, R. W., Streit, W. R., Broughton, W. J., Scott Forsberg, L.** (2006). Structural characterization of a K-antigen capsular polysaccharide essential for normal symbiotic infection in *Rhizobium* sp. NGR234. *J Biol Chem*. 281: 28981–28992.
- Lee, H., In, Y.H., Jeong, S.Y., Jeon, J.M., Noh, J.G, So, J.S., Chang, W.S.** (2014). Inactivation of the *lpcC* gene alters surface-related properties and symbiotic capability of *Bradyrhizobium japonicum*. *Lett Appl Microbiol*. 59:9-16.
- Lee, Y., Jeong, S., In, Y., Kim, K., So, J., Chang, W.** (2010). Lack of O-polysaccharide enhances biofilm formation by *Bradyrhizobium japonicum*. *Lett Appl Microbiol*. 50:452-456.
- Lerogue, I., Vanderleyden, J.** (2002). O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiology. Rev.* 26: 17-47.
- Lindström, K., Terefework, Z., Suominen, L., Lortet, G.** (2002). Signalling and development of Rhizobium–legume symbioses. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*. 102: 61-64.
- Lipsanen, P., Lindstrom, K.** (1989). Lipopolysaccharide and protein patterns of *Rhizobium* sp. Galega. *FEMS Microbiol. Lett.* 58: 323-328.
- Long, S.** (1996). Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell*. 8: 1885-1898.
- Lucas, M., Peart, J., Brewin, N., Kannenberg, E.** (1996). Isolation of monoclonal antibodies reacting with the core component of lipopolysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* strain 3841 and mutant derivatives. *J. Bacteriol*. 178: 2727-2733.
- Mackenzie, C., Vail, W., Jordan, D.** (1973). Ultrastructure of free-living and nitrogen-fixing forms of *Rhizobium meliloti* as revealed by freezeetching. *J. Bacteriol*. 113: 387-393.
- Mamat, U., Skurnik, M., Bengoechea, J.A.** (2011). Lipopolysaccharide Core Oligosaccharide Biosynthesis and Assembly. En: Knirel, Y., Valvano, M. *Bacterial*

Lipopolysaccharides Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells. Springer Wien New York.

Martirosyan A, Pérez-Gutierrez C, Banchereau R, Dutartre H, Lecine P, Dullaers M, Mello M, Salcedo SP, Muller A, Leserman L, Levy Y, Zurawski G, Zurawski S, Moreno E, Moriyón I, Klechevsky E, Banchereau J, Oh S, Gorvel JP. (2012). *Brucella* β 1, 2 cyclic glucan is an activator of human and mouse dendritic cells. *PLoS Pathog.* 2012, 8(11).

McRae, D., Miller, R., Berndt, W., Joy, K. (1989). Transport of C4-dicarboxylic and amino acids by *Rhizobium meliloti* bacteroids. *Mol. Plant-Microbe Int.* 2: 273-278.

Miller, K. J., Kennedy, E. P., Reinhold, V. N. (1986). Osmotic adaptation by Gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* 231: 48-51.

Molinaro, A., De Castro, C., Lanzetta, R., Parrilli, M., Raio, A., Zoina, A. (2003). Structural elucidation of a novel core oligosaccharide backbone of the lipopolysaccharide from the new bacterial species *Agrobacterium larrymoorei*. *Carbohydr. Res.* 338:2721-2730.

Moreno, E., Stackebrandt, S.E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M., Mayer, H. (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and Lipid A Reveal a Phylogenetic Relationship with Members of the Alpha-2 Subdivision of the Class Proteobacteria. *J. of Bact.* p. 3569-3576.

Neihardt, F., Ingraham, J., Schaechter, M. (1990). En: *Physiology of the Bacterial Cell. A Molecular Approach*, Sinauer Associates, Sunderland.

Niehaus, K., Kapp, D., Pühler, A. (1993). Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS-I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta*: 190: 415-525.

Noel, K., Forsberg, L., Carlson, R. (2000). Varying the abundance of O-antigen in *Rhizobium etli* and its effect on symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *J. Bacteriol.* 182: 5317-5324.

Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole PS, Downie JA. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45:119-44.

Petrovics, G., Putnoky, P., Reuhs, B., Kim, J., Thorp, T. A., Noel, K. D., Carlson, R. W., Kondorosi, A. (1993). The presence of a novel type of surface polysaccharide in *Rhizobium meliloti* requires a new fatty acid synthase-like gene cluster involved in symbiotic nodule development. *Mol. Microbiol.* 8: 1083-1094.

Que-Gewirth, N. L., Karbarz, M. J., Kalb, S. R., Cotter, R. J., Raetz, C. R. (2003). Origin of the 2-amino-2-deoxy-gluconate unit in *Rhizobium leguminosarum* lipid A. Expression cloning of the outer membrane oxidase LpxQ. *J. Biol. Chem.* 278: 12120-12129.

Raetz, C., Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *An. Rev. Biochem.* 71: 635-700.

Reuhs, B. L., Carlson, R. W., y Kim, J. S. (1993). *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3- deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-containing polysaccharides that

are structurally analogous to group K antigen (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 175: 3570-3580.

Reuhs, B., Geller, D., Kim, J., Fox, J., Kolli, V., Pueppke, S. (1998). *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. Appl. Environ. Microbiol. 64:4930-4938.

Reuhs, B. L., Kim, J. S., Badgett, A., Carlson, R. W. (1994). Production of cell-associated polysaccharides of *Rhizobium fredii* USDA205 is modulated by apigenin and host root extract Mol. Plant-Microbe Interac. 7: 240-247.

Robertson, J. G., Lyttleton, P. (1982). Coated and smooth vesicles in the biogenesis of cell walls, plasmamembranes, infection threads and peribacteroid membranes in root hairs and nodules of white clover. J. Cell Sci. 58: 63-78.
Roth, L. E., y Stacey, G. (1989). Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. Eur. J. Cell Biol. 49: 13-23.

Rolin, D. B., Pfeffer, P. E., Osman, S. F., Szwegold, B. S., Kappler, F., Benesi, A. J. (1992). Structural studies of a phosphocholine substituted β -(1,3),(1,6) macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. Biochim. Biophys. Acta 1116: 215-225.

Roth, L. E., Jeon, K. W., Stacey, G. (1988). Homology in endosymbiotic systems: The term "symbiosome". pp.220-225. In R. Palacios, and D. P. S. Verma (eds.), Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. APS Press, St. Paul, MI.

Roughley, R. (1970). The preparation and use of legume seed inoculants. Plant and Soil. 32: 675-701.

Ruberg, S., Puhler, A., Becker, A. (1999). Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR. Microbiology. 145: 603-611.

Sharypova, L., Niehaus, K., Scheidle, H., Holst, O., Becker, A. (2003). *Sinorhizobium meliloti* *acpXL* mutant lacks the C28 hydroxylated fatty acid moiety of lipid A and does not express a slow migrating form of lipopolysaccharide. J. Biol. Chem. 278: 12946-12954.

Sieberer, B., Ketelaar, T., J. Esseling, J., Emons, A. (2005). Microtubules guide root hair tip growth. New Phytologist. 167: 711-719.

Silipo, A., Vitiello, G., Gully, D., Sturiale, L., Chaintreuil, C., Fardoux, J., Gargani, D., Lee, H. I., Kulkarni, G., Busset, N., Marchetti, R., Palmigiano, A., Moll, H., Engel, R., Lanzetta, R., Paduano, L., Parrilli, M., Chang, W., Holst, O., Newman, D. K., Garozzo, D., D'Errico, G., Giraud, E., Molinaro, A. (2014). Covalently linked hopanoid-lipid A improves outer-membrane resistance of a *Bradyrhizobium* symbiont of legumes. Nat Commun. 5:5106.

Skorupska, A., Janczarek, M., Marczak, M., Mazur, A., Król, J. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. Microbial Cell Factories, 5.1-19.

Sutton, W., Pankhurst, C., Craig, A. (1981). The *Rhizobium* bacteroid state. Int. Rev. Cytol. 13: 149-178.

- Swart, S., Logman, T.J.J., Smit, G., Lugtenberg, B.J.J., y Kijne, J.W.,** (1994). Purification and partial characterization of a glycoprotein from pea (*Pisum sativum*) with receptor activity for rhicadhesin, an attachment protein of Rhizobiaceae. *Plant Mol. Biol.* 24: 171-183.
- Timmers, A. C., Auriac, M. C., de Billy, F., y Truchet, G.** (1998). Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. *Development* 125: 339-349.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., y Truchet, G.** (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* 172: 4295-4306.
- Wang, X., Quinn, P.** (2010). Endotoxins: Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria. En Wang, X., Quinn, P. (Eds). *Endotoxins: Structure, Function and Recognition.* (pp. 3-25). Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- Whitfield, C., Trent, M.S.** (2014). Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem.* 83:99-128.
- Yang, W. C., de Blank, C., Meskiene, I., Hirt, H., Bakker, J., van Kammen, A., Franssen, H., y Bisseling, T.** (1994). Rhizobium Nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell* 6: 1415-1426.
- Zähringer, U., Lindner, B., Knirel, Y.A., van den Akker, W. M., Hiestand, R., Heine, H., Dehio, C.** (2004). Structure and Biological Activity of the Short-chain Lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882. *J. of Biol. Chem.* 279, (20), 21046–21054.
- Zhan, H., Lee, C. C., Leigh, J. A.** (1991). Low phosphate regulation of the second exopolysaccharide (EPSb) in *Rhizobium meliloti* strain SU47. *J. Bacteriol.* 172: 5254-5259.

Objetivos

OBJETIVOS

1. Objetivo General

Como objetivo general se plantea la caracterización funcional de glicosiltransferasas de microorganismos tanto patógenos como simbioses implicadas en la biosíntesis del core del LPS. Dicho estudio resulta fundamental debido a que estos polisacáridos son factores de virulencia indispensables para las infecciones de algunos patógenos humanos, por lo que su estudio podría redundar en aplicaciones sanitarias. Además constituyen moléculas señales requeridas para el establecimiento de una simbiosis efectiva entre rizobios y leguminosas. Como microorganismos modelos para dilucidar la funcionalidad de estas proteínas se emplearán *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* debido a sus roles como PGPR (*plant growth promoting rhizobacteria*), simbioses de plantas de importancia agrícola y por encontrarse filogenética y metabólicamente relacionados con patógenos del género *Brucella*.

Asimismo, debido a la existencia de numerosos estudios referentes a la biosíntesis de LPS y a la disponibilidad de un amplio número de mutantes afectados en diferentes etapas de la biosíntesis de estos polisacáridos, sumado al hecho de que el genoma de estos organismos ha sido totalmente secuenciado y a las similitudes con la síntesis de polisacáridos en otros microorganismos, *S. meliloti* y *R. leguminosarum* constituyen así un modelo apropiado para el estudio y caracterización de glicosiltransferasas involucradas en la síntesis del core del LPS.

2. Objetivos específicos

Objetivo Específico 1: Generar mutantes *lpsB/lpcC* en *S. meliloti*, *R. leguminosarum*, *A. tumefaciens*, *B. japonicum* y *rfaC* en *M. loti* y evaluar en cada uno de ellos los fenotipos del LPS y de nodulación.

Objetivo Específico 2: Llevar a cabo estudios de complementación de mutantes *lpsB/lpcC* con glicosiltransferasas heterólogas. Analizar en cada caso si la



complementación restituye el fenotipo salvaje del LPS y el fenotipo simbiótico. Evaluar la cinética de la nodulación y la presencia o ausencia de síntomas de defensa de la planta.

Objetivo Específico 3: Sobreexpresar, en *Escherichia coli*, los genes *lpsB* de *S. meliloti*, *lpcC* de *R. leguminosarum* y *rfaC* de *M. loti*.

Objetivo Específico 4: Determinar la actividad enzimática de las proteínas LpsB y LpcC utilizando como precursores los LPS de mutantes *lpsB/lpcC* de *S. meliloti* y *R. leguminosarum*.

Análisis de la diversidad funcional de Glicosiltransferasas del core interno en el LPS de Rhizobiales

Capítulo I

INTRODUCCION

I-1. Biosíntesis del LPS

Debido a que el LPS es esencial para las bacterias Gram negativas, su proceso de biosíntesis se encuentra muy conservado. Se estima que la síntesis del LPS requiere un gran número de enzimas, codificadas por unos 40 genes (Samuel & Reeves 2003). Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las investigaciones realizadas en los lipopolisacáridos provienen de estudios realizados en *E. coli* y *Salmonella*, por lo cual se describen los pasos de la biosíntesis del LPS de estas especies bacterianas.

I-1.1. Biosíntesis del Lípido A

El primer paso en la biosíntesis del lípido A es la acilación con β -hidroximiristato en la posición 3 de un residuo de UDP-GlcNAc llevado a cabo por la aciltransferasa LpxA (Anderson & Raetz 1987). Esta transferasa de *E. coli*, reconoce exclusivamente cadenas acilo de 14 carbonos unidas a un transportador ACP (*Acil Carrier Protein*). El siguiente paso es la desacetilación del producto UDP-3-O-(acyl)-GlcNAc por la metaloenzima LpxC, este es un paso de suma importancia para que la vía de biosíntesis continúe (Anderson *et al.*, 1988). LpxC es producto de un gen de copia única altamente conservado en bacterias Gram-negativas, por estas razones se considera que es una enzima blanco para el diseño de nuevos antibióticos (Jackman *et al.*, 2000).

Luego de la desacetilación, se incorpora una segunda cadena de β -hidroximiristato en la posición donde se encontraba el grupo acetilo, es decir en el carbono 2 de la UDP-3-O-(acyl)-Glc, por acción de la aciltransferasa LpxD, para generar UDP-2,3-diacilglucosamina (Kelly *et al.*, 1993). Posteriormente una pirofosfatasa altamente selectiva, LpxH, elimina un grupo fosfato dando como resultado 2,3-diacilglucosamina-1-fosfato, más conocido como lípido X (Babinski & Raetz, 1998).

Luego se forma un disacárido con enlace β (1,-6) generado por la condensación entre una molécula de lípido X y otra de UDP-2,3-diacilglucosamina, este paso es realizado por la enzima LpxB (Bulawa & Raetz, 1984). Luego de haberse formado el disacárido de GlcN, la quinasa LpxK fosforila la posición 4' de dicho disacárido,

generando así el lípido IV_A (Garrett *et al.*, 1997). El siguiente paso es la adición de 2 residuos de Kdo al lípido IV_A, esto es posible gracias a la enzima bifuncional WaaA, utilizando CMP-Kdo como nucleótido-azúcar dador (Clementz & Raetz, 1991).

Finalmente, por acción de las enzimas LpxM y LpxL se adicionan ácido mirístico y láurico, respectivamente a la unidad de GlcN distal por medio de enlace acilo-oxi- acilo. En *E. coli*, estas dos aciltransferasas requieren de la presencia del disacárido de Kdo, depositado por WaaA, para poder realizar las acilaciones correspondientes (Brozek & Raetz, 1990; Clementz *et al.*, 1997) (Figura 6).

Hasta aquí, los pasos para sintetizar el precursor Kdo₂-lípido IV_A de *E. coli* y *Salmonella* son los mismos que los descritos para *R. leguminosarum* y *R. etli*. Los pasos metabólicos posteriores presentes en *Rhizobiaceae* modifican el Kdo₂-lípido IV_A hasta el lípido A maduro típico de estas bacterias. Como se mencionó anteriormente, esta familia posee una gran heterogeneidad en las acilaciones del lípido A. En todos los rizobios estudiados, una proporción de las moléculas carecen del grupo acilo en la posición 3. Se ha identificado la actividad enzimática responsable de esta desacilación en *R. leguminosarum* (Basu *et al.*, 1999).

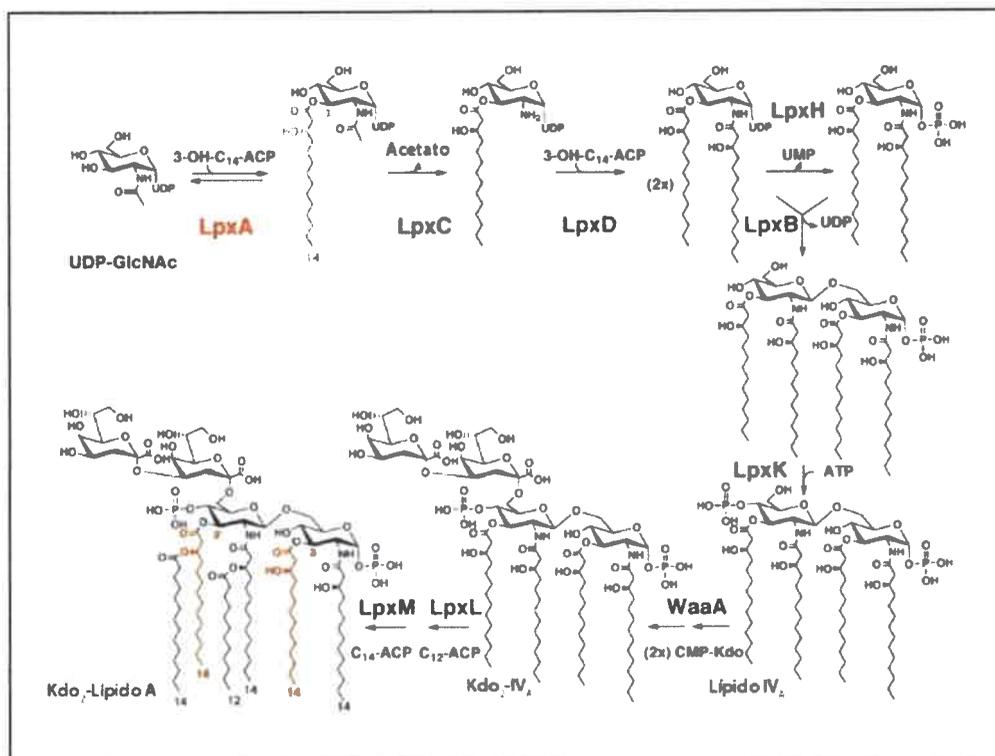


Figura 6. Estructura y biosíntesis del Kdo₂-lípido IV_A en *E. coli* K12 (Raetz & Whitfield 2002).

El segundo paso característico en la síntesis del lípido A en rizobios es la acilación del precursor con el ácido graso extra largo. La enzima que cataliza esta reacción, LpxXL, está asociada a la membrana interna y utiliza como dador un grupo acilo unido al transportador ACP específico codificado por el gen *acpXL*. Los genomas de *S. meliloti*, *A. tumefaciens* y *Brucella* poseen ortólogos de estos genes, lo que concuerda con la presencia en estas especies del ácido graso extra largo (Basu *et al.*, 2002).

Otra característica típica del lípido A en *Rhizobium* spp es la ausencia de fosforilación. En *R. leguminosarum* y *R. etli* se han identificado actividades enzimáticas que desfosforilan los extremos 1 y 4' del precursor Kdo₂-lípido IV_A (Price *et al.*, 1995). La fosfatasa, denominada LpxE, normalmente actúa posterior a la adición el ácido graso extra largo. Los homólogos más similares a LpxE se encuentran en los genomas de *S. meliloti* y *A. tumefaciens*. En estas especies sólo una pequeña proporción de las moléculas de lípido A no poseen grupos fosfatos en el extremo 1 (Karbarz *et al.*, 2003).

Además el lípido A de *Rhizobium etli* CE3 presenta un residuo de GlcNato en lugar de la GlcN proximal. La enzima responsable de la oxidación de la GlcN es LpxQ y se encuentra localizada en la membrana externa. No se han detectado homólogos a esta proteína en *S. meliloti*, lo que concuerda con la ausencia de GlcNato en esta especie (Que-Gewirth *et al.*, 2003).

I-1.2. Biosíntesis del Core

En el genoma de *E. coli* K12 y *Salmonella* se encontró una región del cromosoma denominada *waa* (*rfa*) que codifica para los genes involucrados en la biosíntesis del core. También se han identificado homólogos para estos genes en otras bacterias no entéricas (Raetz & Whitfield 2002).

Una vez sintetizado el Kdo₂-lípido IV_A, las glicosiltransferasas WaaC y WaaF depositan los residuos de Hep I y Hep II respectivamente; utilizando como sustrato ADP-L,D-heptosa (Zamyatina *et al.*, 2000; Gronow *et al.*, 2000). Luego, las enzimas WaaP, WaaY y WaaQ producen modificaciones en el core. En primer lugar la quinasa WaaP decora la HepI agregando un residuo de pirofosforiletanolamina (PPEtN). Posteriormente WaaY agrega un grupo fosfato en el residuo de Hep II y WaaQ ramifica el core con el agregado de una tercera Hep (Hep III) (Yethon *et al.*, 1998). Luego, WaaG y WaaO depositan dos residuos de glucosa (Glc I y Glc II respectivamente) sobre el residuo de

Hep II (Heinrichs *et al.*, 1998). Sobre esta última Glc, se produce una segunda ramificación formada por un dímero de galactosa (Gal I y Gal II) por acción de WaaT y WaaW respectivamente. Por último WaaV deposita el último azúcar del core externo, que consiste en un tercer residuo de Glc unido a la Glc II (Raetz & Whitfield 2002) (Figura 7). Cuando el ensamblaje del core se ha completado, el transportador de tipo ABC MsbA transloca la molécula al lado periplasmático (Karow & Georgopoulos 1993).

En *R. leguminosarum*, el primer paso específico en la biosíntesis del core es catalizado por la enzima LpcC, la cual es codificada por el gen *lpcC*. Esta proteína es una manosil transferasa que utiliza GDP-Man como dador del residuo de azúcar para “manosilar” al Kdo interno del aceptor Kdo₂-lípidos IV_A. Posteriormente actúan las enzimas LpcA y LpcB que presentan actividad de galactosil- y Kdo-transferasa, respectivamente (Kanipes *et al.*, 2003a).

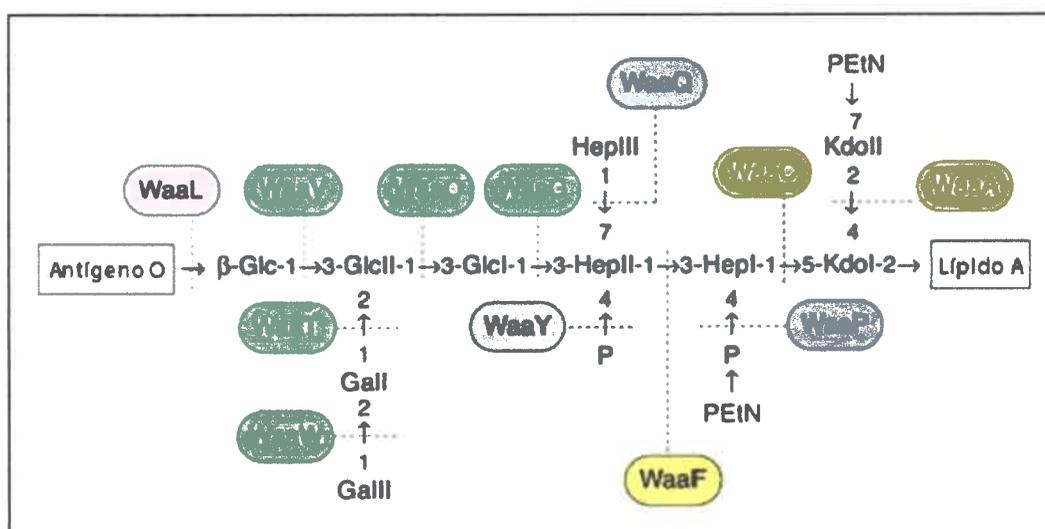


Figura 7. Estructura y biosíntesis del Core de *E. coli* R1. (Raetz & Whitfield 2002).

En *S. meliloti* se ha identificado un gen ortólogo a *lpcC* de *R. leguminosarum*, este gen, denominado *lpsB*, codifica para la proteína LpsB que también puede depositar residuos de Man al precursor Kdo₂-lípidos IV_A (Figura 8). Sin embargo, a diferencia de LpcC también puede añadir otros azúcares. Estudios realizados por Lagares *et al.* (2001) han demostrado que LpsB es una glicosiltransferasa ortóloga a LpcC de *R. leguminosarum* y las mismas presentan un 58% de identidad y 72% de similitud.

Se ha reportado que LpsB es requerida durante la interacción planta-bacteria, ya que una mutación en el gen *lpsB* resulta en un fenotipo de nodulación demorada y competitividad reducida para la ocupancia de nódulos de *Medicago sativa* por *S. meliloti*.

Sin embargo un fenotipo más drástico fue observado en *Medicago truncatula* en el cual la misma mutación resulta en un fenotipo no fijador de nitrógeno (Fix⁻) con signos claros de reacciones de defensa de la planta (Niehaus *et al.*, 1998).

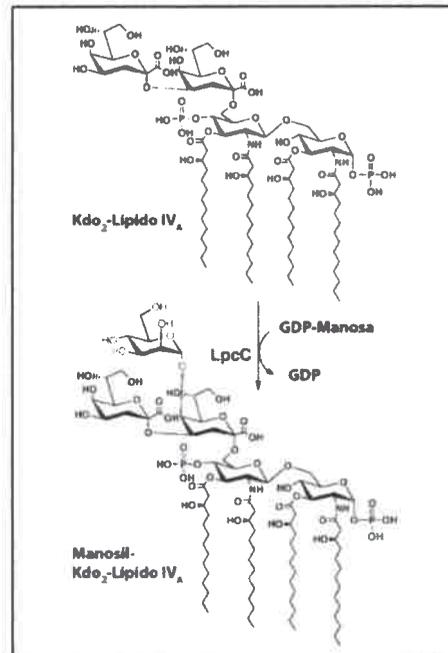


Figura 8. Manosilación del Kdo₂-Lípido IV_A catalizada por LpcC, de *R. leguminosarum*. (Kanipes, *et al.*, 2003a).

Estudios de complementación heteróloga han demostrado que *lpsB* de *S. meliloti* es capaz de complementar una mutación en *lpcC* de *R. leguminosarum*, restaurando el fenotipo salvaje tanto del LPS como para la nodulación. Sin embargo *lpcC* no es capaz de restaurar la estructura del LPS, ni tampoco la deficiencia simbiótica de un mutante *lpsB* de *S. meliloti* (Lagares *et al.*, 2001).

Para comprender la base bioquímica de esta anomalía genética, las actividades glicosiltransferasas de ambas proteínas fueron estudiadas en detalle encontrando que LpcC de *R. leguminosarum* es una manosiltransferasa altamente selectiva que utiliza GDP-Man para “manosilar” el residuo de Kdo interno del precursor del LPS Kdo₂-lípido IV_A (Kanipes *et al.*, 2003a). Por su parte, LpsB de *S. meliloti* puede depositar Man eficientemente en el mismo sustrato que LpcC. Sin embargo la selectividad de azúcar-nucleótido de LpsB es más relajada que la de LpcC, ya que puede utilizar un diversos azúcar-nucleótidos incluyendo GDP-Man, ADP-Man, UDP-Glc y ADP-Glc (Kanipes *et al.*, 2003a).

El hecho que LpcC no sea capaz de restaurar el fenotipo salvaje en el mutante *lpsB* de *S. meliloti* permite suponer que el rol de LpsB *in vivo* es la transferencia de Glc, en lugar de Man, al core del LPS naciente (Kanipes *et al.*, 2003b).

En *S. meliloti*, otros tres genes (*lpsC*, *lpsD*, *lpsE*) que codifican para posibles glicosiltransferasas están contiguos a *lpsB* pero se transcriben divergentemente. Aun no se han determinado las especificidades de estas probables glicosiltransferasas. Sin embargo, parecería que están involucradas en la biosíntesis del core, ya que el LPS rugoso de mutantes en estos genes migra más rápido que el de la cepa salvaje. Esto se ha interpretado como la producción de un core incompleto (Lagares *et al.*, 2001).

A diferencia de lo que ocurre en el resto de los rizobios, un suceso curioso se observa en *Mesorhizobium loti*, donde la enzima ortóloga de LpcC/LpsB de esta especie, RfaC, en vez de agregar una hexosa (como ocurre en el resto de los rizobios) agrega un residuo de Hep (Turska-Szewczuk *et al.*, 2009); similar a lo que sucede en *E. coli* y en otras bacterias patógenas no pertenecientes al orden *Rhizobiales*, como *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. En contraste a lo anteriormente citado, las enzimas ortólogas a LpcC/LpsB de *Brucella melitensis* y *Bartonella henselae*, especies patógenas del orden *Rhizobiales*, depositan un residuo de hexosa durante la biosíntesis del core.

Un análisis comparativo de proteínas ortólogas a LpsB y LpcC en los genomas disponibles nos ha brindado un panorama más general ya que hemos observado que tanto en bacterias simbióticas como patógenas existe un elevado grado de conservación entre estas glicosil transferasas (Véase Tabla 10). Es así que hemos observado elevados porcentajes de identidad y similitud entre LpsB/LpcC y glicosiltransferasas de *Agrobacterium tumefaciens*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Brucella melitensis*, *Bartonella henselae*, entre otros.

I-1.3. Biosíntesis del antígeno O

El inicio del ensamblaje del antígeno O se lleva a cabo en la cara citoplasmática de la membrana interna. Como ocurre durante la polimerización del core, se requieren enzimas que sinteticen los azúcares-nucleótidos precursores y glicosiltransferasas que posteriormente los ensamblen. Las enzimas involucradas en la biosíntesis del antígeno O están codificadas por genes situados en el locus *rfb*, estas glicosiltransferasas pueden estar solubles en el citoplasma o estar asociadas a membrana (McGrath & Osborn 1991;

Valvano *et al.*, 2011). A diferencia de la biosíntesis del core, la cadena del antígeno O crece unida al transportador undecaprenil-fosfato (und-P) que está unido a la membrana interna. Luego de finalizada la síntesis de una subunidad o del antígeno O completo, es transportado al espacio periplasmático, donde se unirá al lípido A-core, por acción de la ligasa WaaL y luego traslocada a la membrana externa (McGrath & Osborn 1991; Valvano *et al.*, 2011). Hasta la actualidad se conocen cuatro vías de exporte de antígeno O al periplasma: Wzy/Wzx-dependiente, sintetasa-dependiente, transportador-ABC y Wzk-dependiente (Figura 9).

En la vía de exporte Wzy/Wzx-dependiente, una subunidad de antígeno O (formada por unos pocos residuos de azúcares) es sintetizada sobre el transportador und-P en la cara citoplasmática de la membrana interna (Wang *et al.*, 1996). Luego este oligosacárido unido al und-P es transportado al periplasma por acción de la traslocasa Wzx (Marolda *et al.*, 2006). Ya en el lado periplásmico, comienza la elongación del antígeno O. Por acción de la polimerasa Wzy, se adicionan (en tándem) otros oligosacáridos en el extremo reductor (Whitfield & Valvano 1993; Whitfield & Roberts 1999). Posteriormente este polisacárido naciente es unido al lípido A-core por acción de la ligasa WaaL y luego traslocado a la membrana externa (Whitfield *et al.*, 1997). Esta vía de exporte se ha descrito en *E. coli* K-12, *Shigella flexneri* y *Pseudomonas aeruginosa* (Valvano *et al.*, 2011).

Transportador-ABC: a diferencia de la vía Wzy/Wzx-dependiente, la polimerización completa del antígeno O se realiza en la cara citoplasmática de la membrana interna. Luego el antígeno O completo es traslocado al periplasma por medio de un transportador de tipo ABC y posteriormente el polisacárido O es acoplado al lípido A-core por acción de la ligasa WaaL (Raetz & Whitfield 2002). Esta vía de exporte se ha descrito en la cepa de *E. coli* O9 y *Klebsiella pneumoniae* O3 y O5. Se ha postulado que *R. etli* utiliza esta vía para el ensamble del antígeno O (Ojeda *et al.*, 2013).

Por su parte *Salmonella entérica* serovar Borreze es, hasta ahora, la única bacteria en la que se ha descrito el sistema de exporte sintetasa-dependiente (Keenleyside & Whitfield 1996). El antígeno O es un homopolímero formado principalmente por ManNAc. La polimerización se inicia en el lado citoplasmático y a medida que el polisacárido se va extendiendo, simultáneamente es exportado al espacio periplasmático a través de la membrana plasmática por acción de la misma glicosiltransferasa que lo sintetiza (Keenleyside *et al.*, 2001; De Angelis, 2002). Una vez localizado el polisacárido

O en el lado periplasmático, es unido al lípido A-core por acción de WaaL (Valvano *et al.*, 2011).

En la vía Wzk dependiente la síntesis del antígeno O comienza con la formación de Und-PP-GluNAc, a esta subunidad posteriormente se le adicionan residuos de GlcNAc y Gal alternados; también son decorados con residuos de Fuc (Hug *et al.*, 2010). Luego de ensamble el antígeno o en la cara citoplasmática, es traslocado al periplasma por acción de la flipasa Wzk, acción que involucra la hidrólisis de ATP. El único organismo descrito hasta el momento que utiliza esta vía de síntesis del antígeno O es *Helicobacter pylori* (Valvano *et al.*, 2011).

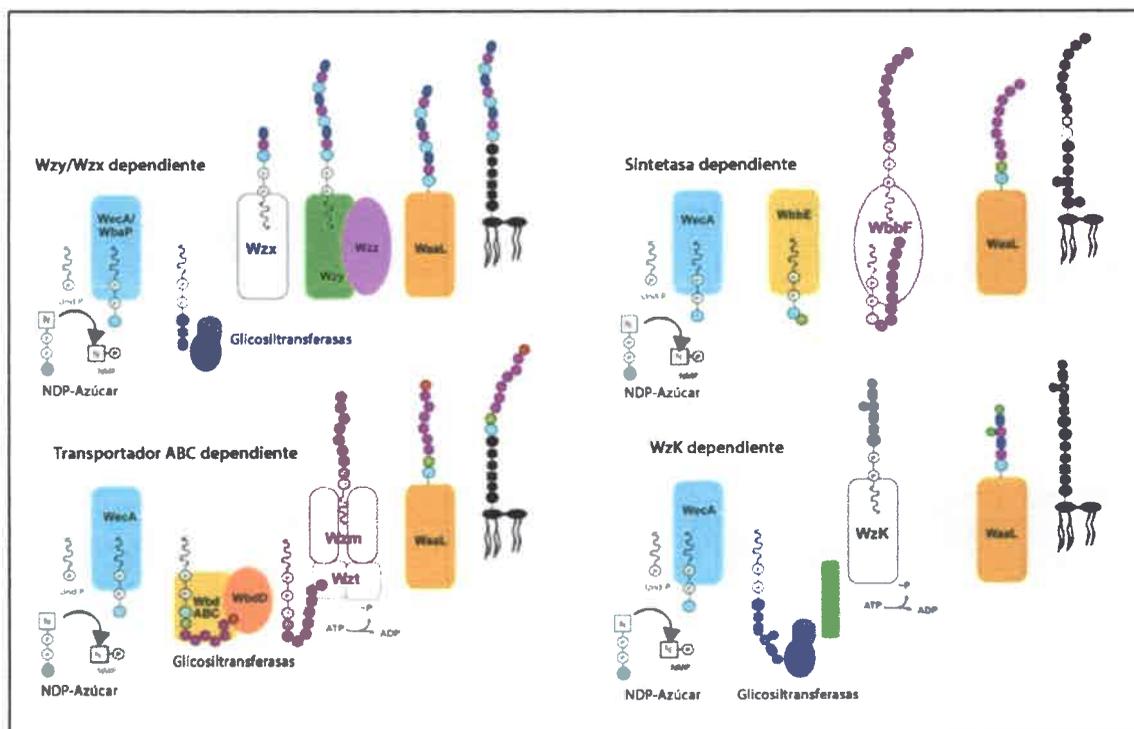


Figura 9. Diagrama ilustrativo de las cuatro vías conocidas para el ensamblaje del antígeno O. Valvano *et al.*, 2011.

I-1.4. Exporte del LPS

Luego que el LPS ha sido ensamblado por cualquiera de las cuatro vías descritas anteriormente, esta macromolécula debe ser exportada a la superficie celular. En *E. coli* se ha descrito un complejo multiproteico llamado Lpt, encargado de transportar al LPS desde la membrana interna, atravesando por el periplasma, hasta la membrana externa. (Whitfield & Trent 2014; Polissi & Sperandeo 2014). En la membrana interna se ubica el

subcomplejo de proteínas formado por LptB, LptF, LptG y LptC (Chng *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2010). Por otra parte en la membrana externa existe un segundo subcomplejo formado por LptD y LptE. El dominio C-terminal de LptD forma un poro con la conformación de barril β que atraviesa toda la membrana externa. Por su parte LptE se encuentra ocluyendo dicho poro y manteniendo la permeabilidad de la membrana. Uniendo estos dos subcomplejos se encuentra un tetrámero formado por LptA (Wu *et al.*, 2006; Freinkman *et al.*, 2012).

LptB, LptF y LptG forman un complejo ABC que se cree se encarga de extraer el LPS de la membrana y lo transfiere a LptC, y luego esta última cede unidireccionalmente la molécula LPS a LptA. La estructura de LptA crea un surco hidrofóbico que une las dos membranas, por este surco el LPS puede atravesar el periplasma que es hidrofílico (Okuda *et al.*, 2012). Cuando el LPS se aproxima a la membrana externa, este se une a LptE y se supone que esta proteína direcciona a la molécula del LPS a introducirse dentro del lumen de LptD que translocará el LPS al exterior de la célula (Figura 10). El mecanismo por el cual la molécula de LPS emerge a la superficie celular, aun no se ha resuelto en detalle (Whitfield & Trent 2014). Se cree que los procesos de translocación no discriminan entre los diferentes grados de polimerización del antígeno O. Aparentemente LPS-liso o LPS-rugoso pueden ser translocados con igual eficiencia (Freinkman *et al.*, 2012).

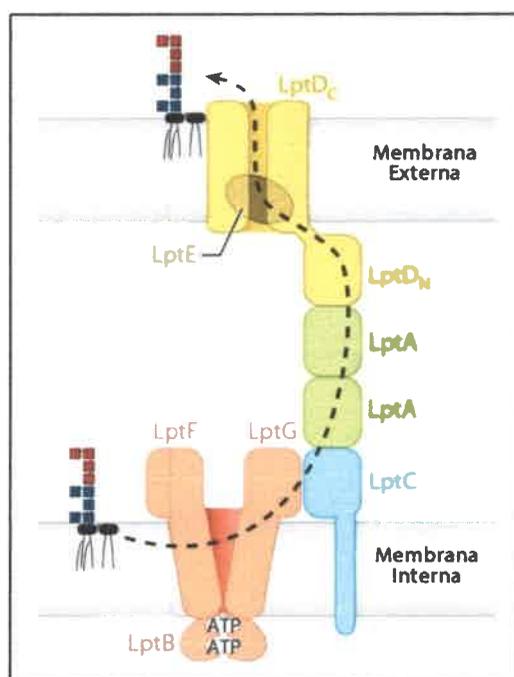


Figura 10. Esquema propuesto de la vía de exporte de lipopolisacáridos. Whitfield & Trent, 2014.

I-2. Los polisacáridos de superficie y la formación de biofilm

Además del rol de los los polisacáridos de superficie como moléculas indispensables para una simbiosis efectiva, también tienen un rol importante en la formación de estructuras conocidas como biofilms. Estas estructuras se definen como comunidades bacterianas adheridas a superficies vivas o inertes y rodeadas en una matriz de polisacáridos producida por estas mismas bacterias (Costerton *et al.*, 1995). Su formación es espontánea en presencia de humedad y en cantidades mínimas de nutrientes. El ciclo vital es un proceso dinámico que está dividido en 5 etapas: fijación inicial, unión irreversible, maduración I, maduración II y dispersión. (Figura 11). Durante las etapas iniciales las bacterias suspendidas libremente o planctónicas se fijan a la superficie mediante atracciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals.

Luego de adheridas a una superficie, se establecen colonias bacterianas, las cuales se reproducen, crecen y constituyen estructuras tridimensionales, entre las que quedan espacios o canales a través de los cuales circulan agua y nutrientes (Stanley & Lazazzera 2004). Este fenómeno ocurre cíclicamente, bacterias de vida libre o planctónicas se adhieren al biofilm y bacterias sésiles en el interior del mismo retornan al estado de vida libre.

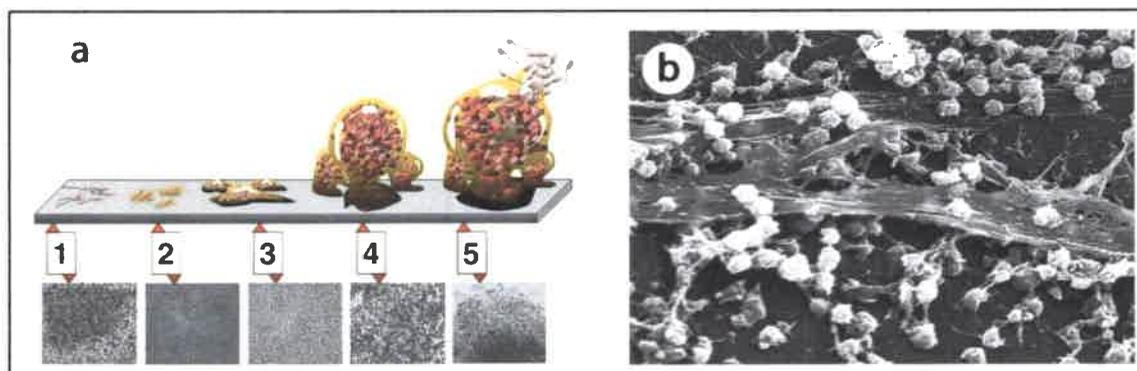


Figura 11. Biofilm. a: Ciclo de vital de la formación del biofilm. 1- adhesión inicial; 2- adhesión irreversible y formación de microcolonias; 3- maduración I o etapa de crecimiento y división; 4- maduración II o etapa de producción y secreción de exopolisacáridos; 5- dispersión. Cada etapa del desarrollo en el diagrama está ilustrado con una microfotografía de un desarrollo del biofilm en *P. aeruginosa*. **b:** Microfotografía de biofilm de *Staphylococcus aureus* sobre un catéter (Monroe, 2007).

El biofilm está constituido estructuralmente por tres componentes: la masa celular, la cual puede contener una o varias especies bacterianas, a este último se lo denomina

biofilm mixto; los espacios intercelulares y la matriz extracelular que lo rodea compuesta por una mezcla de exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias.

Los EPS actúan como protectores de una gran variedad de condiciones de estrés ambiental como ser rayos ultravioleta, cambios de pH, shock osmótico y desecación (Danese *et al.*, 2000). Para colonizar otro hábitat las bacterias sésiles del biofilm deben ser capaces de regresar al estado de vida libre para moverse desde el biofilm hacia el nuevo entorno.

Los biofilms se encuentran diseminados prácticamente en cualquier lugar donde las bacterias se puedan adherir, invadiendo un sin número de nichos ecológicos, entre ellos placas dentales, utensilios domésticos, cascos de barcos, aires acondicionados, catéteres e implantes médicos, vías urinarias, piel, etc; y son causantes de múltiples infecciones.

Se ha demostrado que *S. meliloti* y *R. leguminosarum* son capaces de formar biofilms sobre sustratos inertes como ser: vidrio, plástico, e incluso suelo (Fujishige *et al.*, 2006). Usualmente los rizobios forman biofilm en la superficie de las raíces de sus leguminosas hospedadoras, previo al proceso de nodulación (Williams *et al.*, 2008). En los rizobios, un número de componentes superficiales y moléculas secretadas, tales como EPS, flagelos, componentes de *quorum sensing* y factores nod se encuentran involucrados en el desarrollo del biofilm (Fujishige *et al.*, 2006, 2008; Rinaudi & Gonzalez 2009). Se ha reportado que en *B. japonicum* la ausencia del antígeno O del LPS incrementa la formación de biofilm en superficies plásticas (Lee *et al.*, 2010). Lo mismo ocurre en el mutante *rkpK* de *Rhizobium rhizogenes*, que tampoco posee el antígeno O y aumenta su capacidad de formación de biofilm (Abarca-Grau *et al.*, 2011).

I-3. La estructura del LPS afecta la hidrofobicidad superficial bacteriana

Dado que el proceso de nodulación requiere una íntima interacción célula-célula, es evidente que las propiedades de la superficie celular, tales como hidrofobicidad o hidrofiliidad, desempeñan un papel importante. Las propiedades físico-químicas generales de la superficie bacteriana suelen ser importantes para las interacciones producidas durante la nodulación (Putnoky *et al.*, 1990; Araujo *et al.*, 1994). Por lo tanto, es posible que alteraciones en los componentes de la superficie celular (por ejemplo, LPS) ejerzan su efecto de una manera indirecta, probablemente produciendo cambios en la

hidrofobicidad de la superficie celular. Este efecto indirecto, o no-específico, de los componentes de la superficie celular de rizobios en el proceso de nodulación ha sido reportado por Park & So (2000), quienes describieron una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* (mutante por transposición Tn5) cuyo LPS carece de antígeno O y presenta un aumento en la hidrofobicidad superficial, comparada con la cepa salvaje. Recientemente se ha reportado otra cepa de *B. japonicum* también carente de antígeno O cuya capacidad de formar biofilm sobre superficies plásticas se vio aumentada como consecuencia de un incremento en la hidrofobicidad de la superficie bacteriana (Lee *et al.*, 2010).

En *E. coli* se construyeron mutantes a distintos niveles del core del LPS y se observó que cuanto más profunda en la estructura del core se encontraba la mutación, la superficie de las bacterias se volvían más hidrofóbicas; y por consiguiente se incrementaba la autoagregación y la capacidad de formar biofilm sobre superficies plásticas (Nakao *et al.*, 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

I-4. Modelo de estudio

Dominio: Bacteria

División: Proteobacteria

Clase: α -Proteobacteria

Orden: Rhizobiales

Familia: Rhizobiaceae

Género: *Rhizobium*

Especie: *Rhizobium leguminosarum*

Género: *Sinorhizobium* (*Ensifer*)

Especie: *Sinorhizobium meliloti* (*Ensifer meliloti*)

Género: *Agrobacterium*

Especie: *Agrobacterium tumefaciens*

Género: *Bradyrhizobium*

Especie: *Bradyrhizobium japonicum*

Género: *Mesorhizobium*

Especie: *Mesorhizobium loti*

Familia: Bartonellaceae

Género: *Bartonella*

Especie: *Bartonella henselae*

Familia: Brucellaceae

Género: *Brucella*

Especie: *Brucella melitensis*

Clase: β -Proteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia: Alcaligenaceae

Género: *Bordetella*

Especie: *Bordetella bronchiseptica*

I-4.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo

Escherichia coli

Cepa	Características	Referencia
DH5α	<i>recA1</i> , <i>DlacU169</i> , 80 <i>dlacZDM15</i> . Cepa hospedadora utilizada en los experimentos de clonado.	Colección Lab.
S17-1	MM294, RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 integrado en el cromosoma.	Colección Lab.

Sinorhizobium meliloti

Cepa	Características	Referencia
2011	Cepa silvestre, simbiote de <i>Medicago sativa</i> , <i>Medicago truncatula</i> , Sm ^r derivada de la cepa SU-47	Casse <i>et al.</i> , 1979
Sm46	<i>S. meliloti</i> 2011 <i>lpsB::lacZ-Gm</i> (fusión transcripción <i>lacZ-Gm</i> en el sitio <i>KpnI</i> del gen <i>lpsB</i>), Sm ^r , Gm ^r	Lagares <i>et al.</i> , 1992
Sm46-110	Sm46 portadora del plásmido pJF110 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>B. japonicum</i>) Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm46-120	Sm46 portadora del plásmido pJF120 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>A. tumefaciens</i>) Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm46-130	Sm46 portadora del plásmido pJF130 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>B. henselae</i>) Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm46-150	Sm46 portadora del plásmido pJF140 (pFAJ1708- <i>rfaC</i> de <i>M. loti</i> MAFF 303099) Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm46-160	Sm46 portadora del plásmido pJF160 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>R. leguminosarum</i>) Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm46-170	Sm46 portadora del plásmido pJF170 (pFAJ1708- <i>lpsB</i> de <i>S. meliloti</i>) Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm46-180	Sm46 portadora del plásmido pJF180 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>B. melitensis</i>) Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm46-190	Sm46 portadora del plásmido pJF190 (pFAJ1708- <i>rfaC</i> de <i>B. bronchiseptica</i>) Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo

Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae

Cepa	Características	Referencia
3855	Cepa silvestre, simbionte de <i>Pisum sativum</i> .	Colección Lab.
Sm44	3855 <i>lpcC::nptII</i>. Nm^r	Cortesía Dr. Ronson
Sm44-110	Sm44 portadora del plásmido pJF110 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>B. japonicum</i>) Nm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm44-120	Sm44 portadora del plásmido pJF120 (pFAJ1708-<i>lpcC</i> de <i>A. tumefaciens</i>) Nm^r, Tc^r	Este trabajo
Sm44-160	Sm44 portadora del plásmido pJF160 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>R. leguminosarum</i>) Nm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm44-170	Sm44 portadora del plásmido pJF170 (pFAJ1708-<i>lpsB</i> de <i>S. meliloti</i>) Nm^r, Tc^r	Este trabajo
Sm44-180	Sm44 portadora del plásmido pJF180 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>B. melitensis</i>) Nm ^r , Tc ^r	Este trabajo

Bradyrhizobium japonicum

Cepa	Características	Referencia
USDA110	Cepa silvestre, simbionte de <i>Glycine max</i> . Sm ^r	Colección Lab.
Sm70	USDA110, <i>lpcC::lacZ-Gm</i> (fusión transcripcional <i>lacZ-Gm</i> en el sitio <i>SalI</i> del gen <i>lpcC</i>), Sm^r, Gm^r.	Este trabajo
Sm70-110	Sm70 portadora del plásmido pJF110 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>B. japonicum</i>). Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm70-120	Sm70 portadora del plásmido pJF120 (pFAJ1708-<i>lpcC</i> de <i>A. tumefaciens</i>). Sm^r, Gm^r, Tc^r	Este trabajo
Sm70-130	Sm70 portadora del plásmido pJF130 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>B. henselae</i>). Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm70-150	Sm70 portadora del plásmido pJF150 (pFAJ1708-<i>rfaC</i> de <i>M. loti</i> MAFF 303099). Sm^r, Gm^r, Tc^r	Este trabajo
Sm70-160	Sm70 portadora del plásmido pJF160 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>R. leguminosarum</i>). Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm70-170	Sm70 portadora del plásmido pJF170 (pFAJ1708-<i>lpsB</i> de <i>S. meliloti</i>). Sm^r, Gm^r, Tc^r	Este trabajo

Sm70-180	Sm70 portadora del plásmido pJF180 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>B. melitensis</i>). Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm70-190	Sm70 portadora del plásmido pJF150 (pFAJ1708-<i>rfaC</i> de <i>B. bronchiseptica</i>). Sm^r, Gm^r, Tc^r	Este trabajo

Agrobacterium tumefaciens

Cepa	Características	Referencia
C58	Patógeno de plantas, capaz de formar tumores en la planta hospedadora	Colección Lab.
Sm69	C58 <i>lpcC::lacZ-Gm</i> (fusión transcripcional <i>lacZ-Gm</i> en el sitio <i>KpnI</i> del gen <i>lpcC</i>), Gm^r	Este trabajo
Sm69-110	Sm69 portadora del plásmido pJF110 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>B. japonicum</i>). Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm69-120	Sm69 portadora del plásmido pJF110 (pFAJ1708-<i>lpcC</i> de <i>A. tumefaciens</i>). Gm^r, Tc^r	Este trabajo
Sm69-130	Sm69 portadora del plásmido pJF110 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>B. henselae</i>). Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm69-150	Sm69 portadora del plásmido pJF110 (pFAJ1708-<i>rfaC</i> de <i>M. loti</i> MAFF 303099). Gm^r, Tc^r	Este trabajo
Sm69-160	Sm69 portadora del plásmido pJF110 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>R. leguminosarum</i>). Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm69-170	Sm69 portadora del plásmido pJF110 (pFAJ1708-<i>lpsB</i> de <i>S. meliloti</i>). Gm^r, Tc^r	Este trabajo
Sm69-180	Sm69 portadora del plásmido pJF110 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>B. melitensis</i>). Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm69-190	Sm69 portadora del plásmido pJF110 (pFAJ1708-<i>rfaC</i> de <i>B. bronchiseptica</i>). Gm^r, Tc^r	Este trabajo

Mesorhizobium loti

Cepa	Características	Referencia
MAFF 303099	Cepa silvestre, simbionte de <i>Lotus</i> spp.	Cortesía Dra. J. Estrella
Sm80	<i>M. loti</i> MAFF 303099 <i>rfaC::pK18mob2</i> Nm^r	Este trabajo

Sm81 *M. loti* MAFF 303099 *rfaF*::pK18mob2 Nm^r Este trabajo

Bartonella henselae

Cepa	Características	Referencia
Houston-1	Patógeno-Zoonótico, intracelular facultativo; cuyo reservorio es el gato doméstico. Se trabajó únicamente con ADN	Colección Lab.

Brucella melitensis

Cepa	Características	Referencia
M-16	Patógeno-Zoonótico causante de la enfermedad Brucelosis. Se trabajó únicamente con ADN	Colección Lab.

Bordetella bronchiseptica

Cepa	Características	Referencia
RB50	Causa enfermedades en vía respiratorias en cerdos. Se trabajó únicamente con ADN	Colección Lab.

Tabla 2. Plásmidos empleados en el presente trabajo

Plásmido	Características	Referencia
pK18mob2	Derivado del plásmido pK18, mob, Km ^r	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pK19mob2	Derivado del plásmido pK19, mob, Km ^r	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pAB2001	Derivado de pUC6S, cassette <i>lacZ</i> -Gm ^r	Becker <i>et al.</i> (1995)
pMS255	Derivado de pUC6S, cassette Gm ^r	Becker <i>et al.</i> (1995)
pFAJ1708	Plásmido de expresión, conteniendo el promotor constitutivo <i>nptII</i> Ap ^r Tc ^r	Dombrecht <i>et al.</i> (2000)
pJF110	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>lpcC</i> de <i>B. japonicum</i> en los sitios <i>HindIII</i> , <i>KpnI</i> . Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pJF120	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>lpcC</i> de <i>A. tumefaciens</i> en los sitios <i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i> . Ap ^r Tc ^r	Este trabajo

pJF130	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>lpcC</i> de <i>B. henselae</i> en los sitios <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI. Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pJF150	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>rfaC</i> de <i>M. loti</i> MAFF303099 en los sitios <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I. Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pJF160	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>lpcC</i> de <i>R. leguminosarum</i> en los sitios <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI. Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pJF170	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>lpsB</i> de <i>S. meliloti</i> 2011 en los sitios <i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI. Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pJF180	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>lpcC</i> de <i>B. melitensis</i> M16 en los sitios <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I. Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pJF190	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>rfaC</i> de <i>B. bronchiseptica</i> en los sitios <i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI. Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pFJ210	Derivado de pK18mob2, conteniendo <i>lpcC::lacZ-Gm</i> de <i>B. japonicum</i> en los sitios <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I,	Este trabajo
pFJ220	Derivado de pK18mob2, conteniendo <i>lpcC::Gm</i> de <i>A. tumefaciens</i> en los sitios <i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI, Km ^r	Este trabajo
pFJ230	Derivado de pK18mob2, conteniendo fragmento interno de 314pb de <i>rfaC</i> de <i>M. loti</i> en los sitios <i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III, Km ^r	Este trabajo
pFJ240	Derivado de pK18mob2, conteniendo fragmento interno de 376 pb de <i>rfaF</i> de <i>M. loti</i> en los sitios <i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III, Km ^r	Este trabajo

Tabla 3. Cebadores empleados en este trabajo

Gen	Secuencia
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (Para el clonado en pFAJ1708)	
<i>lpsB</i>	Forw. 5'- AAAA <u>AAGCTT</u> AATTGATTGTTCGCAGGCG -3' <i>Hind</i> III
<i>lpsB</i>	Rev. 5'- AAAA <u>G AAT TCT</u> AGCCAAGATCAACGCATCA -3' <i>Eco</i> RI
<i>Rhizobium leguminosarum</i> (Para el clonado en pFAJ1708)	
<i>lpcC</i>	Forw. 5'-AAAAGGATCCTCCCTTGCCTGATATCCGT-3' <i>Bam</i> HI

lpcC Rev. 5'- AAAAGAATTCTTCTCTTTTCGGCTTCAGCT-3'
EcoRI

Agrobacterium tumefaciens (Para el clonado en pFAJ1708 y pK18mob2)

lpcC Forw. 5'-AAAAAAGCTTAGACGGAAGCCCATCTTGT 3'
HindIII

lpcC Rev. 5'-AAAAGAATTCGGATATCACCCCGCTGTAA-3'
EcoRI

Bradyrhizobium japonicum (Para el clonado en pFAJ1708 y pK18mob2)

lpcC Forw. 5'-AAAAAAGCTTTAAACGGAGCGTGACGTGG-3'
HindIII

lpcC Rev. 5'-AAAAGGTACCATTCTGCTGGCACCGACTACT-3'
KpnI

Mesorhizobium loti (Para el clonado en pFAJ1708)

rfaC Forw. 5'-AAAAAAGCTTCACGGCATGAAGTTCTGAT-3'
HindIII

rfaC Rev. 5'-AAAAGGTACCCGCCAGAGCGAATTCTGAAAA-3'
KpnI

Mesorhizobium loti (Para el clonado de un fragmento interno de 314 pb en pk18mob2)

rfaC Forw. 5'- CGGGATCCTCTGCTGAAATCGGCCCT -3'
BamHI

rfaC Rev. 5'- CCCAAGCTTTTCCGATCCAGTCTTCAACA -3'
HindIII

Mesorhizobium loti (Para el clonado de un fragmento interno de 376 pb en pk18mob2)

rfaF Forw. 5'- CGCGGATCCAAATTCGCGGCTCTGATG -3'
BamHI

rfaF Rev. 5'- CCCAAGCTTAGGAGAGGTGCAGCCAGAC -3'
HindIII

Bartonella henselae (Para el clonado en pFAJ1708)

lpcC Forw. 5'-AAAGGATCCCTAAATTATTATGCATGTGTC-3'
BamHI

lpcC Rev. 5'-AAAGAATTCTTAAAGTGTTTTTTTCGCAA-3'
EcoRI

Brucella melitensis (Para el clonado en pFAJ1708)

lpcC Forw. 5'- AAAAAAGCTTTTCGTCTGATTTTCCGTGACT-3'
*Hind*III

lpcC Rev. 5'- AAAAGGTACCTTATCTTCCTGCGAAAACCTG-3'
*Kpn*I

I-4.2. Medios y condiciones para el cultivo de rizobios y *E. coli*

I-4.2.1. Medios de cultivo para rizobios

La composición de los medios utilizados para el cultivo de las bacterias pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Sinorhizobium* fue la siguiente:

Medio TY: (Beringer, 1974) modificado

CaCl ₂ 2H ₂ O	0,4 g
Tripteína Bacteriológica	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
H ₂ O desionizada hasta completar	1.000 ml

Medio YEM: (Vincent, 1970) modificado

Manitol	10 g
Extracto de levadura	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ 2H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
R rojo Congo	0,025 g (únicamente en medio sólido)
H ₂ O desionizada hasta completar	1.000 ml

Medio PSY: (Regensburger & Hennecke 1983)

Peptona	1,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g

Na ₂ HPO ₄	0,3 g
H ₂ O desionizada hasta completar	988 ml

*Una vez Autoclavado agregar:

MgSO ₄ 7H ₂ O	[10 %]	1,0 ml
CaCl ₂	[5 %]	1,0 ml
Biotina		0,2 mg
Micronutrientes**	[100X]	10 ml

**Micronutrientes [100X]:

H ₃ BO ₃	100 mg/l
ZnSO ₄ 2H ₂ O	1,0 mg/l
FeCl ₃	1,0 mg/l
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,5 mg/l
MnCl ₂	0,15 mg/l
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,1 mg/l

Medio RDM: (Vincent, 1970)

Sacarosa	5 g	
Solución A*	100 ml	
Solución B**	100ml	
Biotina	[2,5mg/ml]	4 ml
Tiamina	[10mg/ml]	1 ml
H ₂ O desionizada hasta completar	1000 ml	

*Solución A [10X]

KNO ₃	6 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	2,5g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0,1 g

**Solución B [10X]

K ₂ HPO ₄	10 g
KH ₂ PO ₄	10 g

La temperatura de incubación para los cultivos de las cepas bacterianas pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* fue 30 °C. Los cultivos en medios líquidos fueron agitados en un agitador rotatorio a 150 rpm.

I-4.2.2. Medios de cultivo para *E. coli*

La composición del medio utilizado para el cultivo de *Escherichia coli* fue la siguiente:

Medio LB (Luria-Bertani): (Sambrook *et al.*, 1989)

NaCl	5,0 g
Trypteina Bacteriológica	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
H ₂ O desionizada hasta completar	1.000 ml

La temperatura de incubación para los cultivos de *E. coli* fue 37 °C. Los cultivos en medios líquidos fueron agitados a 150 rpm.

*Para la preparación de medios sólidos se agregó 1,5 % p/v de agar-agar.

*La esterilización fue realizada en autoclave a 120 °C durante 20 min.

I-4.2.3. Antibióticos empleados

Los antibióticos fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de soluciones madres [1.000X] esterilizadas por filtración (filtros de nitrocelulosa de 0,20 µm). Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron las siguientes:

Para *E. coli*:

Ampicilina (Amp)	100 µg/ml
Kanamicina (Km)	25 µg/ml

Tetraciclina (Tc)	10 µg/ml
Gentamicina (Gm)	20 µg/ml

Para *S. meliloti*:

Streptomycin (Sm)	200 µg/ml (Resistencia de la cepa)
Gentamicina (Gm)	40 µg/ml
Tetraciclina (Tc)	10 µg/ml

Para *B. japonicum*:

Streptomycin (Sm)	400 µg/ml (Resistencia de la cepa)
Gentamicina (Gm)	40 µg/ml
Tetraciclina (Tc)	10 µg/ml

Para *A. tumefaciens*:

Rifampicina (Rif)	100 µg/ml (Resistencia de la cepa)
Gentamicina (Gm)	40 µg/ml
Tetraciclina (Tc)	10 µg/ml

Para *R. leguminosarum*:

Neomicina (Nm)	120 µg/ml
Tetraciclina (Tc)	10 µg/ml

Para *M. loti*:

Neomicina (Nm)	120 µg/ml
Tetraciclina (Tc)	10 µg/ml

I-5. Extracción de ADN bacteriano**I-5.1. Extracción de ADN genómico de rizobios (Walsh *et al.*, 1991)**

Las cepas fueron crecidas en medio sólido y se colectaron las células correspondientes a varias colonias, las cuales fueron lavadas 2 veces con una solución 1M de NaCl. Posteriormente se agregaron 200 µl de Resina Chelex®, BIO-RAD; seguido

de agitación con vortex. La mezcla se incubó a 56 °C por 10 min y luego a 100 °C durante 10 min, seguido de una nueva agitación con vortex. Posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 min. El sobrenadante fue utilizado como molde para las reacciones de amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

I-5.2. Extracción de ADN plasmídico por el método de Lisis Alcalina (Le Gouill *et al.*, 1994)

Las cepas de *E. coli* fueron crecidas en medio LB sólido con los antibióticos correspondientes. Las células se colectaron de las placas por arrastre con ansa y luego fueron resuspendidas en 200 µl de solución PI. Esta suspensión se agitó vigorosamente con vortex hasta homogeneizar la totalidad de la masa bacteriana, posteriormente se agregaron 200 µl de solución PII mezclando hasta producida la lisis, luego se adicionaron 200 µl de solución PIII seguida de centrifugación a 11.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue colectado y transferido a otro tubo de 1,5 ml al cual se le adicionaron 0,7 ml de isopropanol frío y la mezcla fue incubada a -20 °C durante 30 min. Posteriormente se centrifugó a 11.000 rpm durante 10 min, el sobrenadante fue descartado y el precipitado resultante fue lavado dos veces con 1 ml de etanol 70 % frío. Luego de ambos lavados se centrifugó a 11.000 rpm durante 10 min, el *pellet* fue secado a 37 °C y resuspendido en H₂O bidestilada.

Soluciones Minipreps para extracción de ADN plasmídico

Solución PI: (para un volumen final de 20 ml)

Glucosa	[50 mM]	1,0 ml
Tris-HCl	(pH 8) [25 mM]	0,5 ml
EDTA-Na ₂	(pH 8) [10 mM]	1,0 ml
H ₂ O desionizada		17,5 ml

Solución PII: (para un volumen final de 1,2 ml)

SDS 10 %		120 µl
NaOH	[10 N]	24 µl
H ₂ O desionizada		1.056 µl

Solución PIII: (para un volumen final de 100 ml)

Acetato de potasio [5,0 M]	60 ml
Ac. Acético Glacial	11,5 ml
H ₂ O desionizada	28,5 ml

*La Solución PII se prepara en el momento de ser utilizada.

I-6. Reacción en Cadena de la Polimerasa**I-6.1. Amplificación de *lpsB/lpcC* y *rfaC* mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)**

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un termociclador TC-312 Techne®. La composición de las mezclas de reacción utilizadas fue (para un volumen final de 50 µl):

H ₂ O bidestilada estéril		26,5 µl
<i>Buffer</i>	[10X]	5 µl
PCR <i>enhancer</i>	[2X]	10 µl
dNTPs	[10 mM]	1,5 µl
Cebadores	[25 µM]	1,0 µl de cada uno.
MgSO ₄	[50 mM]	1,0 µl
ADN molde		3,0 µl
Polimerasa <i>PFX Platinum</i> ®, Invitrogen		1,0 µl

Finalizada la reacción de PCR, los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8 % (p/v) utilizando una cuba Mini-Sub CellGT®, BIO-RAD, conteniendo *Buffer* TBE 0,5X, y separados a 90 voltios. Se sembraron 5 µl del producto de PCR adicionando 1 µl de *buffer* de carga (*loading buffer*) 6X suplementado con SYBR®*green*. Estas mismas condiciones se utilizaron para corroborar los productos de digestión de plásmidos recombinantes. Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz azul.



I-7. Transformación bacteriana y ensayos de Conjugación (adaptado de Sambrook *et al.*, 1989)

I-7.1. Obtención de células Competentes Químicas

Se partió de un cultivo líquido de 5 ml de medio LB en el cual células de *E. coli* fueron crecidas durante toda la noche a 37 °C. A partir de éste, se inoculó 1 ml en 20 ml de medio fresco y se hizo crecer durante 3 hs hasta $DO_{600nm}=0,5$. Estos 20 ml de cultivo se centrifugaron a 6.000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y al *pellet* se agregaron 10 ml de $CaCl_2$ 100 mM esterilizado por filtración. El *pellet* fue resuspendido con agitación suave e incubado en hielo durante 30 min. Pasado este tiempo de incubación se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 min a 4 °C, el sobrenadante fue descartado y al *pellet* se le adicionaron 1,7 ml de $CaCl_2$ 100 mM y 0,3 ml de glicerol estéril. El *pellet* se resuspendió por agitación suave y se fraccionó en tubos de 1,5ml, los cuales fueron guardados inmediatamente a -80 °C para su posterior uso.

I-7.2. Transformación bacteriana (Sambrook *et al.*, 1989).

A células competentes (químicas) se agregó 1 ó 10 μ l del plásmido o mezcla resultante de la ligación, respectivamente. La mezcla se incubó durante 30 min en hielo y luego se realizó un choque térmico a 42 °C durante 3 min. Posteriormente se adicionó 1 ml de medio LB y se incubó a 37 °C durante 40 min. Luego de esta incubación se sembraron 100 μ l en una placa con medio LB suplementado con los antibióticos apropiados.

I-7.3. Ensayos de Conjugación

Las conjugaciones que se realizaron para este trabajo, fueron conjugaciones biparentales, empleando la técnica descrita por Simon *et al.* (1989).

Se hicieron crecer rizobios en 5 ml de medio TY suplementado con los antibióticos apropiados durante toda la noche (hasta alcanzar una $DO_{600nm}=0,4-0,6$). Del cultivo inicial se tomaron 0,8 ml que fueron centrifugados a 3.500 rpm durante 4 min. Se descartó el sobrenadante y se agregó al *pellet* 1 ml de medio TY, se resuspendió por agitación suave y se volvió a centrifugar a 3.500 rpm durante 4 min. Nuevamente se

eliminó el sobrenadante conservando el *pellet*. Este lavado se realizó para eliminar restos de medio y antibióticos que pudieran interferir en la posterior conjugación. Además, simultáneamente se hicieron crecer en medio LB suplementado con los antibióticos apropiados durante 12hs *E. coli* S17-1 conteniendo el plásmido a movilizar. De este cultivo inicial se tomaron 100 µl y se inocularon en medio LB fresco. Luego de 3 hs de crecimiento, 0,8 ml del cultivo fueron centrifugados a 3.500 rpm durante 3 min. El *pellet* resultante fue lavado dos veces con medio LB estéril, luego colectado y transferido al tubo que contenía el *pellet* del cultivo de rizobios. A este tubo que contiene ambos *pellets* se adicionaron 100 µl de medio TY y se mezcló hasta resuspenderlos. La suspensión fue colocada en una placa de Petri conteniendo medio sólido TY sin antibióticos e incubada a 30 °C durante 48 hs. La masa bacteriana fue tomada del medio sólido y resuspendida en 1 ml de medio TY líquido. A partir de esta suspensión bacteriana se sembraron 100 µl de la misma en medio sólido TY suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de las bacterias transconjugantes.

*En el caso de *B. japonicum* el medio de cultivo utilizado fue PSY y en *R. leguminosarum* el medio fue RDM.

I-8. Obtención de mutantes *lpsB/lpcC* y *rfaC* (Quandt & Hynes 1993)

I-8.1. Mutagénesis Sitio-Dirigida mediante integración de plásmido

En esta ocasión se describe la obtención de mutantes para el gen *rfaC* de *M. loti*, los mutantes para *rfaF* de la misma especie bacteriana se obtuvieron de manera similar.

Por reacción de PCR se amplificó un fragmento interno del gen *rfaC*, utilizando los cebadores descritos en la Tabla 3. Dicho fragmento fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III; a su vez el plásmido pK18mob2 fue digerido con las mismas enzimas. Los productos de digestión fueron ligados empleando la ligasa del fago T4 (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La mezcla de ligación conteniendo el vector pK18mob2-*rfaC* fue utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5α. La selección se llevó a cabo en medio LB suplementado con Km y X-Gal. A partir de los clones transformantes (colonias blancas) se purificó el plásmido pK18mob2-*rfaC* el cual fue introducido mediante transformación en células competentes de *E. coli* S17-1.

Luego de seleccionadas las colonias de *E. coli* con el plásmido pK18mob2 recombinante debido a la resistencia a Km, el mismo se movilizó mediante conjugación a *M. loti*. Debido a que el plásmido pk18mob2 no es replicativo en rizobios, se seleccionaron aquellos transconjugantes en los que ocurrió un evento de recombinación (integración del vector) mediante crecimiento en medio RDM suplementado con Nm.

I-8.2. Mutagénesis Sitio-Dirigida mediante doble recombinación homóloga

Para este procedimiento se describirá la obtención de mutantes para el gen *lpcC* de *B. japonicum*. La mutagénesis de *lpcC* de *A. tumefaciens* se llevó a cabo de manera similar.

Mediante PCR se amplificó la secuencia que codifica para el gen *lpcC*, (incluyendo 15pb corriente arriba y 72 pb corriente abajo) utilizando los cebadores específicos, descritos en la Tabla 3. El producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI*. A su vez el plásmido pK18mob2 fue digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI*.

Una vez digeridos tanto el producto de PCR como el plásmido e inactivadas las enzimas de restricción a 70 °C, se procedió a la ligación de ambos. Con el producto de esta ligación se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α . Las células de *E. coli* transformadas fueron crecidas en presencia de Km y X-Gal; se seleccionaron las colonias blancas, ya que serían éstas las portadoras del plásmido recombinante. Dicho plásmido recombinante, designado pK18mob2-*lpcC*, fue purificado y digerido con la enzima de restricción *SalI*. El gen *lpcC* posee un único sitio *SalI* en la posición 556.

Por otra parte el plásmido pAB2001 fue digerido con la enzima *SalI*. Este plásmido cuenta con un *cassette* de resistencia a Gm precedido por el gen *lacZ* (*cassette lacZ-Gm*), el cual se encuentra flanqueado por los sitios de corte *SalI*; al digerir con esta restrictasa se libera dicho *cassette*, el cual se ligó con el plásmido recombinante (pK18mob2-*lpcC*) previamente digerido con la misma enzima de restricción; se espera que el *cassette lacZ-Gm* se inserte dentro del gen *lpcC*. Luego de esta ligación se transformaron células de *E. coli* competentes, y se seleccionaron las colonias que contenían el plásmido recombinante, por la resistencia a Km y Gm.

Una vez seleccionadas las colonias de *E. coli* con el plásmido pK18mob2-*lpcC::lacZ-Gm*, el mismo fue movilizado mediante conjugación biparental al rizobio, en

esta oportunidad *B. japonicum*. Los transconjugantes fueron seleccionados en medio PSY suplementado con Gm y Sm.

Debido a que el plásmido utilizado no es replicativo (suicida) en rizobios, ya que no posee un origen de replicación reconocido por estos, la única forma que incorpore la resistencia a Gm es mediante eventos de doble recombinación homóloga, es decir intercambio del gen mutado (plasmídico) por el gen salvaje (cromosómico). En este caso se seleccionaron aquellos clones en donde ocurrieron dichos eventos de doble recombinación homóloga. Para diferenciar estos clones de aquellos en donde ocurrió un único evento de recombinación homóloga, se seleccionaron las colonias resistentes a Gm (*lpcC::lacZ-Gm*) y sensibles a Nm (resistencia del vector).

I-9. Complementación Heteróloga

Para los ensayos de complementación se utilizó el plásmido pFAJ1708 el cual es replicativo en *E. coli* y en rizobios. Este plásmido tiene la particularidad de que los fragmentos que se clonan están bajo el control del promotor constitutivo *nptII*, el cual es un promotor fuerte, asegurando de este modo la transcripción de la región de ADN clonada corriente abajo. El plásmido pFAJ1708 fue digerido con las enzimas *HindIII* y *EcoRI*. El producto de esta digestión se ligó con el gen (en este caso *lpsB* de *S. meliloti*), previamente amplificado por reacción de PCR y digerido con las mismas enzimas.

Con el producto de la ligación se transformaron células de *E. coli*. Los clones portadores de plásmidos recombinantes fueron controlados mediante digestión con las mismas enzimas de restricción utilizadas anteriormente y posteriormente movilizados por conjugación biparental a los distintos mutantes a complementar.

I-10. Evaluación de la capacidad de mutantes afectados en el LPS para crecer en medios suplementados con SDS

Las cepas que presentan alteraciones en el LPS usualmente adquieren una mayor sensibilidad a compuestos tensoactivos como el detergente aniónico SDS (Clover *et al.*, 1989). Con el objeto de analizar si las alteraciones en el LPS presente en las cepas mutantes afectan la capacidad de crecer en presencia del detergente, las mismas fueron crecidas en medios de cultivo sólidos suplementados con diferentes concentraciones de SDS (0,05; 0,075, 0,1 y 0,15 % (p/v)), dependiendo de la especie de rizobio.

I-11. Lipopolisacáridos: Aislamiento y Análisis

I-11.1. Aislamiento de Lipopolisacáridos (LPS)

Para el aislamiento de Lipopolisacáridos se partieron de 5 ml de cultivo, los rizobios fueron crecidos en medio TY, excepto *B. japonicum* que fue cultivado en medio PSY, a una temperatura de 30 °C y con una agitación de 150 rpm hasta obtener una $DO_{600nm}=0,8$. El cultivo fue centrifugado a 12.0000 rpm durante 3 min. Para eliminar restos de medio de cultivo y polisacáridos liberados al mismo, los *pellets* bacterianos fueron lavados con NaCl 0,9 % (p/v). Los *pellets* de *B. japonicum* fueron primero sometidos a un lavado con 1 M NaCl y posteriormente a un segundo lavado con NaCl 0,9 % (p/v). Para esta especie de rizobio se realizaron dos lavados debido a la gran cantidad de polisacáridos que libera al medio extracelular. Luego de este procedimiento se utilizaron dos técnicas diferentes para aislar los Lipopolisacáridos.

I-11.1.1. Aislamiento con Polimixina B (Valverde *et al.*, 1996)

Cabe aclarar que ésta técnica se realizó para extraer LPS de todos los rizobios, excepto de *B. japonicum*.

A los *pellets*, obtenidos según se describió anteriormente, se les agregó 100 µl de EDTA-Na [100 mM] (pH 8), seguido de una agitación con vortex durante 15 min. Posteriormente la mezcla fue centrifugada a 14.000 rpm durante 3 min. Luego de la centrifugación se extrajo el sobrenadante, el cual fue transferido a otro tubo de 1,5 ml. A continuación se agregaron 60 µl de Polimixina B (BIO-RAD) inmovilizada en agarosa, la cual tiene la particularidad de unirse al lípido A de los LPS; seguido de otra agitación con vortex durante 15 min. Posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante 2 min y se descartó el sobrenadante. A los *pellets* se les agregaron 200 µl de *Buffer* Fosfato 100 mM (pH 7), seguido de agitación con vortex y centrifugación a 12.000 rpm durante 2 min. Se descartaron los sobrenadantes y a los *pellets* resultantes se adicionó 80 µl de *buffer* muestra (*sample buffer*), seguido de incubación a 100 °C durante 5 min. Las muestras fueron sometidas a sonicación a una frecuencia de 50 kHz durante 15min. Posteriormente se centrifugaron a 10.000 rpm durante 2 min y se procedió al análisis del perfil de los LPS

mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, según se detalla en Krauss *et al.* (1988).

I-11.1.2. Aislamiento de LPS mediante el método Fenol-Agua (Westphal & Jann 1965)

Debido a que no se obtuvieron preparaciones apropiadas para el análisis de los LPS de *B. japonicum* utilizando la extracción con Polimixina, se procedió a realizar dicha extracción empleando el método de Fenol-Agua. Para ello se agregaron 7,14 ml de la mezcla fenol-H₂O 45:55, (v/v) por cada gramo de células húmedas. La mezcla obtenida fue incubada a 68 °C con agitación energética durante 20 min. Las fases fenólica y acuosa fueron separadas por centrifugación a 12.000 rpm durante 15 min. Se extrajo la fase acuosa en un nuevo tubo y se agregó a la fase fenólica anterior un volumen de agua igual al extraído. Se centrifugó nuevamente para separar las dos fases y se volvió a extraer la fase acuosa, la cual se mezcló con la fase anteriormente extraída. La fase acuosa resultante, fue dializada contra agua bidestilada durante dos días a temperatura ambiente para eliminar los restos de fenol. Para ésta diálisis se empleó una membrana con un tamaño de corte de 12 kDa. La suspensión de LPS obtenida, fue tratada con RNasa A, DNasa I y Proteinasa K, a una concentración final de cada una de las enzimas de 15 µg/ml en *buffer* 10 mM MgSO₄ y 50 mM Tris base, (pH 7) durante toda una noche a 37 °C. Una vez finalizado este tratamiento se agregó *buffer* muestra (*sample buffer*) 2X y se procedió al análisis de los LPS mediante DOC-PAGE.

I-11.2. Electroforesis de LPS en geles de Poliacrilamida

Las diferentes muestras de LPS fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida a una concentración de 20 %, utilizando una cuba Mini- PROTEAN® 3, BIO-RAD.

La composición de los geles fue la siguiente:

Gel de Apilamiento (Stacking):

Acril-Bis 30:08 (30 % T 2, 67 % C)	0,6 ml
<i>Stacking Buffer</i> *	0,625 ml
H ₂ O	1,21 ml
TEMED [10 %]	0,125 ml

APS	[10 %]	0,05 ml
-----	--------	---------

Gel de Resolución:

Acril-Bis 30:08 (30% T 2, 67% C)		5,19 ml
4X Gel Buffer**		1,875 ml
H2O		0,5 ml
TEMED	[10 %]	0,125 ml
APS	[10 %]	0,05 ml

***Stacking Buffer (pH 6,8):**

Tris HCl	500 mM
SDS	0,4 %

****4X Gel Buffer (pH 8,8)**

Tris HCl	1,5 M
SDS	0,4 %

La composición del *buffer* de corrida fue la siguiente: glicina 2,17 % (p/v), Tris base 0,45 % (p/v), ácido Deoxicólico (DOC) 0,25 % (p/v). Antes de sembrar la muestra, se realizó una pre-corrida de los geles durante 10 min a 15 mA. Luego se sembraron 10 μ l de la muestra mezclada con *buffer* muestra 2X (*sample buffer*). La electroforesis se llevó a cabo a 20 mA (amperaje constante) hasta que el frente de corrida alcanzó el borde inferior del gel, aproximadamente durante 60-90 min.

I-11.3. Tinción con Azul Alcian-Plata (AAP)

Al finalizar la corrida electroforética, los geles fueron sumergidos en 100 ml de solución de Azul Alcian 0,005 % (p/v) en etanol:ácido acético:agua bidestilada (relación de volúmenes 40:5:55 respectivamente) durante toda la noche. Finalmente, los geles fueron teñidos con plata según la metodología descrita por Tsai & Frasch (1982): Los geles fueron tratados con una solución 0,7 % (p/v) de meta-peryodato de sodio en agua bidestilada por 10 min. (etapa de oxidación). Luego de dicho tratamiento estos geles fueron lavados con agua bidestilada (cinco lavados de cinco min cada uno). La tinción

fue realizada con una solución de plata (dilución al 10 % (v/v) en agua bidestilada del concentrado de plata de BIO-RAD), por 10 min. Antes de proceder al revelado, los geles fueron lavados con agua bidestilada (tres lavados de un min cada uno) y posteriormente sumergidos en desarrollador BIO-RAD 1,5 % (p/v) en agua bidestilada hasta la aparición de las bandas correspondientes a los polisacáridos. La reacción de tinción fue detenida mediante el agregado de una solución de ácido acético al 0,5 % v/v.

Finalmente los geles fueron lavados con agua bidestilada (dos lavados de dos min cada uno) y conservados en agua bidestilada.

La documentación se llevó a cabo mediante el escaneado de los mismos.

I-12. Hidrofobicidad superficial (adaptado de Rosemberg *et al.*, 1980)

Los cultivos bacterianos fueron crecidos hasta alcanzar una $DO_{600nm}=0,7$ y luego centrifugados a 5.000 rpm durante 7 min. El *pellet* resultante fue lavado dos veces con *buffer* fosfato pH 7. Luego de estos dos lavados el *pellet* fue resuspendido en el mismo *buffer* hasta alcanzar una $DO_{600nm}=1$. Esta suspensión bacteriana fue fraccionada en tubos de hemólisis y mezclada con xileno. El volumen final de la mezcla fue 1,2 ml a una concentración de 15% de xileno.

La mezcla fue calentada durante 15 min a 30 °C y posteriormente sometida a agitación energética (vortex) durante 2 min. Luego, dicha mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 15 min. Una vez transcurrido este tiempo en la mezcla se observa una separación en dos fases, una orgánica superior y una fase inferior acuosa. Esta última fase fue colectada cuidadosamente y su DO_{600nm} fue determinada.

I-13. Formación de biofilm (O'Toole & Kolter 1998)

La capacidad de las células para formar biofilm fue determinada macroscópicamente sobre placas de poliestireno de 96 pocillos y la biomasa sénil fue cuantificada indirectamente con la coloración de cristal violeta.

Los cultivos bacterianos fueron crecidos hasta fase estacionaria suplementados con sus correspondientes antibióticos. Una vez alcanzada dicha fase de crecimiento, una fracción de este cultivo fue diluida en el mismo medio hasta obtener una $DO_{600nm}=0,1$. La dilución resultante fue sembrada en la placa, distribuyéndose 100 μ l de la dilución por

cada pocillo e incubada durante 24 hs a 30 °C sin agitación. En el caso de *B. japonicum*, el tiempo incubación fue de 7 días. Posteriormente las bacterias en estado planctónico fueron removidas suavemente y se agregó a cada pocillo 180 µl de una solución acuosa de cristal violeta [0,1% p/v], dejándose colorear durante 15 min. Pasado este tiempo, el colorante fue descartado y cada pocillo fue enjuagado vigorosamente con agua, 5 veces. Finalmente se adicionaron 150 µl de etanol 95 % v/v, y la densidad óptica de la solución coloreada fue determinada espectrofotométricamente en un lector de microELISA.

I-14. Ensayos de infección de *Agrobacterium tumefaciens* (Garcês & Neelima 2009)

Las cepas de *A. tumefaciens* fueron crecidas en medio TY con agitación de 150 rpm hasta obtener una concentración de 1×10^8 UFC/ml. Posteriormente los cultivos fueron centrifugados durante 5 min a 4000 rpm, el sobrenadante descartado y el *pellet* resuspendido en solución fisiológica estéril.

Por otra parte hojas de plantas de *Kalanchoë daigremontiana* fueron esterilizadas por inmersión en etanol 70% durante 30 seg, luego enjuagadas con H₂O destilada estéril y posteriormente sumergidas en una solución de NaClO 10% (v/v) durante 10 min y vueltas a enjuagar con H₂O destilada estéril.

De las plantas de *K. daigremontiana* se tomaron las hojas más jóvenes (superiores) y se realizaron perforaciones con la punta de una micropipeta (*tip*) sin atravesar la lámina foliar y se inocularon 10 µl de la suspensión de *A. tumefaciens* en solución fisiológica. Luego las plantas de *K. daigremontiana* fueron cultivadas en invernadero con fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Estas plantas fueron regadas una vez con agua destilada y la siguiente con medio Hoagland estéril. Luego de 4 semanas las hojas fueron examinadas para determinar la presencia de tumores (Whatley *et al.*, 1976).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I-15. Generación de Mutantes en *lpcC*

Para disponer de mutantes afectados en *lpcC* en *B. japonicum* y *A. tumefaciens*, se procedió a la generación de estos mediante mutagénesis sitio-dirigida. Para ello, la región de ADN correspondiente a dichos genes fue amplificada mediante PCR usando cebadores específicos (véase Tabla 3) y el correspondiente ADN genómico como molde. Para permitir el clonado, se incluyeron en los cebadores sitios de reconocimiento para enzimas de restricción.

I-15.1. Generación de mutantes *lpcC* de *B. japonicum*

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa, purificados y digeridos con las correspondientes enzimas de restricción. El producto de PCR generado de 1125 pb, correspondientes al gen *lpcC* de *B. japonicum* incluyendo 15pb corriente arriba del ATG y 72 pb corriente abajo del codón de terminación, fue digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI* y luego clonado en el plásmido pK18mob2; el cual también fue digerido con las mismas restrictasas. El plásmido resultante, pK18mob2-*lpcC*, fue introducido en *E. coli* DH5 α mediante transformación. La selección se realizó en medio LB sólido en presencia de X-Gal y Km. Se seleccionaron colonias blancas a partir de las cuales se procedió a la extracción de plásmidos, los cuales fueron digeridos con las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI* para verificar la presencia del inserto correspondiente a *lpcC*. (Figura 12a).

Posteriormente el gen *lpcC* clonado en el plásmido pK18mob2, fue interrumpido por la inserción de un *cassette lacZ-Gm*, proveniente del plásmido pAB2001. Tanto el vector pK18mob2-*lpcC* como el plásmido pAB2001 fueron digeridos con la enzima *SaII*, (*lpcC* posee un sitio único de reconocimiento para esta restrictasa) y los productos de ambas digestiones fueron ligados. La mezcla de ligación (conteniendo el vector pFJ210; véase Tabla 3) fue utilizada para transformar nuevamente células competentes de *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron aquellos clones resistentes a Km y Gm. De las colonias crecidas en estas condiciones, se aislaron plásmidos y estos fueron digeridos con la enzima *SaII*,

corroborando de esta manera la inserción del *cassette lacZ-Gm* en el gen *lpcC* (Figura 12b). Posteriormente con el plásmido resultante (pK18mob2-*lpcC*::*lacZ-Gm*, llamado pFJ210, véase Tabla 2) se transformaron células competentes de *E. coli* S17-1 y por medio de conjugación biparental fueron movilizados a *B. japonicum*. Se seleccionaron aquellos clones en los que ocurrieron eventos de doble recombinación homóloga. Las células en las cuales ocurrió este fenómeno se seleccionaron por la resistencia a Gm y la sensibilidad a Nm.

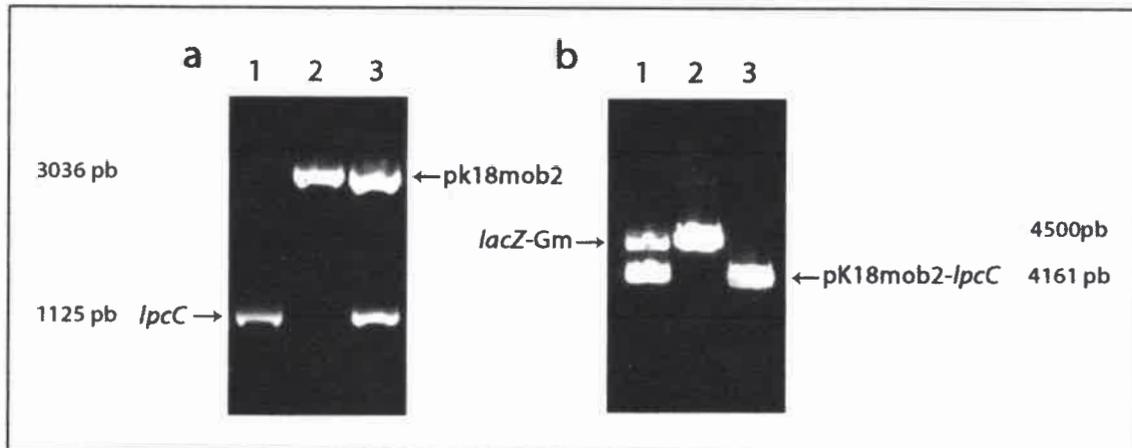


Figura 12. Análisis de los productos de digestión de pK18mob2-*lpcC* con *Hind*III y *Kpn*I y pFJ210 con *Sal*I mediante electroforesis en geles de agarosa. **a-** Digestión del plásmido pK18mob2-*lpcC*. 1: *lpcC* (producto de PCR); 2: pK18mob2 linealizado con *Hind*III/*Kpn*I; 3: pK18mob2-*lpcC* digerido con *Hind*III/*Kpn*I. **b-** Digestión del plásmido pFJ210 (pK18mob2-*lpcC*::*lacZ-Gm*). 1: pFJ210 digerido con *Sal*I; 2: *cassette lacZ-Gm*; 3: pK18mob2-*lpcC* linealizado con *Sal*I.

I-15.2. Generación de mutantes *lpcC* de *A. tumefaciens*

El gen *lpcC* de *A. tumefaciens* fue amplificado por PCR. El producto de la PCR, incluyendo 15 pb corriente arriba del ATG y 5 pb corriente abajo del codón de terminación, dando un producto de 1076 pb, fue clonado en el plásmido pK18mob2 en los sitios *Hind*III y *Eco*RI. El plásmido recombinante pK18mob2-*lpcC* fue introducido en células de *E. coli* DH5 α . Dichas células fueron crecidas en medio LB sólido, en presencia de X-Gal y Km; y se seleccionaron las colonias blancas. Se aislaron plásmidos de dichas colonias y éstos fueron digeridos con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI (Figura 13a). El plásmido pK18mob2-*lpcC* fue interrumpido por la inserción de un *cassette* Gm, proveniente del plásmido pMS255. Este plásmido posee el *cassette* Gm flanqueado por sitios de reconocimiento de la enzima de restricción *Kpn*I. La secuencia que codifica para el gen *lpcC* de *A. tumefaciens* posee dentro de su secuencia, en la posición 751 pb, un sitio único de reconocimiento para la misma enzima. Ambos

plásmidos fueron tratados con dicha restrictasa y los productos de ambas digestiones fueron ligados obteniéndose el vector pFJ220 (pK18mob2-*lpcC*::Gm, véase Tabla 2). Con el plásmido resultante se transformaron células competentes de *E. coli* S17-1 y se seleccionaron aquellos clones resistentes a Km y Gm. A partir de dichos clones se extrajeron plásmidos y estos fueron digeridos con la enzima *KpnI* (Figura 13b).

Posteriormente el vector pFJ220 fue movilizado por conjugación biparental a células *A. tumefaciens* salvajes. Se seleccionan los clones en donde ocurrieron eventos de doble recombinación homóloga, por la resistencia a Gm y la sensibilidad a Nm (propia del vector).

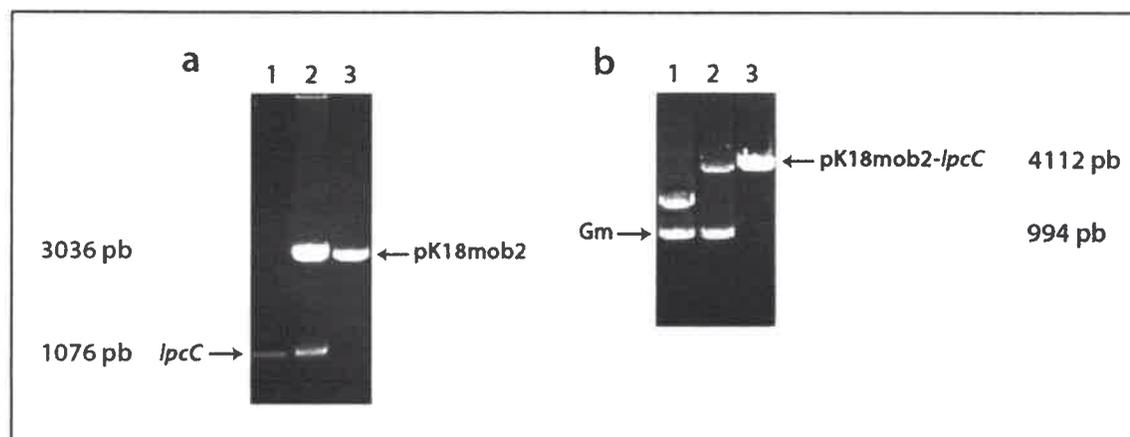


Figura 13. Análisis de los productos de digestión de los plásmidos pK18mob2-*lpcC* (*HindIII* y *EcoRI*) y pFJ220 (*KpnI*). a- Digestión del plásmido pK18mob2-*lpcC*. 1: *lpcC*; 2: pK18mob2-*lpcC* digerido con *HindIII/EcoRI*; 3: pK18mob2 linealizado con *HindIII*. b- Digestión del plásmido pFJ220 (pK18mob2-*lpcC*::Gm). 1: pMS255 digerido con *KpnI*; 2: pFJ220 digeridos con *KpnI*; 3: pK18mob2-*lpcC* linealizado con *KpnI*.

I-15.3. Generación de mutantes *rfaC* de *M. loti*

En esta ocasión se describe la obtención de mutantes para el gen *rfaC* de *M. loti*, los mutantes para *rfaF* de la misma especie bacteriana se obtuvieron de manera similar.

Por reacción de PCR se amplificó un fragmento interno de 314 pb del gen *rfaC*, utilizando los cebadores descritos en la Tabla 3. Dicho fragmento fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*; a su vez el plásmido pK18mob2 fue digerido con las mismas enzimas. Los productos de estas digestiones fueron ligados empleando la ligasa del fago T4 (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La mezcla de ligación conteniendo el vector pK18mob2-*rfaC* fue utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . La selección se llevó a cabo en medio LB suplementado con Km y X-Gal. A partir de los clones transformantes (colonias blancas) se purificaron plásmidos y se digirieron con las enzimas *BamHI* y *HindIII* (Figura 14). Luego de

corroborar la inserción del fragmento interno del gen *rfaC* en el plásmido pK18mob2, este vector recombinante (pK18mob2-*rfaC*) fue introducido mediante transformación en células competentes de *E. coli* S17-1.

Posteriormente dicho plásmido fue movilizado mediante conjugación a *M. loti*. Debido a que el plásmido pK18mob2 no es replicativo en rizobios, se seleccionaron aquellos transconjugantes en los que ocurrió un evento de recombinación (integración del vector) mediante crecimiento en medio RDM suplementado con Nm.

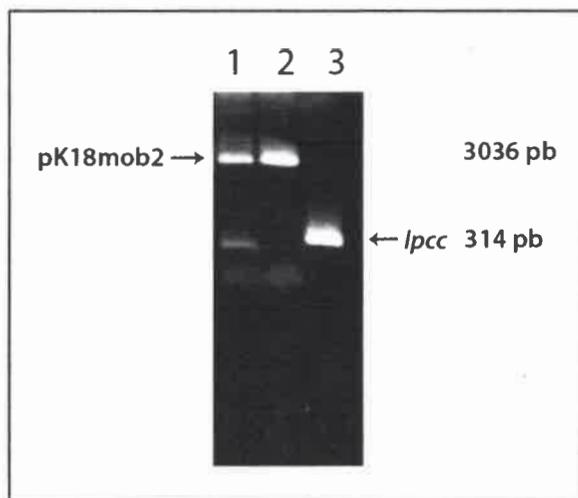


Figura 14. Análisis de los productos de digestión del plásmido pK18mob2-*rfaC*. 1: pK18mob2-*rfaC* digerido con *Bam*HI y *Hind*III; 2: pK18mob2 digerido con *Bam*HI y *Hind*III. 3: fragmento interno de *rfaC* de 314pb.

I-16. Generación de Plásmidos conteniendo diferentes ortólogos a *lpsB* para estudios de complementación heteróloga

*En este apartado se describirá solamente la obtención del vector pJF150 (pFAJ1708-*rfaC*).

Como se describe en la Tabla 2, el gen *rfaC* de *M. loti* (incluyendo 7 pb corriente arriba y 25 pb corriente abajo) fue clonado en el vector de expresión constitutiva pFAJ1708, el cual posee el promotor *nptII* (Dombrecht *et al.*, 2000). El plásmido resultante pJF150 (pFAJ1708-*rfaC*), fue utilizado para transformar células competentes de *E. coli* S17.1. Dichas células fueron crecidas en medio LB sólido, en presencia de Tc. En este caso no se utilizó el método de selección de colonias blancas y azules, debido a que el sitio de clonado múltiple del plásmido pFAJ1708 no contiene el gen *lacZ*. Por este motivo, en una primera instancia, la verificación de los plásmidos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. De este modo se seleccionaron aquellos plásmidos que

presentaron una menor movilidad electroforética en comparación al vector vacío pFAJ1708 (Figura 15a).

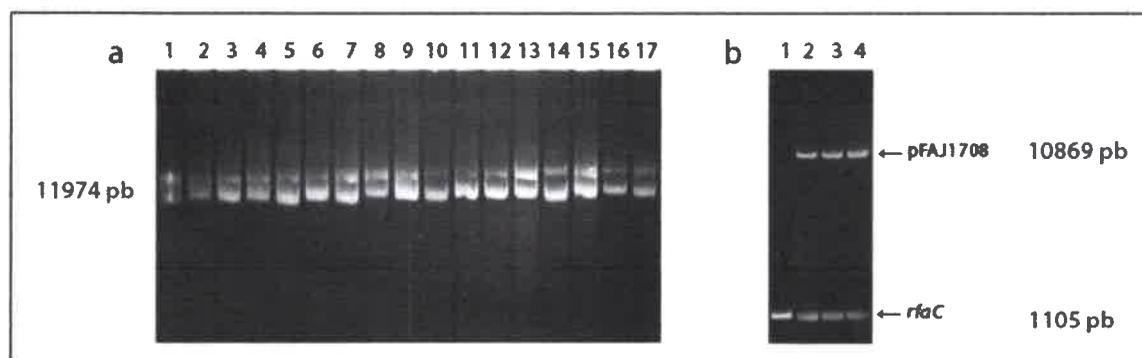


Figura 15. Electroforesis en geles de agarosa donde se muestra la movilidad de los posibles plásmidos recombinantes. **a-** Movilidad de plásmidos recombinantes. 1: pFAJ1708 (vacío); 2-17: plásmidos pFAJ1708 que posiblemente han incorporado el gen *rfaC*. **b-** Análisis de restricción (*Hind*III/*Kpn*I) de los Plásmidos recombinantes 1: gen *rfaC*, 2-4: Plásmidos pertenecientes a las calles 8, 16 y 17 de la Figura 15a, respectivamente.

La confirmación se llevó a cabo mediante digestión con *Hind*III y *Kpn*I (Figura 15b). Los plásmidos recombinantes, conteniendo *rfaC*, fueron utilizados para transformar células competentes de *E. coli* S17-1 y posteriormente movilizados mediante conjugación biparental a las cepas de rizobios mutantes a complementar.

Utilizando la misma estrategia se generaron los plásmidos: pJF110, pJF120, pJF130, pJF160, pJF180 y pJF170 conteniendo *lpcC* de *B. japonicum*, *A. tumefaciens*, *B. henselae*, *R. leguminosarum* y *lpsB* de *S. meliloti*. (Véase Tabla 2).

Dichos plásmidos fueron utilizados para los estudios de complementación en mutantes *lpsB* de *S. meliloti* y *lpcC* de *B. japonicum*, *A. tumefaciens* y *R. leguminosarum*.

I-17. Evaluación de la sensibilidad a detergentes en Mutantes *lpsB*, *lpcC* y *rfaC*

Una vez obtenidos los mutantes *lpsB* de *S. meliloti*, *lpcC* de *B. japonicum*, *A. tumefaciens* y *R. leguminosarum* como se describió anteriormente; se procedió a evaluar su capacidad de crecimiento en medio sólido suplementado con distintas concentraciones del detergente aniónico SDS. Usualmente cambios en la porción sacárida de los LPS incrementan la sensibilidad de la bacteria a agentes tensioactivos. La finalidad de este ensayo fue determinar si la complementación con genes ortólogos a los mutados puede restituir el fenotipo salvaje, es decir, la capacidad de crecer en medios suplementados con el detergente.

I-17.1. Evaluación de la capacidad de *S. meliloti* para crecer en medios con SDS

Como puede observarse en la Figura 16, la cepa salvaje de *S. meliloti* fue capaz de crecer en el medio suplementado con 0,1% (p/v) de SDS, mientras que el mutante *lpsB* no lo hizo. De este modo, la concentración 0,1% de SDS resulta apropiada para diferenciar el fenotipo salvaje del mutante.

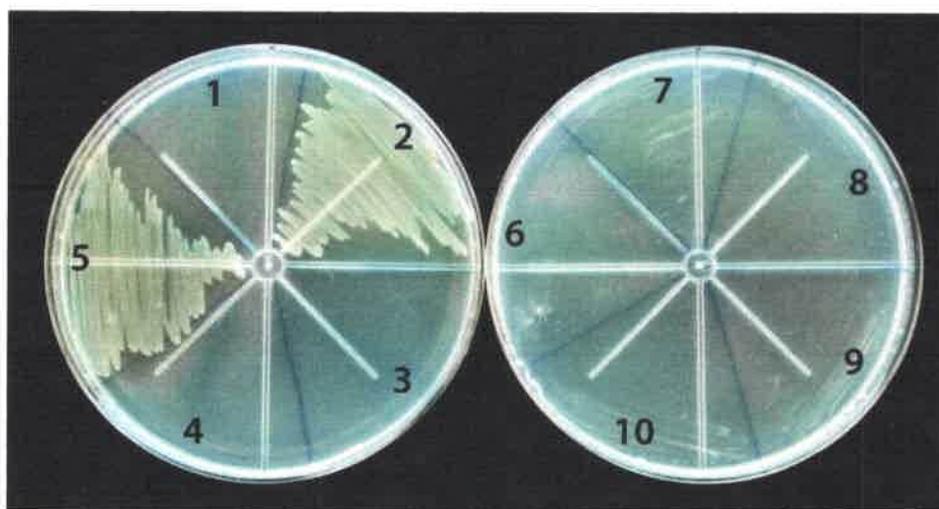


Figura 16. Crecimiento de *S. meliloti* en medios suplementados con SDS 0,1% (p/v). 1: *S. meliloti lpsB*⁻; 2: *S. meliloti* salvaje; 3: *S. meliloti lpsB*⁻ + *lpcC* de *R. leguminosarum*; 4: *S. meliloti lpsB*⁻ + *rfaC* de *M. loti*; 5: *S. meliloti lpsB*⁻ + *lpsB* de *S. meliloti*; 6: *S. meliloti lpsB*⁻ + *lpcC* de *B. japonicum*; 7: *S. meliloti lpsB*⁻ + *lpcC* de *A. tumefaciens*; 8: *S. meliloti lpsB*⁻ + *lpcC* de *B. melitensis*; 9: *S. meliloti lpsB*⁻ + *lpcC* de *B. henselae*; 10: *S. meliloti lpsB*⁻ + *rfaC* de *B. bronchiseptica*.

Una vez establecida la concentración de SDS que permite diferenciar el fenotipo salvaje del mutante, se procedió a evaluar si la complementación con *lpcC* de *R. leguminosarum*, *B. japonicum*, *A. tumefaciens*, *B. melitensis*, *B. henselae* y *rfaC* de *M. loti* y *B. bronchiseptica* son capaces de restituir la capacidad de crecer en medio de cultivo suplementado con el detergente.

Como puede observarse en la Figura 16 ninguno de los genes utilizados para complementar al mutante *lpsB* de *S. meliloti* fue capaz de restituir la capacidad de crecer en medio suplementado con SDS. Solamente se observó crecimiento en la cepa salvaje y la mutante complementada con su alelo salvaje. Estos resultados sugieren que ninguno de estos genes es capaz de restituir el fenotipo salvaje, para corroborar estos resultados se determinó el perfil electroforético del LPS de las distintas cepas (véase apartado I-18.1.).

I-17.2. Evaluación de la capacidad de *A. tumefaciens* para crecer en medios con SDS

En primera instancia fue necesario determinar la concentración de SDS apropiada para poder diferenciar el fenotipo del LPS salvaje del mutante. Dicha concentración de detergente fue 0,75% (p/v). A concentraciones mayores de SDS no se observó crecimiento del mutante ni de la cepa salvaje.

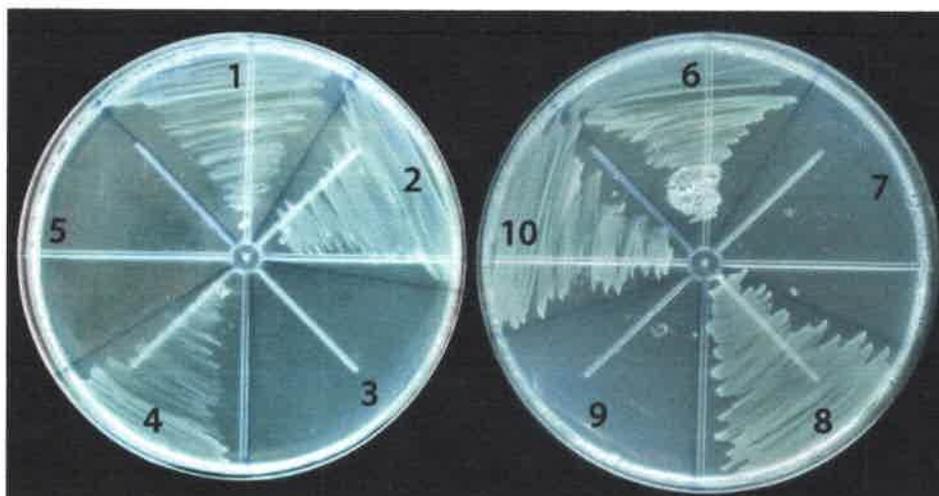


Figura 17. Crecimiento de *A. tumefaciens* en medios suplementados con SDS 0,075% (p/v). 1: *A. tumefaciens* salvaje, 2: *A. tumefaciens* *lpcC*⁻ + *lpcC* de *A. tumefaciens*; 3: *A. tumefaciens* *lpcC*⁻; 4: *A. tumefaciens* *lpcC*⁻ + *lpcC* de *R. leguminosarum*. 5: *A. tumefaciens* *lpcC*⁻ + *rfaC* de *M. loti*. 6: *A. tumefaciens* *lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. japonicum*; 7: *A. tumefaciens* *lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. henselae*; 8: *A. tumefaciens* *lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. melitensis*; 9: *A. tumefaciens* *lpcC*⁻ + *rfaC* de *B. bronchiseptica*; 10: *A. tumefaciens* *lpcC*⁻ + *lpsB* de *S. meliloti*.

En la Figura 17 puede observarse que las complementaciones del mutante *lpcC* de *A. tumefaciens* con *lpcC* de *R. leguminosarum*, *B. japonicum*, *B. melitensis* y *lpsB* de *S. meliloti* fueron capaces de restituir la capacidad del mutante *lpcC* de *A. tumefaciens* de crecer en medio suplementado SDS. En contraste, *lpcC* de *B. henselae*, *rfaC* de *M. loti* y *B. bronchiseptica* no restauraron el fenotipo salvaje. Estos resultados sugieren que la complementaciones con los genes que restituyen el crecimiento en medio suplementado con el detergente, pueden restituir el fenotipo salvaje del LPS. Para corroborar esta hipótesis se analizó el perfil electroforético del LPS de las distintas cepas de *A. tumefaciens* (véase apartado I-18.2).

I-17.3. Evaluación de la capacidad de *B. japonicum* para crecer en medios con SDS

Como puede observarse en la Figura 18, la cepa salvaje de *B. japonicum* fue capaz de crecer en el medio suplementado con 0,05% (p/v) de SDS, mientras que el mutante *lpcC* no lo hizo. De este modo, la concentración 0,05% (p/v) de SDS resulta apropiada para diferenciar el fenotipo salvaje del mutante. De las 5 especies de rizobios que se evaluaron, *B. japonicum* presenta la menor tolerancia al detergente SDS.

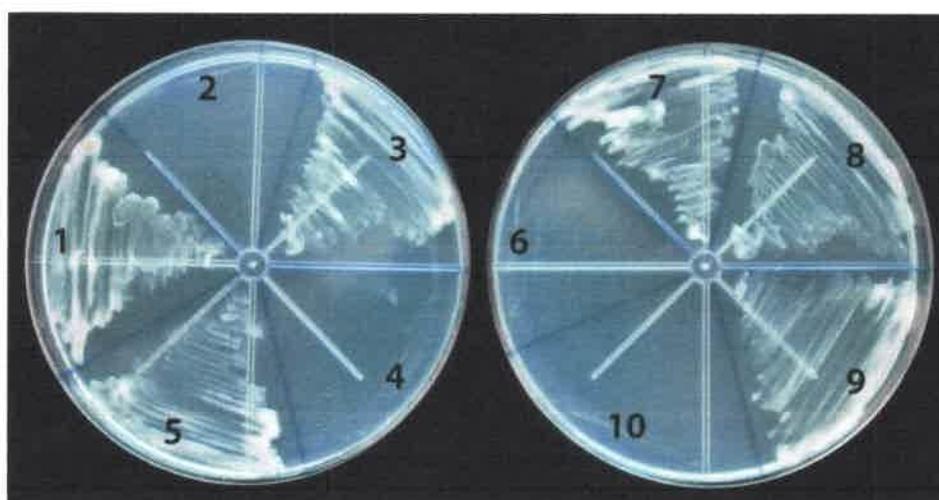


Figura 18. Crecimiento de *B. japonicum* en medios suplementados con SDS 0,05% (p/v). 1: *B. japonicum* salvaje; 2: *B. japonicum lpcC*⁻; 3: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. japonicum*; 4: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpsB* de *S. meliloti*; 5: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *R. leguminosarum*; 6: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. henselae*; 7: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. melitensis*; 8: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *A. tumefaciens*; 9: *B. japonicum lpcC*⁻ + *rfaC* de *M. loti*; 10: *B. japonicum lpcC*⁻ + *rfaC* de *B. bronchiseptica*.

Luego de establecer la concentración óptima del detergente que permite diferenciar los fenotipos de la cepa *lpcC* mutante del de la cepa salvaje, se evaluó si la complementación con *lpsB* de *S. meliloti*, *lpcC* de *R. leguminosarum*, *A. tumefaciens*, *B. melitensis*, *B. henselae* y *rfaC* de *M. loti* y *B. bronchiseptica* son capaces de restituir la capacidad de crecer en medio de cultivo suplementado con el detergente.

En la Figura 18 se observa que al complementar al mutante *lpcC* de *B. japonicum* con *lpcC* de *R. leguminosarum*, *B. melitensis*, *A. tumefaciens*, y *rfaC* de *M. loti* se restituye la capacidad de crecimiento en medios suplementado con SDS 0,05% (p/v). Estos resultados sugieren que en los casos donde se restituyó la capacidad del mutante *lpcC* de crecer en medios con SDS, también se restableció la estructura del LPS, para corroborar estos resultados se analizó el perfil electroforético del LPS de las distintas cepas (véase apartado I-18.3).

I-17.4. Evaluación de la capacidad de *R. leguminosarum* para crecer en medios con SDS

Al igual que en los casos anteriores, primeramente se determinó la concentración del detergente en la cual la cepa salvaje de *R. leguminosarum* fuera capaz de crecer, mientras que su mutante *lpcC* no. Dicha concentración de SDS fue 0,075% (p/v).

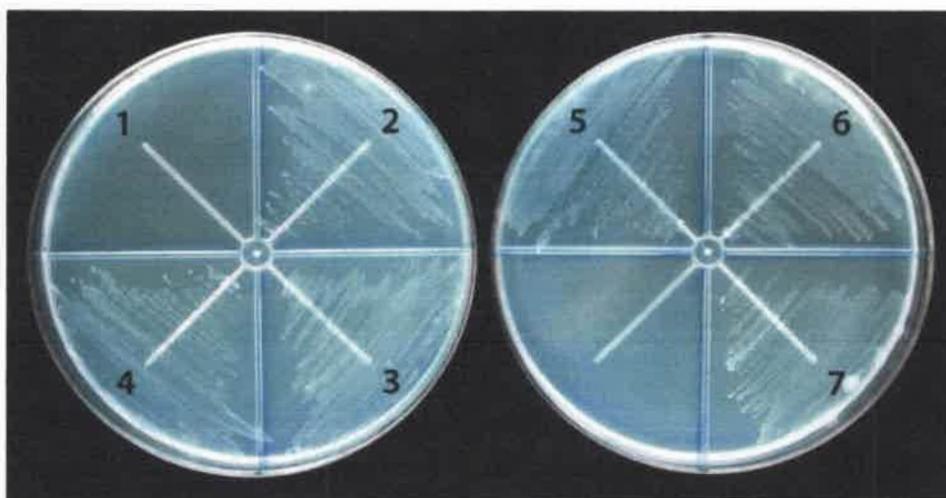


Figura 19. Crecimiento de *R. leguminosarum* en medios suplementados con SDS 0,075% (p/v). 1: *R. leguminosarum lpcC*⁻; 2: *R. leguminosarum* salvaje; 3: *R. leguminosarum lpcC*⁻ + *lpcC* de *R. leguminosarum*; 4: *R. leguminosarum lpcC*⁻ + *lpsB* de *S. meliloti*; 5: *R. leguminosarum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. japonicum*; 6: *R. leguminosarum lpcC*⁻ + *lpcC* de *A. tumefaciens*; 7: *R. leguminosarum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. melitensis*.

En la Figura 19 puede observarse que *lpsB* de *S. meliloti*, *lpcC* de *B. japonicum*, *A. tumefaciens* y *B. melitensis* restablecieron la capacidad del mutante *lpcC* *R. leguminosarum* de crecer en medios suplementados con SDS. Este resultado permite suponer que los mencionados genes ortólogos también restituyen el fenotipo salvaje del LPS. Para determinar si este supuesto es correcto se analizó el perfil electroforéticos del LPS de las distintas cepas de *R. leguminosarum*.

I-17.5. Evaluación de la capacidad de *M. loti* para crecer en medios con SDS

En el momento de determinar la concentración de SDS que permita diferenciar los fenotipos salvaje y mutante se observó que las tres cepas mostraban un crecimiento semejante en las distintas concentraciones de detergente ensayadas. La máxima concentración de SDS en la cual se observó crecimiento en las tres cepas fue 0,15 % (p/v).

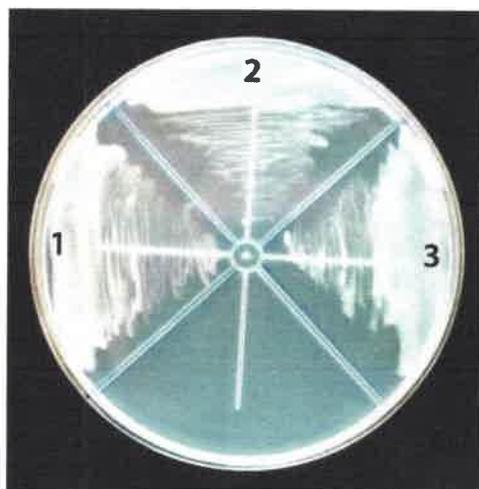


Figura 20. Crecimiento de *M. loti* en medios suplementados con SDS 0,15 % (p/v). 1: *M. loti* salvaje; 2: *M. loti rfaC*⁻; 3: *M. loti rfaF*⁻.

En el caso de los mutantes *rfaC* y *rfaF* de *M. loti*, no se observaron diferencias en cuanto a la capacidad de crecer en medio suplementado con SDS, comparados con la cepa salvaje (Figura 20).

En primera instancia se interrumpió la secuencia de ADN que codifica para el gen *rfaC* mediante integración de plásmido. Luego de corroborar la correcta inserción del plásmido por PCR (imagen no mostrada), y al no observar diferencias en crecimiento entre la cepa mutante y la salvaje, en medios suplementados con SDS. Por análisis bioinformáticos en el genoma de *M. loti* se encontró la existencia de un gen que codifica para una segunda heptosiltransferasa, denominada *rfaF*. De igual manera que para *rfaC*, se realizó la interrupción de la secuencia que codifica para *rfaF* en el genoma de *M. loti*. En el caso del mutante *rfaF*, tampoco se observó diferencias de crecimiento en medios suplementados con detergente, con respecto a la cepa salvaje.

Cuando se comparó el perfil electroforético de ambos mutantes con respecto al de la cepa salvaje, no se encontraron diferencias (véase apartado I-18.5).

Posiblemente ambos genes se complementen entre sí, para confirmar este supuesto, debería obtenerse una cepa doble mutante en las secuencias que codifican para los genes *rfaC* y *rfaF*.

En cuanto a lo observado sobre la capacidad de crecimiento en medios suplementados con SDS de las diferentes cepas mutantes y sus respectivas complementaciones, se puede asumir que las mutaciones en los genes *lpsB*, *lpcC* y *rfaC* afectan considerablemente la integridad y estabilidad de la membrana externa.

Existen evidencias de cepas cuyas membranas externas poseen alteraciones y como consecuencia presentan un aumento en la sensibilidad a detergentes como SDS, DOC como así también a otros compuestos y condiciones como etanol o pH ácido, respectivamente (Genevaux *et al.*, 1999; Ferguson *et al.*, 2002, Cambell *et al.*, 2003). Estos resultados serán corroborados al analizar el perfil electroforético de los LPS de las distintas cepas.

I-18. Efecto de mutaciones en *lpsB* o *lpcC* sobre la estructura del LPS en rizobios

Conjuntamente a la evaluación realizada en medio de cultivo suplementado con SDS, se analizó el perfil electroforético de los LPS mediante electroforesis en geles de Poliacrilamida-Acido Deoxicólico (DOC-PAGE). De esta manera se evidenció que las mutaciones en los genes que codifican para las glicosiltransferasas en estudio, afectan el perfil electroforético del LPS. Asimismo, se llevaron a cabo estudios de complementación cruzada con genes ortólogos con el objeto de determinar si los mismos son capaces de restituir el fenotipo del LPS de la cepa salvaje. Además de esta manera se corroboraron los resultados preliminares de las complementaciones cruzadas obtenidas mediante los ensayos en medios con SDS. Los métodos de aislamiento de LPS, como así las condiciones de separación de LPS por electroforesis se describen en el apartado I-11.

I-18.1. Complementación heteróloga del mutante *lpsB* de *Sinorhizobium meliloti* con ortólogos de *R. leguminosarum*, *B. japonicum*, *A. tumefaciens*, *B. melitensis*, *B. henselae* y *rfaC* de *M. loti* y *B. bronchiseptica*: Análisis del perfil electroforético de los LPS mediante DOC-PAGE

En esta ocasión puede visualizarse solamente la forma correspondiente al LPS II (Rugoso), lo cual puede deberse a que *S. meliloti* produce mayoritariamente LPS II (Cambell *et al.*, 2003), o posiblemente el método de extracción de LPS con Polimixina no resulte eficiente para la purificación de LPS I. En la Figura 21 se observa que el LPS de la cepa salvaje, *S. meliloti*, como también el correspondiente al mutante *lpsB* complementado con su alelo salvaje, presenta menor movilidad electroforética que el LPS del mutante *lpsB*. Teniendo en cuenta que la mutación en el gen *lpsB* resulta en LPS con un core incompleto, es esperable que el LPS de dicho mutante posea una mayor movilidad en comparación al LPS con core completo de la cepa salvaje.

En los ensayos de complementación del mutante *lpsB* de *S. meliloti* con *lpcC* de *R. leguminosarum*, *B. japonicum*, *A. tumefaciens*, *B. melitensis*, *B. henselae* (distintos ortólogos de *lpsB*), y *rfaC* de *M. loti* y *B. bronchiseptica*; no se observó en ninguno de los casos restauración del fenotipo salvaje en la estructura del LPS.



Figura 21. Análisis del LPS de *S. meliloti* mediante DOC-PAGE. 1: *S. meliloti* salvaje; 2: *S. meliloti lpsB*⁻; 3: *S. meliloti lpsB*⁻ + *lpsB* de *S. meliloti*; 4: *S. meliloti lpsB*⁻ + *lpcC* de *R. leguminosarum*; 5: *S. meliloti lpsB*⁻ + *rfaC* de *M. loti*; 6: *S. meliloti lpsB*⁻ + *lpcC* de *B. japonicum*; 7: *S. meliloti lpsB*⁻ + *lpcC* de *A. tumefaciens*; 8: *S. meliloti lpsB*⁻ + *lpcC* de *B. melitensis*; 9: *S. meliloti lpsB*⁻ + *lpcC* de *B. henselae*; 10: *S. meliloti lpsB*⁻ + *rfaC* de *B. bronchiseptica*.

El hecho de que *lpcC* de *R. leguminosarum* no restituya el fenotipo salvaje, coincide con los resultados obtenidos por Kanipes *et al.* (2003b). Dichos autores han sugerido que en *S. meliloti*, el primer residuo de azúcar unido al precursor Kdo₂-lípidio IV_A corresponde a una molécula de Glc (Russa *et al.*, 1996). Por su parte, *LpcC* de *R. leguminosarum* posee únicamente capacidad de depositar residuos de manosa sobre dicho precursor.

Una de las posibles razones por la que ninguno de los distintos ortólogos de *lpsB* no complementen funcionalmente al mutante *lpsB* de *S. meliloti* puede deberse a que poseen una actividad glicosiltransferasa diferente, o bien no reconozcan el precursor Kdo₂-lípidio IV_A del LPS de *S. meliloti*, no pudiendo así continuar con dicha biosíntesis y dando como resultado un LPS truncado o incompleto.

I-18.2. Complementación heteróloga del mutante *lpcC* de *Agrobacterium tumefaciens* con ortólogos de *R. leguminosarum*, *B. japonicum*, *S. meliloti*, *B. melitensis*, *B. henselae* y *rfaC* de *M. loti* y *B. bronchiseptica*: Análisis del perfil electroforético de los LPS mediante DOC-PAGE

A diferencia de lo observado en *S. meliloti*, varios ortólogos de *lpcC* fueron capaces de complementar la mutación en el gen *lpcC* de *A. tumefaciens* restituyendo el fenotipo salvaje del LPS. Dichos resultados se observan en las calles: 4, 5, 7 y 8 de la Figura 22 que corresponden al perfil electroforético del LPS del mutante *lpcC* de *A. tumefaciens* complementado con *lpsB* de *S. meliloti*, *lpcC* de *R. leguminosarum*, *rfaC* de *M. loti* y *lpcC* de *B. melitensis*, respectivamente.

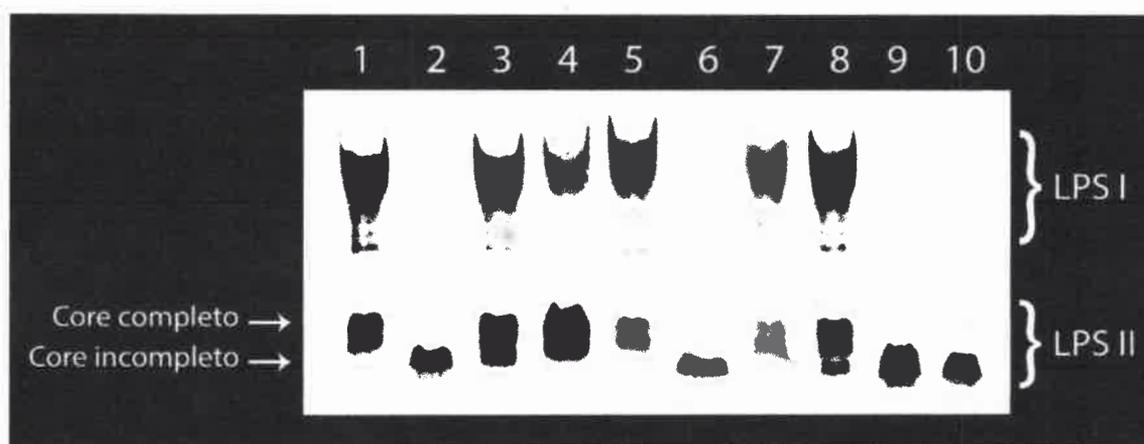


Figura 22. Análisis del LPS de *A. tumefaciens* mediante DOC-PAGE. 1: *A. tumefaciens* salvaje; 2: *A. tumefaciens lpcC*⁻; 3: *A. tumefaciens lpcC*⁻ + *lpcC* de *A. tumefaciens*; 4: *A. tumefaciens lpcC*⁻ + *lpsB* de *S. meliloti*; 5: *A. tumefaciens lpcC*⁻ + *lpcC* de *R. leguminosarum*; 6: *A. tumefaciens lpcC*⁻ + *rfaC* de *M. loti*; 7: *A. tumefaciens lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. japonicum*; 8: *A. tumefaciens lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. melitensis*; 9: *A. tumefaciens lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. henselae*; 10: *A. tumefaciens lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. bronchiseptica*.

Si bien en *S. meliloti* solamente pudo observarse el LPS II o LPS rugoso (véase Figura 21.), en la cepa salvaje de *A. tumefaciens* se visualiza tanto la forma correspondiente al LPS I como al LPS II. Ambas estructuras del LPS también se visualizan en el perfil del LPS del mutante *lpcC* complementado con los ortólogos de *S. meliloti*, *R. leguminosarum*, *B. melitensis* y *rfaC* de *M. loti*. Asimismo como era de esperarse, se observa un LPS con fenotipo salvaje en el mutante *lpcC* de *A. tumefaciens* complementado con su correspondiente alelo salvaje (Figura 22, calle 3). En el mutante *lpcC* de *A. tumefaciens* no se visualiza la forma correspondiente al LPS I (liso), como tampoco en los casos donde no ocurre complementación (Figura 22 calles 6, 9 y 10). Posiblemente una de las causas por la que algunos de los ortólogos de *lpcC* no complementen al mutante de *A. tumefaciens* puede deberse a que las enzimas ortólogas no reconozcan el precursor Kdo₂-lípidio IV_A donde depositar el azúcar para el cual tienen especificidad, por lo tanto la biosíntesis del LPS se detendría en este punto, dando como resultado un LPS truncado de menor movilidad electroforética. Otra posibilidad puede ser que las enzimas ortólogas tengan actividades glicosiltransferasas diferentes y

posiblemente depositen en el precursor del LPS de *A. tumefaciens* el residuo de azúcar para el cual tienen especificidad, pero al ser un azúcar distinto al de la estructura normal del LPS, la enzima que agrega el siguiente hidrato de carbono en la biosíntesis, podría no reconocer este azúcar como aceptor con lo cual la biosíntesis se detendría, también dando como resultado un LPS truncado.

Teniendo en cuenta que el mutante *lpcC* de *A. tumefaciens* es complementado por *lpcC* de *R. leguminosarum* y además se ha demostrado que esta enzima posee específicamente actividad manosiltransferasa (Kanipes, *et al.*, 2003b), se podría inferir que el hidrato de carbono que ocupa esa posición en el LPS de *A. tumefaciens* es un residuo de manosa. En base a esta observación se puede sugerir que la actividad de LpcC de *A. tumefaciens* es manosiltransferasa. Avalando esta inferencia, De Castro *et al.* (2006) al caracterizar la estructura del core de *A. tumefaciens* TT111, describen que el primer azúcar del core se encuentra ocupado por un residuo de manosa.

No es extraño que *lpsB* de *S. meliloti* complemente al mutante *lpcC* de *A. tumefaciens*, ya que como se ha descrito anteriormente LpsB no solo posee actividad glucosiltransferasa sino también manosiltransferasa (Kanipes, *et al.*, 2003b). El mutante *lpcC* de *A. tumefaciens* también es complementado por *lpcC* de *B. japonicum*. Estas dos especies mostraron complementaciones recíprocas. Carlson & Krishnaiah (1992) han descrito una pequeña porción del core de la cepa *B. japonicum* 61A101C, en donde se observó que unido al precursor Kdo₂-lípidio IV_A se encontraba un residuo de Man o Glc, por lo tanto sugerimos que LpcC de *B. japonicum* tendría actividad manosiltransferasa. Esto también llevaría a suponer que el primer azúcar del core de *B. japonicum* es un residuo de Man. Además *lpcC* de *B. melitensis* es capaz de complementar al mutante *lpcC* de *A. tumefaciens*, si bien no se conoce la estructura del core del LPS en *B. melitensis*; si se conoce dicha estructura en *Ochrobactrum anthropi*. Estas dos especies bacterianas pertenecen a la familia *Brucellaceae* y presentan un alto grado de similitud en sus genomas (Foster *et al.*, 2009). En *O. anthropi*, el primer residuo de azúcar unido al precursor Kdo₂-lípidio IV_A, corresponde a una molécula de Man (Barquero-Calvo *et al.*, 2009); asumiendo que ocurre lo mismo en *Brucella melitensis*, se podría suponer que LpcC de *B. melitensis* tiene actividad manosiltransferasa. Por lo expuesto en este apartado se infiere que el primer hidrato de carbono unido al precursor Kdo₂-lípidio IV_A es un residuo de Man, y por lo tanto que LpcC de *A. tumefaciens* posee actividad manosiltransferasa.

I-18.3. Complementación heteróloga del mutante *lpcC* de *Bradyrhizobium japonicum* con ortólogos de *R. leguminosarum*, *A. tumefaciens*, *S. meliloti*, *B. melitensis*, *B. henselae* y *rfaC* de *M. loti* y *B. bronchiseptica*: Análisis del perfil electroforético de los LPS mediante DOC-PAGE.

En contraste a lo observado en *A. tumefaciens* y *S. meliloti*, la cepa salvaje de *B. japonicum* presenta un perfil de LPS en forma de escalera, no diferenciándose las formas correspondientes al LPS I y LPS II. Este perfil se asemeja al patrón del LPS de enterobacterias como *E. coli* y *Salmonella* spp. (Raetz & Whitfield, 2002), en las cuales el primer residuo de azúcar sobre el Kdo₂-lípidio IV_A corresponde a una molécula de heptosa.

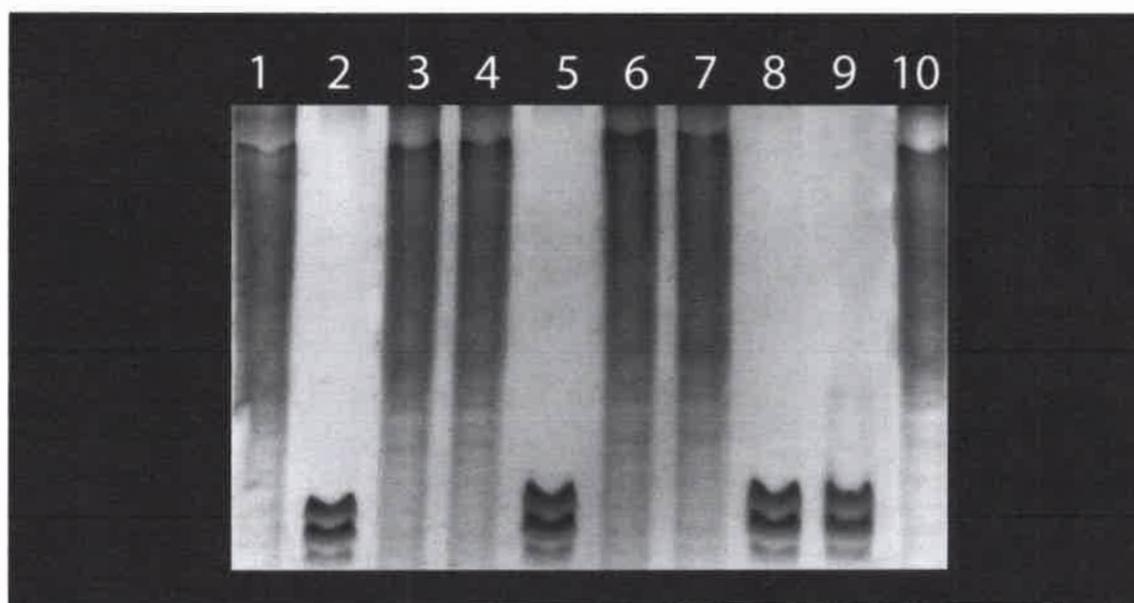


Figura 23. Análisis del LPS de *B. japonicum* mediante DOC-PAGE. 1: *B. japonicum* salvaje 2: *B. japonicum lpcC*⁻; 3: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. japonicum*; 4: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *R. leguminosarum*; 5: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpsB* de *S. meliloti*; 6: *B. japonicum lpcC*⁻ + *rfaC* de *M. loti*; 7: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *A. tumefaciens*; 8: *B. japonicum lpcC*⁻ + *rfaC* de *B. bronchiseptica*; 9: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. henselae* 9: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. melitensis*.

En la Figura 23 (calle 2) se observa que una mutación en *lpcC* de *B. japonicum* elimina el fenotipo en escalera del LPS. Esta mutación puede ser complementada por los ortólogos *lpcC* de *R. leguminosarum*, *A. tumefaciens* y *B. melitensis* (calles 5, 6 y 8 respectivamente). A su vez dicha mutación también fue complementada por *rfaC* de *M. loti* (Figura 23, calle 6). Es llamativo que RfaC de *M. loti* complemente la mutación *lpcC* de *B. japonicum*, ya que la primera enzima posee actividad heptosiltransferasa. No obstante, se ha descrito que WaaC de *E. coli*, en ausencia de heptosa, puede utilizar manosa para glicosilar el precursor Kdo₂-lípidio IV_A (Kadrmas & Raetz 1998). Es posible que RfaC de *M. loti* deposite un residuo de manosa sobre el precursor Kdo₂-lípidio IV_A de

B. japonicum, o bien uno de heptosa; y este último no sea diferenciado por la glicosiltransferasa que continúe con la adición del azúcar siguiente, con lo cual no se interrumpa la síntesis del LPS. Teniendo en cuenta que la mutación en *lpcC* de *B. japonicum* puede ser complementada por *lpcC* de *R. leguminosarum*, cuya actividad es estrictamente manosiltransferasa, es posible inferir que el primer hidrato de carbono unido al precursor Kdo₂-lípidio IV_A sea un residuo de Man y por lo tanto que la actividad de LpcC de *B. japonicum* sea manosiltransferasa. También el mutante *lpcC* de *B. japonicum*, es complementado por *lpcC* de *A. tumefaciens*. Por lo discutido en el apartado anterior, se infiere que esta enzima, tiene capacidad manosiltransferasa; por lo tanto estaría depositando un residuo de Man en el precursor Kdo₂-lípidio IV_A, y de esta manera la síntesis del LPS seguiría en curso.

Por otra parte, el mutante *lpcC* de *B. japonicum* es complementado por *lpcC* de *Brucella melitensis*. Esta última, (como se comentó anteriormente) al poseer un genoma con alto grado de similitud con *O. anthropi*, se asume que posee un residuo de manosa unido al precursor Kdo₂-lípidio IV_A, asumiendo que ocurre lo mismo en *B. melitensis*, se podría inferir que LpcC de *B. melitensis* también tendría actividad manosiltransferasa.

Por lo expuesto en este apartado, y junto a los reportes de Carlson & Krishnaiah (1992) donde han descrito que en *B. japonicum* 61A101C, el primer residuo unido al precursor Kdo₂-lípidio IV_A puede ser un residuo de Man o Glc; se infiere que LpcC de *B. japonicum* tendría actividad manosiltransferasa.

I-18.4. Complementación heteróloga del mutante *lpcC* de *Rhizobium leguminosarum* con ortólogos de *B. japonicum*, *S. meliloti*, *B. melitensis*, *A. tumefaciens*: Análisis del perfil electroforético de los LPS mediante DOC-PAGE

La cepa mutante *lpcC* de *R. leguminosarum* fue obtenida por cortesía del Dr. C. Ronson (Kadrmaz *et al.*, 1998).

Al igual que con las anteriores cepas, el mutante *lpcC* de *R. leguminosarum* también se complementó con sus ortólogos *lpsB* de *S. meliloti*, *lpcC* de *A. tumefaciens*, *B. japonicum*, *B. melitensis*, *B. henselae* y *rfaC* de *M. loti* y *B. Bronchiseptica*. Los plásmidos que contienen los distintos ortólogos antes citados fueron movilizados a la cepa mutante por medio de conjugación biparental (véase apartado I-7.3). Durante este proceso de conjugación, más precisamente en el momento de la selección de las cepas transconjugantes en placas suplementadas con el antibiótico Tc; únicamente se obtuvo crecimiento en las cepas de *R. leguminosarum lpcC* mutante complementadas en *trans*

con su propio alelo salvaje, como también con los ortólogos *lpsB* de *S. meliloti* y *lpcC* de *B. japonicum*, *A. tumefaciens* y *B. melitensis*. De estas cepas nuevas cepas obtenidas, se analizaron los perfiles electroforéticos de sus LPS mediante DOC-PAGE (Figura 24).

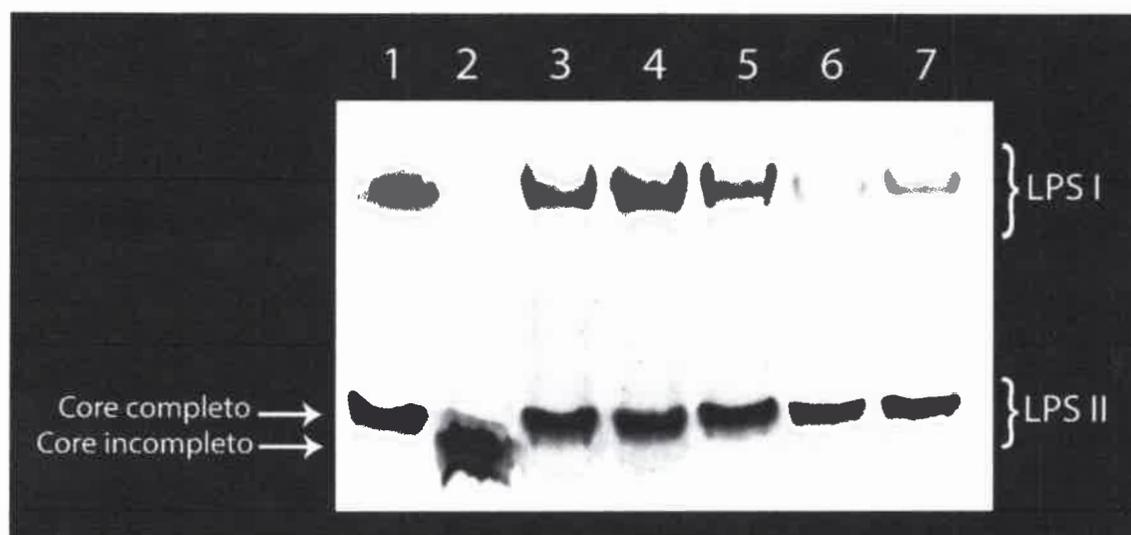


Figura 24. Análisis del LPS de *R. leguminosarum* mediante DOC-PAGE. 1: *R. leguminosarum* salvaje; 2: *R. leguminosarum lpcC*⁻; 3: *R. leguminosarum lpcC*⁻ + *lpcC* de *R. leguminosarum*; 4: *R. leguminosarum lpcC*⁻ + *lpsB* de *S. meliloti*; 5: *R. leguminosarum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. japonicum*; 6: *R. leguminosarum lpcC*⁻ + *lpcC* de *A. tumefaciens*; 7: *R. leguminosarum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. melitensis*.

Al igual que con el perfil del LPS de *A. tumefaciens*, se visualizan tanto la forma correspondiente al LPS I como al LPS II. Ambos fenotipos del LPS también se observan en el perfil del LPS de la cepa *lpcC* mutante complementada con su alelo salvaje como así también en las complementadas con los ortólogos *lpsB* de *S. meliloti*, *B. japonicum*, *A. tumefaciens* y *B. melitensis*.

En el perfil electroforético del LPS de la cepa *lpcC* mutante de *R. leguminosarum* no se observa LPS I, solamente la forma correspondiente al LPS II, y esta última con mayor movilidad que el LPSII de la cepa salvaje y mutante complementada con sus respectivos ortólogos (véase Figura 24). Este cambio en la movilidad, al igual que en las cepas mutantes antes descritas, es debido a que el core del LPS en la cepa mutante se encuentra incompleto.

La restitución del fenotipo salvaje del LPS en el mutante *lpcC* de *R. leguminosarum* por parte de *LpsB* de *S. meliloti*, fue previamente reportada por Lagares *et al.* (2001).

En *R. leguminosarum*, se ha descrito que el primer hidrato de carbono unido al precursor Kdo₂-lípidio IV_A es un residuo de manosa (Kadrmas *et al.*, 1996). Asimismo, la

enzima (LpcC) responsable de la adición de dicho residuo al mencionado precursor, ha sido caracterizada por Kanipes *et al.*, (2003b) como una manosiltransferasa estricta.

En los apartados anteriores se ha discutido las posibles actividades glicosiltransferasas de LpcC de *B. japonicum*, *A. tumefaciens* y *B. melitensis*, arribando a la conclusión (por inferencia) que estas enzimas poseen actividad manosiltransferasa. El hecho que el mutante *lpcC* de *R. leguminosarum* sea complementado por estas enzimas, respalda dichas conclusiones.

Como se citó al inicio de este apartado, en el momento de llevar a cabo los estudios de complementación al mutante *lpcC* de *R. leguminosarum*, solo se observó crecimiento cuando se complementó con su propio alelo salvaje, *lpsB* de *S. meliloti* y *lpcC* de *B. japonicum*, *A. tumefaciens* y *B. melitensis*. Asimismo todos estos genes ortólogos restituyeron el fenotipo salvaje del perfil del LPS del mutante *lpcC* de *R. leguminosarum*.

Al intentar complementar al mencionado mutante con *lpcC* de *B. henselae* y *rfaC* de *M. loti* y *B. bronchiseptica*. Luego de llevada a cabo la conjugación (véase conjugación el apartado I-7.3), y en el paso de la selección de las cepas transconjugantes en presencia del antibiótico Tc (resistencia del vector) no se observó crecimiento. Tampoco se observó crecimiento al movilizar el plásmido pFAJ1708 (vacío) al mutante *lpcC* de *R. leguminosarum*. Es decir donde no hubo restitución del fenotipo salvaje por complementación heteróloga, no hubo crecimiento.

Para responder el interrogante de por qué no crecieron las cepas donde no se restituyó el fenotipo salvaje del LPS de la cepa mutante hay que tener en cuenta la estructura del lípido A de *R. leguminosarum* (véase Figura 3 en el apartado 2.4.1 de Consideraciones Generales). Dicha subunidad del LPS en la mayoría de las bacterias (excepto en *R. leguminosarum*) posee dos grupos fosfato unidas en las posiciones 1 y 4' de las GlcN proximal y distal respectivamente. Estos grupos fosfato tienen la capacidad de unir cationes divalentes y así estabilizar la membrana externa (Raetz & Whitfield 2002). En cambio *R. leguminosarum* no posee estos grupos fosfatos en las posiciones 1 y 4', sino que la posición 4' está sustituida con un residuo de GalUA y la GlcN proximal está oxidada a aminogluconato. Se cree que estos azúcares de carácter ácido cumplirían la misma función que los grupos fosfato, uniendo iones divalentes y estabilizando la membrana (Forsberg & Carlson 1998; Que-Gewirth *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2012).

Por otra parte, como se describió en este apartado, el antibiótico utilizado para seleccionar las colonias transconjugantes que portan el plásmido pFAJ1708 (y sus

derivados, véase Tabla 2) es Tc; este antibiótico tiene la capacidad de quelar iones divalentes (Yamaguchi *et al.*, 1990).

Resumiendo, tanto la cepa *lpcC* mutante de *R. leguminosarum* y las mutantes complementadas con *lpcC* de *B. henselae* y *rfaC* de *M. loti* y *B. bronchiseptica* presentan un LPS alterado, y sumado a esto que los grupos fosfatos del lípido A son reemplazados por azúcares ácidos de menor capacidad quelante de iones divalentes que los grupos fosfatos. Estos cambios en su conjunto resultarían en una desestabilización de la membrana externa. Debido a lo expuesto anteriormente y a la presencia de un antibiótico en el medio de cultivo que actuaría como quelante de estos iones divalentes, posiblemente la membrana externa sea muy inestable, a tal punto que no permita el crecimiento de las bacterias en donde no se restituyó la estructura del LPS.

I-18.5. Obtención de los mutantes *rfaC* y *rfaF* de *M. loti* y análisis del perfil electroforético de los LPS mediante DOC-PAGE

Al igual que con los rizobios descriptos anteriormente, se decidió mutar el gen que codifica para RfaC de *M. loti*. Esta glicosiltransferasa tendría actividad heptosiltransferasa, y no hexosiltransferasa como en el caso de los otros rizobios. La posible actividad de esta enzima fue inferida mediante el alineamiento de su secuencia aminoacídica, ya que presenta homología con RfaC de *E. coli*, *Shigella flexneri* y *Salmonella typhimorium*; y no con las hexosiltransferasas de los rizobios antes descriptos. Para evidenciar de manera preliminar si una mutación en *rfaC* altera el fenotipo del LPS se generó un mutante en dicho gen por mutagénesis sitio-dirigida mediante integración de plásmido (véase apartado I-8.1).

Al analizar el perfil electroforético del mutante *rfaC* de *M. loti* mediante DOC-PAGE (Figura 25) se observa que ambas formas del LPS, LPS I y LPS II no presentan cambios en su movilidad electroforética. Este resultado permite suponer que producto del gen mutado no participa en la biosíntesis del LPS o que el genoma de *M. loti* posee otra copia funcional de *rfaC*. Para descartar posibles errores durante la generación del mutante se corroboró mediante PCR que el plásmido se integró correctamente en el gen *rfaC* de *M. loti*.

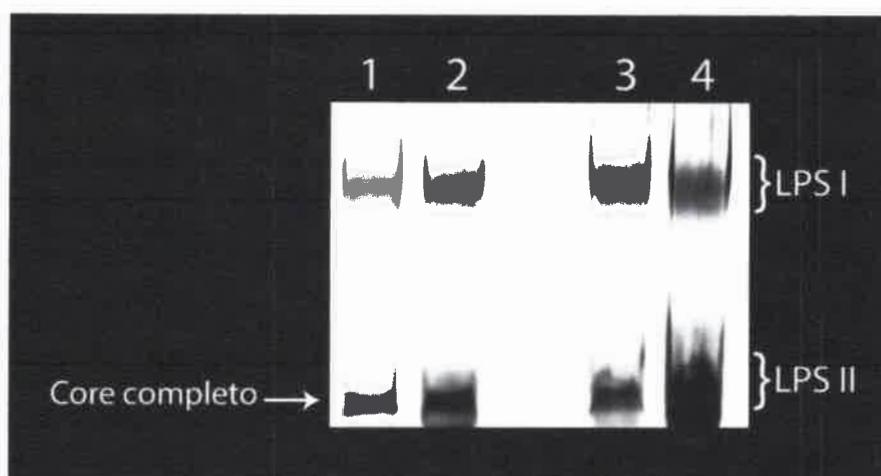


Figura 25. Análisis del LPS de *M. loti* mediante DOC-PAGE. 1: *M. loti* salvaje; 2: *M. loti rfaC*⁻; 3: *M. loti* salvaje; 4: *M. loti rfaF*⁻.

Luego de corroborar que la secuencia del gen que codifica para *rfaC* se encuentra correctamente interrumpida por la integración del plásmido, mediante alineamientos de secuencias se encontró que en el genoma de *M. loti* existe un segundo gen que codifica para una segunda heptosiltransferasa (RfaF) con el cual comparten el 30% de identidad y 53% de similitud.

De igual manera que para *rfaC*, se generó un mutante en *rfaF* por integración de plásmido cuyo fenotipo del LPS no mostró alteraciones en comparación a la cepa salvaje (Figura 25).

Estos resultados permiten suponer que en *M. loti* existen dos heptosiltransferasas que se complementan funcionalmente. Para confirmar este supuesto, debería obtenerse una cepa doble mutante en las secuencias que codifican para los genes *rfaC* y *rfaF*.

I-19. Alteraciones estructurales en el LPS resultan en cambios en la hidrofobicidad superficial y capacidad de formación de biofilm en rizobios

En *E. coli* se reportado que una mutación en el gen *waaghC* resulta en la producción de un LPS carente de antígeno O y core externo en el LPS, es decir un fenotipo similar a lo que se ha descrito en los apartados anteriores. Y como consecuencia de estas alteraciones en el LPS, la cepa mutante presenta una mayor hidrofobicidad superficial y un incremento en la capacidad de formar biofilm en placas de poliestireno; con respecto a la cepa salvaje (Nakao *et al.*, 2012).

I-19.1. Determinación de la hidrofobicidad superficial en rizobios

Como se citó en el apartado 2.4, en las bacterias Gram negativas el 75 % de la membrana externa está constituida por LPS, cuya porción más externa es el antígeno O. Este glicano, junto a otros componentes sacáridos que rodean al microorganismo, confiere a la bacteria la capacidad de ser “superficialmente hidrofílica”. Por lo tanto, si un cultivo de estas bacterias se mezcla con un componente hidrofóbico, como es el xileno, las células se mantendrán suspendidas en la fase acuosa. Al carecer de esta porción sacárida, como es el caso de los mutantes en estudio, se asume que las bacterias se vuelven “menos hidrofílicas, o más hidrofóbicas” y por lo tanto mostrarán alteraciones en la distribución entre la fase acuosa y orgánica.

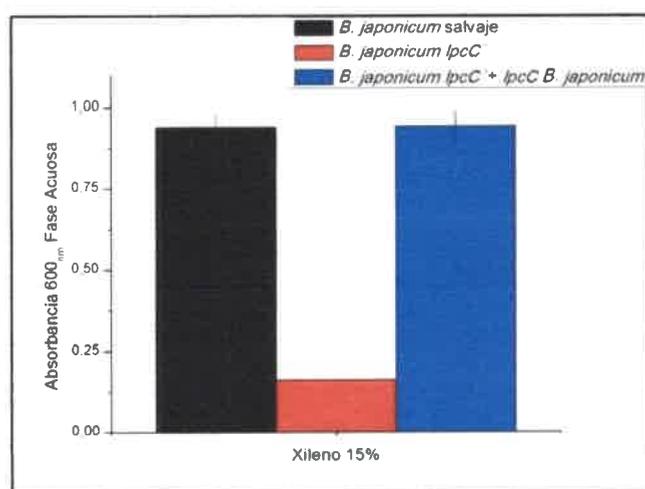


Figura 26. Efecto de la mutación en *lpcC* de *B. japonicum* sobre la hidrofobicidad superficial. *B. japonicum* salvaje, *B. japonicum lpcC*⁻, *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. japonicum*.

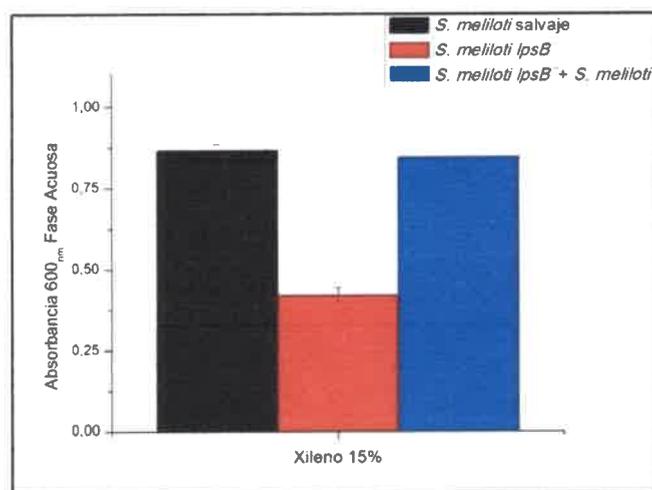


Figura 27. Efecto de la mutación en *lpsB* de *S. meliloti* sobre la hidrofobicidad superficial. *S. meliloti* salvaje, *S. meliloti lpsB*⁻, *S. meliloti lpsB*⁻ + *lpsB* de *S. meliloti*.

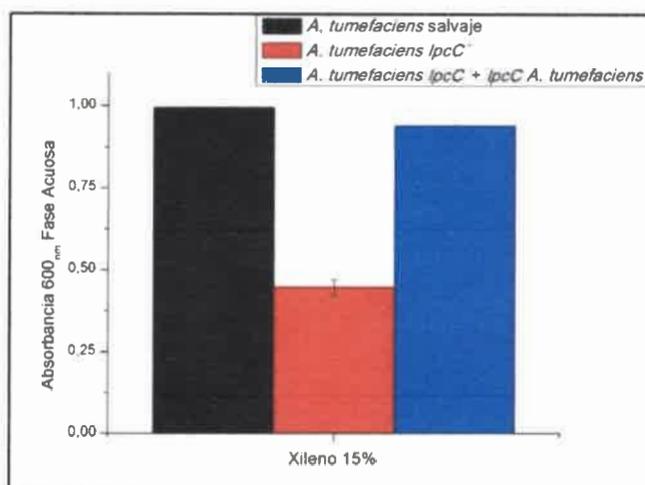


Figura 28. Efecto de la mutación en *lpcC* de *A. tumefaciens* sobre la hidrofobicidad superficial. *A. tumefaciens* salvaje, *A. tumefaciens lpcC*⁻, *A. tumefaciens lpcC*⁻ + *lpcC A. tumefaciens*.

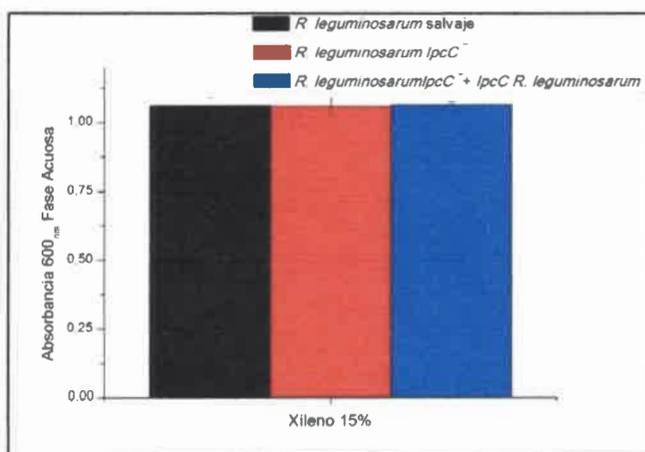


Figura 29. Efecto de la mutación en *lpcC* de *R. leguminosarum* sobre la hidrofobicidad superficial. *R. leguminosarum* salvaje, *R. leguminosarum lpcC*⁻, *R. leguminosarum lpcC*⁻ + *lpcC R. leguminosarum*.

Al determinar la absorbancia de la fase acuosa en las cuatro especies bacterianas analizadas (*B. japonicum*, *S. meliloti*, *A. tumefaciens* y *R. leguminosarum*), en las tres primeras se observaron claras diferencias entre las cepas salvajes (y mutantes complementadas con su correspondiente alelo salvaje), respecto a las cepas mutantes. En cambio, en el caso de *R. leguminosarum* tanto la cepa salvaje como la mutante y esta última complementada con su alelo salvaje, no presentaron diferencias en la hidrofobicidad superficial relativa.

Las cepas mutantes en *lpcC/lpsB* de *B. japonicum*, *S. meliloti* y *A. tumefaciens* mostraron una marcada disminución en la absorbancia de la fase acuosa; indicando un aumento en la hidrofobicidad superficial de las bacterias. En estos tres mutantes se

observa una restitución del grado de hidrofobicidad, similar a las cepas salvajes, cuando son complementadas en *trans* con los correspondientes alelos salvajes.

Park & So (2000) describieron un mutante *rfaF* (RfaF es una glicosiltransferasa implicada en la síntesis del core del LPS) de *B. japonicum* carente de antígeno O, el cual, al igual que el mutante *lpcC*, mostró un aumento en la hidrofobicidad superficial.

En *E. coli* se han descrito mutantes en el core del LPS y que carecen de antígeno O y como consecuencia de ello mostraron un aumento en su hidrofobicidad superficial, mayor autoagregación y formación de biofilm en comparación a la cepa salvaje (Nakao *et al.*, 2012).

De igual manera, en los mutantes *lpsB* de *S. meliloti* y *lpcC* de *A. tumefaciens* se observa un aumento en la hidrofobicidad de la superficie bacteriana, respecto a la cepa salvaje.

En el caso de *R. leguminosarum*, la mutación en el gen *lpcC* no produce cambios en la hidrofobicidad superficial. Esto puede deberse principalmente a que el core del LPS de *R. leguminosarum* es relativamente más hidrofílico (o menos hidrofóbico) que el antígeno O; ya que este último se encuentra altamente metilado y acetilado (Forsberg & Carlson 2008; Carlson *et al.*, 2010). Esta disminución de la hidrofobicidad en el core y, comparado con el antígeno O está dada por la presencia de cuatro residuos de GalUA, los cuales a causa de disminuir la hidrofobicidad relativa del core, aumenta la capacidad del mutante a particionarse en la fracción acuosa y no en la orgánica.

I-19.2. Determinación de la capacidad de formar biofilm en rizobios

En el apartado anterior se describió que la ausencia del antígeno O y la parte más externa del core del LPS, aumenta la hidrofobicidad superficial en *B. japonicum*, *S. meliloti* y *A. tumefaciens*, pero no así en *R. leguminosarum*. Dicho aumento en la hidrofobicidad, resulta en un incremento de la autoagregación de las bacterias en estado planctónico en cepas de *B. japonicum* cuyo LPS no posee antígeno O, (Lee, *et al.*, 2014).

Para determinar si el aumento de la hidrofobicidad observado en los mutantes *lpsB/lpcC* de *B. japonicum*, *S. meliloti* y *A. tumefaciens*, afecta la capacidad para formar biofilm, se cuantificó la capacidad de adhesión por parte de la células a placas de poliestireno.

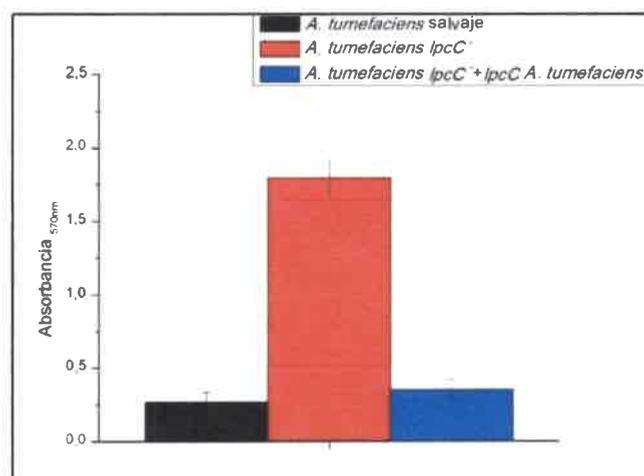


Figura 30. Cuantificación de la capacidad de formar biofilm en *A. tumefaciens*. *A. tumefaciens* salvaje, *A. tumefaciens lpcC*⁻, *A. tumefaciens lpcC*⁻ + *lpcC* de *A. tumefaciens*.

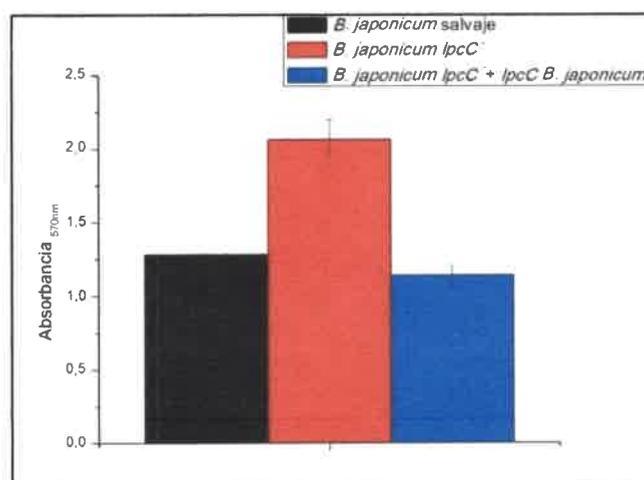


Figura 31. Cuantificación de la capacidad de formar biofilm en *B. japonicum*. *B. japonicum* salvaje, *B. japonicum lpcC*⁻, *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. japonicum*.

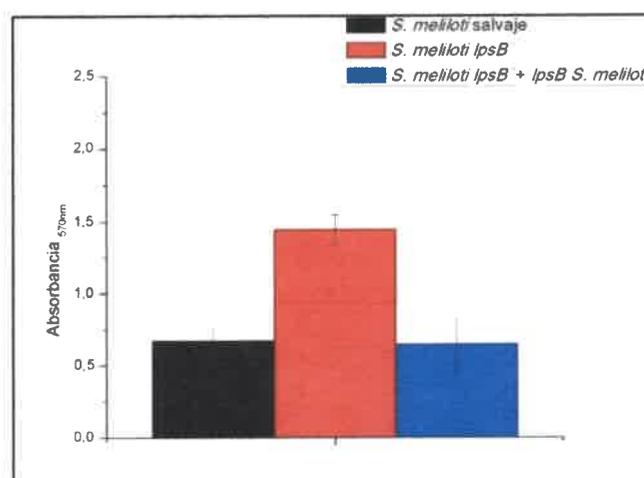


Figura 32. Cuantificación de la capacidad de formar biofilm en *S. meliloti*. *S. meliloti* salvaje, *S. meliloti lpsB*⁻, *S. meliloti lpsB*⁻ + *lpsB* de *S. meliloti*.

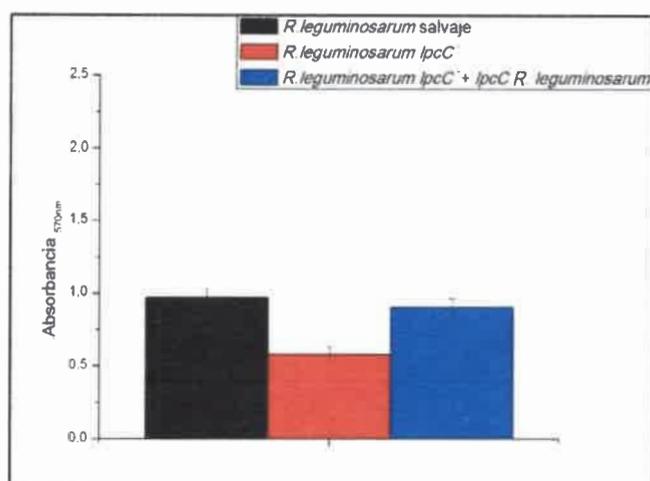


Figura 33. Cuantificación de la capacidad de formar biofilm en *R. leguminosarum*. *R. leguminosarum* salvaje, *R. leguminosarum* mutante *lpcC*, *R. leguminosarum* mutante *lpcC* complementado con *lpcC* de *R. leguminosarum*.

Al comparar la capacidad de formación de biofilm de las cepas mutantes de *A. tumefaciens*, *B. japonicum* y *S. meliloti*, respecto a las cepas salvajes, se observó un aumento de la adhesión celular en los tres casos. Este dato sugiere que la ausencia de la porción sacárida más externa del LPS afecta la capacidad de las células de formar biofilm sobre superficies plásticas. Este aumento en la capacidad de formar biopelículas puede estar asociado al incremento de la hidrofobicidad superficial de la bacteria como consecuencia de la ausencia del antígeno O (véase apartado anterior), resultando en una mayor adherencia a superficies hidrofóbicas como es el caso del poliestireno.

Se ha reportado en *B. japonicum*, *Rhizobium rhizogenes*, *Porphyromonas gingivalis* y *E. coli*, entre otras, que la ausencia del antígeno O, produce un aumento en la hidrofobicidad en la superficie bacteriana, y por consiguiente incrementa la capacidad de formar biopelículas en superficies plásticas (Lee *et al.*, 2010; Abarca- Grau *et al.*, 2012; Nakao *et al.*, 2006; Nakao *et al.*, 2012).

Sin embargo, un efecto contrario se ha encontrado en la cepa mutante *lpcC* de *R. leguminosarum*. Estos resultados coinciden con lo publicado recientemente por Russo *et al.*, (2015), donde mutantes de *R. leguminosarum* carentes de antígeno O disminuyen la capacidad de formar biofilm sobre placas de poliestireno.

Este aumento de adhesión a superficies de poliestireno por parte los mutantes de *A. tumefaciens*, *B. japonicum* y *S. meliloti* que carecen de antígeno O y como consecuencia son más hidrofóbicas, está dado por las propiedades fisicoquímicas de ambas superficies. El incremento en la hidrofobicidad en la superficie de las bacterias

aumenta su capacidad de adhesión sobre superficies, también hidrofóbicas, como es el caso de las placas de poliestireno (Korber *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2014).

El hecho que en *R. leguminosarum* se observe un efecto contrario puede estar dado por la composición sacárida del core, ya que en dicha especie bacteriana, esta subunidad del LPS es rica en GalUA (como se discutió en el apartado anterior), lo cual estaría aumentando la hidrofiliidad relativa de la superficie bacteriana, y como consecuencia disminuiría la capacidad de adhesión celular sobre superficies hidrofóbicas, como lo es el poliestireno (Forsberg & Carlson 2008; Carlson *et al.*, 2010; Russo *et al.*, 2015).

I-20. Análisis de la infectividad del mutante *lpcC* de *Agrobacterium tumefaciens* en *Kalanchoe daigremontiana*

Agrobacterium tumefaciens (formalmente *Rhizobium radiobacter*), al igual que los rizobios antes descritos; es una α -Proteobacteria del orden *Rhizobiales*, pero en vez de formar órganos fijadores de nitrógeno; causa tumores en los tallos u hojas de plantas dicotiledóneas conocidos como “agallas”, (Zupan *et al.*, 2000).

Al inicio de la infección *Agrobacterium* puede reconocer sustancias fenólicas que son liberadas por las heridas de las plantas, y es allí por donde ingresa al tejido vegetal ubicándose en los espacios intercelulares. Luego, es necesario la adhesión unipolar de las bacterias a las células vegetales y posteriormente la formación de biofilm. En el proceso de formación de esta biopelícula intervienen varios polisacáridos de la superficie bacteriana, como ser UPP (Polisacárido Uni-Polar), celulosa, succinoglicano, glucanos cíclicos y LPS (Heindl *et al.*, 2014).

Luego de producirse la adhesión celular irreversible sobre la superficie de la célula vegetal se transfiere a ésta el plásmido conocido como plásmido Ti (cadena simple de ADN), por medio de un complejo de proteínas denominadas Vir; hasta llegar al núcleo de la célula donde se integrará cromosómicamente (McCullen & Binns, 2006).

Este plásmido contiene genes involucrados en la producción de reguladores del crecimiento vegetal, necesarios para el desarrollo del tumor. El plásmido Ti también contiene genes que codifican enzimas que inducen la producción por parte de la planta de aminoácidos especializados llamados opinas. Éstas son una fuente de energía específica para *A. tumefaciens*, pero no para otros organismos (Zambryski, 1997).

Con el objeto de analizar si la infección por parte de *A. tumefaciens* requiere de la estructura completa del LPS, se llevó a cabo un ensayo de infección en hojas de

Kalanchoe daigremontiana. Como se describió en el apartado I-14, se infectaron hojas jóvenes de *K. daigremontiana* con la cepa salvaje y el mutante *lpcC* de *A. tumefaciens*.

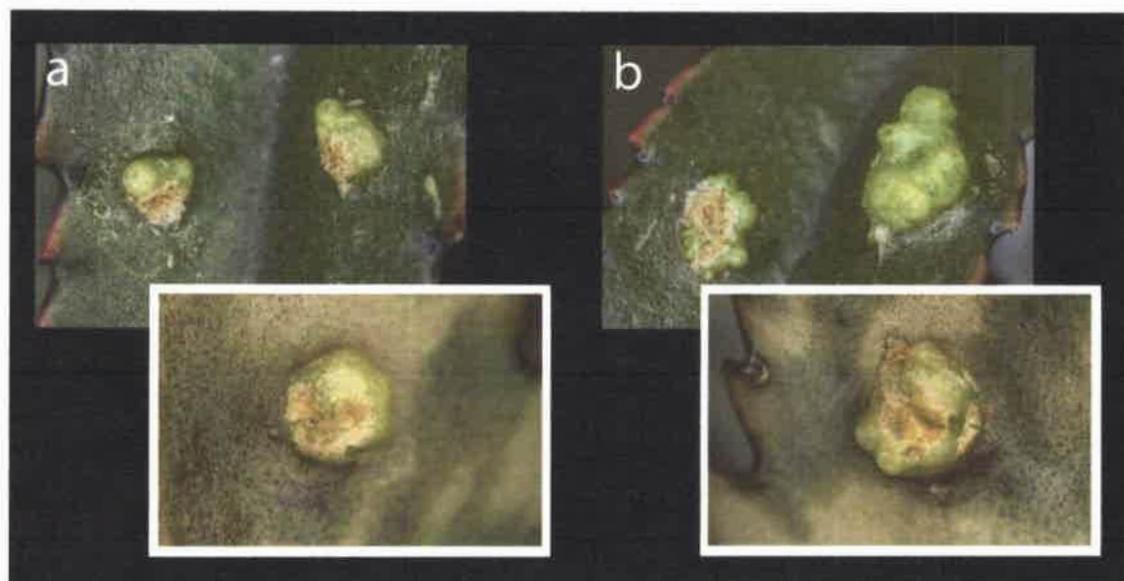


Figura 34. Tumores (agallas) inducidas por la infección con *A. tumefaciens*. a: Tumores en hojas de *K. daigremontiana* inducidos por *A. tumefaciens* salvaje; b: Tumores en hojas de *K. daigremontiana* inducidos por *A. tumefaciens lpcC*⁻.

Como puede observarse en la Figura I-34, la carencia del antígeno O y del core externo del LPS de *A. tumefaciens*, no son indispensables para producir una infección efectiva y como consecuencia la posterior formación de la agalla en las hojas de *K. daigremontiana*. Esto puede deberse a que en las etapas iniciales de la infección producida por *A. tumefaciens*, es necesaria la formación de biofilm sobre la superficie de la célula vegetal. Y como consecuencia el aumento en la capacidad de formación de biofilm, producto de la ausencia de antígeno O en el mutante *lpcC* de *A. tumefaciens*, posiblemente no afecte, incluso favorezca a las bacterias en las primeras etapas de infección.

I-21. Consideraciones finales

En resumen, en el presente capítulo hemos generado mutantes en las glicosiltransferasas LpsB y LpcC de bacterias del orden Rhizobiales y evaluado sus correspondientes fenotipos. Se demostró que mutaciones en estos genes afectan la movilidad electroforética del LPS debido a la síntesis de un LPS truncado. Asimismo

estas mutaciones resultan en un fenotipo pleiotrópico ya que también afectan la capacidad de formar biofilm y producen cambios en la hidrofobicidad superficial de los rizobios.

La complementación funcional de los mencionados mutantes con ortólogos del orden Rhizobiales demuestra que la glicosiltransferasa LpsB de *S. meliloti* es una glucosil/manosil transferasa a diferencia de sus ortólogos Rhizobiales que en concordancia con los resultados obtenidos en este capítulo se comportan como manosiltransferasas estrictas.

Intrigante es el caso de la heptosiltransferasa RfaC de *M. loti*, la cual fue capaz de restituir el fenotipo del LPS en el mutante *lpcC* de *B. japonicum*; pero no se observó complementación funcional con *S. meliloti*, *R. leguminosarum* y *A. tumefaciens*. Es importante mencionar que la estructura del LPS de *B. japonicum* difiere sustancialmente de la estructura de los LPS de *S. meliloti*, *R. leguminosarum* y *A. tumefaciens*. En el primer caso se asemeja a la estructura del LPS de las enterobacterias con una elevada heterogeneidad en el grado de polimerización del antígeno O.

Si bien las estructuras del lípido A de *B. japonicum* y *M. loti* presentan marcadas diferencias, tienen en común la presencia de un residuo de diaminoglucosa que está ausente en los otros rizobios; esta coincidencia podría en principio estar asociada al hecho que RfaC complemente funcionalmente al mutante *LpcC* de *B. japonicum*. Coincidentemente, el lípido de *B. melitensis* también posee dicho diaminoazúcar y *LpcC* de esta especie bacteriana también es capaz de complementar funcionalmente al mutante *lpcC* de *B. japonicum*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abarca-Grau, A. M., Burbank, L.P., de Paz, H. D., Crespo-Rivas, J. C., Marco-Noales, E., López, M.M., Vinardell, J.M., von Bodman, S. B., Penyalver, R.** (2012). Role for *Rhizobium rhizogenes* K84 cell envelope polysaccharides in surface interactions. *Appl Environ Microbiol.* 78(6):1644-51
- Abarca-Grau, A. M., Penyalver, R., López, M. M., Marco-Noales, E.** (2011). Pathogenic and non-pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* and *A. vitis* strains form biofilms on abiotic as well as on root surfaces. *Plant Pathology.* 60. (3): 416-425.
- Anderson, M.S., Robertson, A.D., Macher, I., Raetz, C.R.** (1988). Biosynthesis of lipid A in *Escherichia coli*: identification of UDP-3-O-[(R)-3-hydroxymyristoyl]-alpha-D-glucosamine as a precursor of UDP-N2,O3-bis[(R)-3-hydroxymyristoyl]-alpha-Dglucosamine. *Biochemistry.* 27(6):1908-1917.
- Anderson, M.S., Raetz, C.R.**, (1987). Biosynthesis of lipid A precursors in *Escherichia coli*. A cytoplasmic acyltransferase that converts UDP-Nacetylglucosamine to UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine. *J Biol Chem.* 262(11):5159-1969.
- Araujo, R., Robleto, E., Handelsman, J.** (1994). A hydrophobic mutant of *Rhizobium etli* altered in nodulation competitiveness and growth in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1430–1436.
- Babinski, K.J., Raetz, C. R.H.**, (1998) Identification of a gene encoding a novel *Escherichia coli* UDP-2,3-diacetylglucosamine hydrolase. *FASEB J.* 12:A1288.
- Barquero-Calvo, E., Conde-Alvarez, R., Chacón-Díaz, C., Quesada-Lobo, L., Martirosyan, A., Guzmán-Verri, C., Iriarte, M., Mancek-Keber, M., Jerala, R., Gorvel, J.P., Moriyón, I., Moreno, E., Chaves-Olarte, E.** (2009). The Differential Interaction of *Brucella* and *Ochrobactrum* with Innate Immunity Reveals Traits Related to the Evolution of Stealthy Pathogens. *PLoS ONE.* 4(6).
- Basu, S.S., Karbarzm M.J., Raetz, C.** (2002). Expression cloning and characterization of the C28 acyltransferase of lipid A biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Biol. Chem.* 277:28959-28971.
- Basu, S. S., White, N. L., Raetz, C. R.** (1999). A deacylase in *Rhizobium leguminosarum* membranes that cleaves the 3-O-linked beta-hydroxymyristoyl moiety of lipid A precursors. *J. Biol. Chem.* 274:11150-11158.
- Becker, A., Schmith, M., Jager, W., Pühler, A.** (1995). New gentamicin-resistance and *lacZ* promoterprobe cassette suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* 162: 37-39.
- Beringer, J.** (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84: 188-98.
- Brown, D., Forsberg, L., Kannenberg, E., Carlson, R.** (2012). Characterization of galacturonosyl transferase genes *rgtA*, *rgtB*, *rgtC*, *rgtD*, and *rgtE* responsible for lipopolysaccharide synthesis in nitrogen-fixing endosymbiont *Rhizobium*

leguminosarum: lipopolysaccharide core and lipid galacturonosyl residues confer membrane stability. *J Biol Chem.* Jan 6, 287(2):935-49.

Bulawa, C.E., Raetz, C.R. (1984). The biosynthesis of gram-negative endotoxin. Identification and function of UDP-2,3-diacetylglucosamine in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 259(8):4846-51.

Campbell, G., Sharypova, L., Scheidle, H., Jones, K., Niehaus, K., Becker, A., Walker, G. (2003). Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. *J. Bacteriol.* 185: 3853-62.

Carlson, R., Forsberg, L. S., Kannenberg, E. L. (2010). Lipopolysaccharides in Rhizobium-Legume Symbioses. En Wang, X., Quinn, P. (Eds). *Endotoxins: Structure, Function and Recognition.* (pp. 3-25). Springer Dordrecht Heidelberg London New York

Carlson, R., Krishnaiah, B. (1992). Structures of the oligosaccharides obtained from the core regions of the lipopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* 61A101c and its symbiotically defective lipopolysaccharide mutant, JS314. *Carbohydr Res.* 2, 231:205-19.

Casse, F., Boucher, C., Julliot, J. S., Michell, M., Dénarié, J. (1979). Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 113: 229-242.

Chng, S.S., Ruiz, N., Chimalakonda, G., Silhavy, T.J., Kahne, D. (2010). Characterization of the two-protein complex in *Escherichia coli* responsible for lipopolysaccharide assembly at the outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:5363-68

Clementz, T., Zhou, Z., Raetz, C.R. (1997). Function of the *Escherichia coli* *msbB* gene, a multicopy suppressor of *htrB* knockouts, in the acylation of lipid A. Acylation by MsbB follows laurate incorporation by HtrB. *J Biol Chem.* 272(16):10353-60.

Clover, R., Kieber, J., Signer, E. (1989). Lipopolysaccharide mutants of *Rhizobium meliloti* are not defective in symbiosis. *J. Bacteriol.* 171: 3961-3967.

Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D., Lappin-Scott, H. (1995) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49, 711-745.

Danese, P., Pratt, L., Kolter, R. (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriology* 182, 3593-3596.

De Angelis, P.L. (2002). Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases. *Glycobiology* 12: 9-16.

De Castro, C., Carannante, A., Rosa, R., Liparoti, V., Molinaro, A., Parrilli, M. (2006). Core oligosaccharide structure from the highly phytopathogenic *Agrobacterium tumefaciens* TT111 and conformational analysis of the putative rhamnan epitope. *Glycobiology.* 16(12):1272-1280.

Dombrecht, B., Vanderleyden, J., Michiels, J. (2000). Stable RK2-derived cloning vectors for the analysis of gene expression and gene function in gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* 14(3):426-30.



- Ferguson, G.P., Roop, R.M., Walker, G.C.** (2002). Deficiency of a *Sinorhizobium meliloti* BacA mutant in alfalfa symbiosis correlates with alteration of the cell envelope. *J Bacteriol.* 184(20):5625-32
- Forsberg, L., Carlson, R.** (1998). The structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium etli* strains CE358 and CE359. The complete structure of the core region of *R. etli* lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 273:2747-57.
- Foster, J., Beckstrom-Sternberg, S., Pearson, T., Beckstrom-Sternberg, J., Chain, P., Roberto, F., Hnath, J., Brettin, T., Keim, P.** (2009) Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. *J Bacteriol.* 191(8):2864-70.
- Freinkman, E., Okuda, S., Ruiz, N., Kahne, D.** (2012). Regulated assembly of the transenvelope protein complex required for lipopolysaccharide export. *Biochemistry* 51:4800–6
- Fujishige, N., Lum, M., De Hoff, P., Whitelegge, J., Faull, K. Hirsch, A.** (2008) Rhizobium common nod genes are required for biofilm formation. *Mol Microbiol.* 67, 504- 515.
- Fujishige, N., Kapadia, N., De Hoff, P., Hirsch, A.** (2006) Investigations of *Rhizobium biofilm* formation. *FEMS Microbiol Ecol* 56: 195–206.
- Garcês, H., Sinha, N.** (2009). Transformation of the Plant *Kalanchoë daigremontiana* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Cold Spring Harb Protoc.* 10:1-4.
- Garrett, T.A., Kadrmaz, J.L., Raetz, C.R.** (1997). Identification of the gene encoding the *Escherichia coli* lipid A 4'-kinase. Facile phosphorylation of endotoxin analogs with recombinant LpxK. *J Biol Chem.* 272(35):21855-21864.
- Genevaux, P., Bauda, P., DuBow, M. S., Oudega, B.** (1999). Identification of Tn10 insertions in the *rfaG*, *rfaP*, and *galU* genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion. *Arch Microbiol.*172(1):1-8.
- Gronow, S., Brabetz, W., Brade, H.** (2000). Comparative functional characterization in vitro of heptosyltransferase I (WaaC) and II (WaaF) from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 267(22):6602-6611.
- Heindl, J. E., Wang, Y., Heckel, B. C., Mohari, B., Feirer, N., Fuqua, C.** (2014). Mechanisms and regulation of surface interactions and biofilm formation in *Agrobacterium*. *Front Plant Sci.* 6, 5:176.
- Heinrichs, D.E., Yethon, J.A., Whitfield, C.** (1998). Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 30(2):221-232.
- Hug, I., Couturier, M.R., Rooker, M.M., Taylor, D.E., Stein, M., Feldman, M.F.** (2010) *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide is synthesized via a novel pathway with an evolutionary connection to protein N-glycosylation. *PLoS Pathog* 6:e1000819
- Jackman, J.E., Fierke, C.A., Tumey, L.N., Pirrung, M., Uchiyama, T., Tahir, S.H., Hindsgaul, O., Raetz, C.R.** (2000). Antibacterial agents that target lipid A biosynthesis in gram-negative bacteria. Inhibition of diverse UDP-3-O-(r-3- hydroxymyristoyl)-n-acetylglucosamine deacetylases by substrate analogs containing zinc binding motifs. *J Biol Chem.* 275(15):11002-11009.

- Kadrmaz, J., Raetz, C.** (1998). Enzymatic synthesis of lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. Purification and properties of heptosyltransferase i. *J Biol Chem.* 273(5):2799-807.
- Kadrmaz, J., Brozek, K., Raetz, C.** (1996). Lipopolysaccharide Core Glycosylation in *Rhizobium leguminosarum*. AN UNUSUAL MANNOSYL TRANSFERASE RESEMBLING THE HEPTOSYL TRANSFERASE I OF ESCHERICHIA COLI. *J Biol Chem.* 271, 32119-32125.
- Kannenberg, E., Reuhs, B., Forsberg, L., Carlson, R.** (1998). Lipopolysaccharides and K-antigens: their structures, biosynthesis, and functions. En: Spaink, H. P., Kondorosi, A., Hooykaas, P. J. *The Rhizobiaceae.* (Dordrecht Kluwer Academic Publishers). pp. 150-177.
- Kanipes, M., Ribeiro, A., Lin, S., Cotter, R., Raetz, C.** (2003a). A mannosyl transferase required for lipopolysaccharide inner core assembly in *Rhizobium leguminosarum*. Purification, substrate specificity, and expression in *Salmonella waaC* mutants. *J. Biol. Chem.* 278:16356-64.
- Kanipes, M., Kalb, S., Cotter, R., Hozbor, D., Lagares, A., Raetz, C.** (2003b). Relaxed sugar donor selectivity of a *Sinorhizobium meliloti* ortholog of the *Rhizobium leguminosarum* mannosyl transferase LpcC. *J. Biol. Chem.* 278:16365-16371.
- Karbarz, M. J., Kalb, S.R., Cotter, R. J., Raetz, C.R.** (2003). Expression cloning and biochemical characterization of a *Rhizobium leguminosarum* lipid A 1-phosphatase. *J. Biol. Chem.* 278:39269-39279.
- Karow, M., Georgopoulos, C.** (1993). The essential *Escherichia coli msbA* gene, a multicopy suppressor of null mutations in the *htrB* gene, is related to the universally conserved family of ATP-dependent translocators. *Mol Microbiol.* 7(1):69-79.
- Keenleyside, W.J., Clarke, A.J., Whitfield, C.** (2001). Identification of residues involved in catalytic activity of the inverting glycosyl transferase WbbE from *Salmonella enterica* serovar borreze. *J Bacteriol* 183:77-85.
- Keenleyside, W.J., Whitfield, C.** (1996). A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J Biol Chem.* 271(45):28581-92.
- Kelly, T.M., Stachula, S.A., Raetz, C.R., Anderson, M.S.** (1993). The *firA* gene of *Escherichia coli* encodes UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-glucosamine Nacyltransferase. The third step of endotoxin biosynthesis *J Biol Chem.* 268(26):19866-19874.
- Korber, D., Lawrence, J., Lappin-Scott, H., Costerton, J.** (1995). Growth of microorganisms on surfaces, p 15-45. In Lappin-Scott HM, Costerton JW (ed), *Microbial biofilms.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Krauss, J. H., Weckesser, J., Mayer, H.** (1988). Electrophoretic analysis of lipopolysaccharides of purple nonsulfur bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 157-163.
- Lagares, A., Hozbor, D., Niehaus, K., Otero, A., Lorenzen, J., Arnold, W., Puhler, A.** (2001). Genetic characterization of a *Sinorhizobium meliloti* chromosomal region in lipopolysaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* 183: 1248-58.

- Lagares, A., Caetano-Anolle's, G., Niehaus, K., Lorenzen, J., Ljunggren, H., Puhler, A., Favelukes, G.** (1992). A *Rhizobium meliloti* Lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa. *J. Bacteriol.* 174: 5941–5952.
- Lee, H., In, Y.H., Jeong, S.Y., Jeon, J.M., Noh, J.G., So, J.S., Chang, W.S.** (2014). Inactivation of the *lpcC* gene alters surface-related properties and symbiotic capability of *Bradyrhizobium japonicum*. *Lett Appl Microbiol.* 59(1):9-16.
- Lee, Y., Jeong, S., In, Y., Kim, K., So, J., Chang, W.** (2010). Lack of O-polysaccharide enhances biofilm formation by *Bradyrhizobium japonicum*. *Lett Appl Microbiol.* 50(5):452-456.
- Le Gouill, C., Parent, J. L., Rola-Pleszczynski, M., Stankova J.** (1994). Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal Biochem.* 219(1):164.
- McCullen, C.A., Binns, A.N.** (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22:101-27.
- Mamat, U., Skurnik, M., Bengoechea, J.A.** (2011). Lipopolysaccharide Core Oligosaccharide Biosynthesis and Assembly. En: Knirel, Y., Valvano, M. *Bacterial Lipopolysaccharides Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells.* Springer Wien New York.
- Marolda, C., Tatar, L.D., Alaimo, C., Aebi, M., Valvano, MA.** (2006). Interplay of the *wzx* translocase and the corresponding polymerase and chain length regulator proteins in the translocation and periplasmic assembly of lipopolysaccharide O-antigen. *J Bacteriol.* 188: 5124–5135.
- McGrath, B., Osborn, M.** (1991). Localization of the terminal steps of O-antigen synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* Jan, 173(2):649-54.
- Monroe, D.** (2007). Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.* 5(11):e307.
- Nakao, R., Ramstedt, M., Wai, S., Uhlin, B.** (2012). Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. *PLoSOne.* 7(12).
- Nakao, R., Senpuku, H., Watanabe, H.** (2006). *Porphyromonas gingivalis galE* is involved in lipopolysaccharide O-antigen synthesis and biofilm formation. *Infect Immun.* 74(11):6145-53.
- Niehaus, K., Lagares, A., Püller, A.** (1998). A *Sinorhizobium meliloti* Lipopolysaccharide Mutant Induces Effective Nodules on the Host Plant *Medicago sativa* (Alfalfa) but Fails to Establish a Symbiosis with *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interac.* 11:906-904.
- Ojeda, K.J., Simonds, L., Noel, K.D.** (2013). Roles of predicted glycosyltransferases in the biosynthesis of the *Rhizobium etli* CE3 O antigen. *J Bacteriol.* 195(9):1949-58.
- Okuda, S., Freinkman, E., Kahne, D.** (2012). Cytoplasmic ATP hydrolysis powers transport of lipopolysaccharide across the periplasm in *E. coli*. *Science* 338:1214–17.

- O'Toole, G., Kolter, R.** (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28:449–461.
- Park, K., So, J.** (2000). Altered cell surface hydrophobicity of lipopolysaccharide deficient mutant of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Microbiol Methods.* 41(3):219-226
- Polissi, A., Sperandio, P.** (2014). The lipopolysaccharide export pathway in *Escherichia coli*: structure, organization and regulated assembly of the Lpt machinery. *Mar Drugs.* 17, 12 (2):1023-42.
- Price N. P., Jeyaretnam, B., Carlson, R.W., Kadrmas, J.L., Raetz, C.R., Brozek, K.A.** (1995). Lipid A biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*: role of a 2-keto-3-deoxyoctulosonate-activated 4' phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:7352-7356.
- Putnoky, P., Petrovics, G., Kereszt, A., Grosskopf, E., Ha, D.T.C., Banfalvi, Z., Kondorosi, A.,** (1990). *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant–bacterium interaction. *J. Bacteriol.* 172, 5450–5458.
- Quandt, J., Hynes, MF.** (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene.* 127(1):15-21.
- Que-Gewirth, N. L., Karbarz, M. J., Kalb, S. R., Cotter, R. J., Raetz, C. R.** (2003). Origin of the 2-amino-2-deoxy-gluconate unit in *Rhizobium leguminosarum* lipid A. Expression cloning of the outer membrane oxidase LpxQ. *J. Biol. Chem.* 278: 12120-12129.
- Raetz, C., Whitfield, C.** (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *An. Rev. Biochem.* 71: 635-700.
- Regensburger, B., Hennecke, H.** (1983). RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Arch Microbiol.* 135: 103-109.
- Rinaudi, L., Gonzalez, J.** (2009). The low-molecularweight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation. *J Bacteriol* 191, 7216–7224.
- Rosenberg, M., GUTNICK, D., ROSENBERG, E.** (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9: (19), 29–33.
- Russa, R., Bruneteau, M., Shashkov, A., Urbanik-Sypniewska, T., Mayer, H.** (1996). Characterization of the lipopolysaccharides from *Rhizobium meliloti* strain 102F51 and its nonnodulating mutant WL113. *Arch Microbiol.*,165(1):26-33.
- Russo D.M., Abdian, P.L., Posadas, D.M., Williams, A., Vozza, N., Giordano, W., Kannenberg, E., Downie, J.A., Zorreguieta, A.** (2015). Lipopolysaccharide O-Chain Core Region Required for Cellular Cohesion and Compaction of *In Vitro* and Root Biofilms Developed by *Rhizobium leguminosarum*. *Appl Environ Microbiol.* 81(3):1013-23.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Second Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.



- Samuel, G., Reeves, P.** (2003). Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydr Res* 338: 2503–2519.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Pühler A.** (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. 145(1):69–73.
- Simon, R., Quandt, J., Klipp, W.** (1989). New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in gram-negative bacteria. *Gene*. 80: 161-169.
- Stanley, N., Lazazzera, B.** (2004) Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology* 52, 917-924.
- Tran, A.X., Dong, C., Whitfield, C.** (2010). Structure and functional analysis of LptC, a conserved membrane protein involved in the lipopolysaccharide export pathway in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 285:33529–39.
- Tsai, Ch., Frasch, C.** (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 119: 115-119.
- Turska-Szewczuk, A., Lotocka, B., Kutkowska, J., Król, J., Urbanik-Sypniewska, T., Russa, R.** (2009). The incomplete substitution of lipopolysaccharide with O-chain prevents the establishment of effective symbiosis between *Mesorhizobium loti* NZP2213.1 and *Lotus corniculatus*. *Microbiol Res*,164(2):163-73.
- Valvano, M., Furlong, S., Patel, K.** (2011). Genetics, Biosynthesis and Assembly of O-Antigen. Knirel, Y., Valvano, M. (Eds). *Bacterial Lipopolysaccharides*. (pp. 275-310). Springer Wien New York.
- Valverde, C., Hozbor, D. F., Lagares, A.** (1997). Rapid preparation of affinity-purified lipopolysaccharide samples for electrophoretic analysis. *Biotechniques*. 22: 230-232, 234, 236.
- Vincent, J. M.** (1970). A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP handbook No. 15. Oxford: Blackwell.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., Higuchi. R.** (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 10(4):506-13.
- Wang, L., Liu, D., Reeves, P.** (1996). C-terminal half of *Salmonella enterica* WbaP (RfbP) is the galactosyl-1-phosphate transferase domain catalyzing the first step of O-antigen synthesis. *J Bacteriol.* 1996 May, 178(9): 2598-604.
- Wesphal, O., Jann, K.** (1965). Bacterial lipopolysaccharide. *Methods Carbohydr. Chem.* 5: 83-91.
- Whately, M. H., Bodwin, J. S., Lippincott, B. B., Lippincott, J. A.** (1976). Role of *Agrobacterium* cell envelope lipopolysaccharide in infection site attachment. *Infect Immun.* 13(4):1080-3.

- Whitfield, C., Trent, M.S.** (2014). Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem.* 83:99-128.
- Whitfield, C., Amor, P.A., Köplin, R.** (1997). Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol Microbiol.* 23(4):629-38.
- Whitfield, C., Roberts, I.S.** (1999). Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 31(5):1307-19.
- Whitfield, C., Valvano, M. A.** (1993). Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Adv Microb Physiol.* 35:135-246.
- Williams, A., Wilkinson, A., Krehenbrink, M., Russo, D., Zorreguieta, A., Downie, J.** (2008). Glucomanan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. *J Bacteriol.* 190(13):4706-15.
- Wu, T., McCandlish, A.C., Gronenberg, L. S., Chng, S.S., Silhavy, T.J., Kahne, D.** (2006). Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:11754–59.
- Yamaguchi, A., Udagawa, T., Sawai, T.** (1990). Transport of Divalent Cations with Tetracycline as Mediated by the Transposon Tn10-encoded Tetracycline Resistance Protein. *J Biol Chem,* 265(9):4809-13.
- Yethon, J.A., Heinrichs, D.E., Monteiro, M.A., Perry, M.B., Whitfield, C.** (1998). Involvement of waaY, waaQ, and waaP in the modification of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and their role in the formation of a stable outer membrane. *J Biol Chem.* 273(41):26310-26316.
- Zambryski, P.** (1997). Genetic manipulation of plants. En Singer, M., Berg, P. Exploring genetic mechanism. Sausalito, CA: University of Science Books, (pp. 597-655).
- Zamyatina, A., Gronow, S., Oertelt, C., Puchberger, M., Brade, H., Kosma, P.** (2000). Efficient Chemical Synthesis of the Two Anomers of ADP-L-glycero- and D-glycero-D-manno-Heptopyranose Allows the Determination of the Substrate Specificities of Bacterial Heptosyltransferases This work was supported by grants from FWF (grant nos. P11449-MOB and P13843-CHE). *Angew Chem Int Ed Engl.* 39(22):4150-4153.
- Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O., Zambryski, P.** (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* 23(1):11-28.

La simbiosis *Bradyrhizobium*
japonicum y *Glycine max*:
Análisis del rol del LPS

Capítulo II

INTRODUCCIÓN

El cultivo de soja es de gran importancia en nuestro país, ya que en los últimos años se ha convertido en un protagonista importante de la economía argentina (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca <http://www.minagri.gob.ar/site/>). Argentina se encuentra, junto a Brasil y Estados Unidos, como una de las tres potencias exportadoras de este cultivo, que en conjunto aportan más del 80% de la producción mundial (Schvarzer & Tavosnanska 2007).

La soja, un cultivo proteico por excelencia, necesita acumular grandes cantidades de N para su normal crecimiento, para ello requiere de un aporte importante de N para obtener buenos rendimientos. Se estima que los requerimientos de nitrógeno oscilan entre 60 y 80 kg N por tonelada de grano (González, 2000; Scheiner *et al.*, 1999). Para cubrir tal demanda, además de la absorción del nutriente desde el suelo, esta y otras especies de la familia de las Leguminosas han desarrollado el mecanismo de la fijación biológica de N (véase apartado I-1.1).

Como se describió en el capítulo anterior, *Bradyrhizobium japonicum* establece una relación simbiótica con plantas de soja (*Glycine max*), induciendo la formación en sus raíces de nódulos determinados donde se lleva a cabo la reducción de nitrógeno ambiental a nitrógeno combinado asimilable para la leguminosa (Brenchenmacher *et al.*, 2010).

Estos nódulos determinados presentan una morfología esférica (en comparación con los nódulos indeterminados que son más alargados) y no poseen un meristema definido (Patriarca *et al.*, 2004).

Numerosos estudios sobre el rol de los polisacáridos de superficie en los rizobios durante el proceso de nodulación en diversas especies bacterianas, llevaron a la conclusión que durante la infección de raíces que conducen a la formación de nódulos determinados, son requeridos los LPS, en cambio para la formación de nódulos indeterminados presentan mayor importancia los EPS (Kannenberg & Brewin 1994; Frayse *et al.*, 2003, Parada *et al.*, 2006).

Stacey *et al.* (1991) demostraron que un mutante Tn5 de *B. japonicum*, carente del antígeno O del LPS fue incapaz de formar nódulos en raíces de plantas de soja. Posteriormente se encontró que este transposón se localizaba en un grupo de genes involucrados en la síntesis de LPS, que comprende a *rfaF* (So *et al.* 2000), *rfaD* (Noh *et*

al. 2002) y *galE* (Chang *et al.* 2008) los cuales codifican para una heptosiltransferasa, heptosa-6-epimerasa y UDP-galactosa-4-epimerasa, respectivamente.

En el apartado I-14. del capítulo 1 se describió que una mutación en el gen que codifica para la manosiltransferasa *LpcC* de *B. japonicum* produce un LPS de mayor movilidad electroforética como consecuencia de la ausencia del core externo y antígeno O. Además, esta cepa mutante puede ser complementada por *LpcC* de *R. leguminosarum*, *A. tumefaciens* y *B. melitensis*; y *RfaC* de *M. loti* (Figura 23). Asimismo, este mutante mostró una sensibilidad incrementada, en comparación a la cepa salvaje, al detergente SDS. Además en los apartados I-19.1 y I-19.2 se describió que el mutante *lpcC* presenta un aumento relativo en la hidrofobicidad superficial y una mayor capacidad para formar biofilm en placas de poliestireno que la cepa salvaje.

MATERIALES Y MÉTODOS

II-1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Tabla 4. Cepas de *B. japonicum* empleadas en este capítulo.

Bradyrhizobium japonicum

Cepa	Características	Referencia
USDA110	Cepa silvestre, simbiote de <i>Glycine max.</i> Sm ^r	Colección Lab.
Sm70	USDA110, <i>lpcC::lacZ-Gm</i> (fusión transcripcional <i>lacZ-Gm</i> en el sitio <i>SaII</i> del gen <i>lpcC</i>), Sm ^r , Gm ^r .	Este trabajo
Sm70-110	Sm 70 portadora del plásmido pJF110 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>B. japonicum</i>). Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm70-120	Sm 70 portadora del plásmido pJF120 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>A. tumefaciens</i>). Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm70-130	Sm 70 portadora del plásmido pJF130 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>B. henselae</i>). Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm70-150	Sm 70 portadora del plásmido pJF150 (pFAJ1708- <i>rfaC</i> de <i>M. loti</i> MAFF 303099). Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm70-160	Sm 70 portadora del plásmido pJF160 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>R. leguminosarum</i>). Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm70-170	Sm 70 portadora del plásmido pJF170 (pFAJ1708- <i>lpsB</i> de <i>S. meliloti</i>). Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm70-180	Sm 70 portadora del plásmido pJF180 (pFAJ1708- <i>lpcC</i> de <i>B. melitensis</i>). Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo
Sm70-190	Sm 70 portadora del plásmido pJF150 (pFAJ1708- <i>rfaC</i> de <i>B. bronchiseptica</i>). Sm ^r , Gm ^r , Tc ^r	Este trabajo

Tabla 5. Plásmidos empleados en el presente trabajo

Plásmido	Características	Referencia
pK18mob2	Derivado del plásmido pK18, mob, Km ^r	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pJF110	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>lpcC</i> de <i>B. japonicum</i> en los sitios <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I. Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pJF120	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>lpcC</i> de <i>A. tumefaciens</i> en los sitios <i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI. Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pJF130	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>lpcC</i> de <i>B. henselae</i> en los sitios <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI. Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pJF150	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>rfaC</i> de <i>M. loti</i> MAFF303099 en los sitios <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I. Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pJF160	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>lpcC</i> de <i>R. leguminosarum</i> en los sitios <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI. Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pJF170	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>lpsB</i> de <i>S. meliloti</i> 2011 en los sitios <i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI. Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pJF180	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>lpcC</i> de <i>B. melitensis</i> M16 en los sitios <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I. Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pJF190	Derivado de pFAJ1708, conteniendo <i>rfaC</i> de <i>B. bronchiseptica</i> en los sitios <i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI. Ap ^r Tc ^r	Este trabajo
pFJ210	Derivado de pK18mob2, conteniendo <i>lpcC::lacZ-Gm</i> de <i>B. japonicum</i> en los sitios <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I,	Este trabajo
pFJ240	Derivado de pK18mob2, conteniendo fragmento interno de 376 pb de <i>rfaF</i> de <i>M. loti</i> en los sitios <i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III, Km ^r	Este trabajo

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Gen	Secuencia
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (Para el clonado en pFAJ1708 y pK18mob2)	
<i>lpcC</i>	Forw. 5'-AAAAAAGCTTTAAACGGAGCGTGACGTGG-3' <i>Hind</i> III
<i>lpcC</i>	Rev. 5'-AAAAGGTACCATTCTGCTGGCACCGACTACT-3' <i>Kpn</i> I

II-2. Medios y condiciones para el cultivo de *B. japonicum*

Medio PSY: (Regensburger & Hennecke 1983)

Peptona	1,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
Na ₂ HPO ₄	0,3 g
H ₂ O desionizada hasta completar	988 ml

*Una vez Autoclavado agregar:

MgSO ₄ 7H ₂ O	[10 %]	1,0 ml
CaCl ₂	[5 %]	1,0 ml
Biotina		0,2 mg
Micronutrientes**	[100X]	10 ml

**Micronutrientes [100X]:

H ₃ BO ₃	100 mg/l
ZnSO ₄ 2H ₂ O	1,0 mg/l
FeCl ₃	1,0 mg/l
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,5 mg/l
MnCl ₂	0,15 mg/l
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,1 mg/l

La temperatura de incubación para los cultivos de las distintas cepas de *B. japonicum* fue 30 °C. Los cultivos en medios líquidos fueron agitados a 150 rpm en un agitador rotatorio.

*Las condiciones de obtención del mutante *lpcC* y de las complementaciones heterólogas; evaluación de la capacidad de las distintas cepas para crecer en medios suplementados con SDS, aislamiento y análisis de LPS, determinación de la hidrofobicidad superficial y formación de biofilm; fueron descriptos en el capítulo anterior.

II-3. Curvas de crecimiento y viabilidad

Para cada cepa se hicieron crecer pre-inóculos en medio PSY hasta la $DO_{600nm}=0,3$; luego se utilizó 1 ml de estos pre-cultivos para inocular los cultivos definitivos. Las cepas de *B. japonicum* fueron crecidas (por triplicado) en medio PSY, suplementado con los antibióticos correspondientes. Los cultivos fueron crecidos a 30 °C con agitación de 150 rpm durante 8 días. La absorbancia (DO_{600nm}) de los cultivos fue determinada cada 12 horas.

Para determinar la viabilidad de los cultivos se utilizó el método de diluciones seriadas en base 10 y recuento en placa por la técnica de microgota (Doyle *et al.*, 2001). Los resultados se expresan como el logaritmo de las UFC ml^{-1} .

II-4. Cálculo del tiempo de generación

El tiempo de generación fue calculado utilizando los valores obtenidos en la curva de crecimiento (CFU vs tiempo) y empleando la siguiente ecuación (Peral, 1993):

$$G = \frac{t}{n} = \frac{t}{3.3 \cdot \log\left(\frac{b}{B}\right)}$$

Dónde:
 B=Número de UFC al tiempo cero.
 b=Número de UFC al tiempo t1.
 t=Periodo o tiempo.
 T=Tiempo de generación.
 n=Número de generaciones.
 Log=logaritmo en base 10

II-5. Extracción y cuantificación de exopolisacáridos (EPS) (Skorupska *et al.*, 1985)

Células de *B. japonicum* y mutantes fueron crecidas en medio PSY a 30°C durante 7 días en agitación continua a 150 rpm. Los EPS fueron extraídos a partir del sobrenadante de los cultivos, previa centrifugación a 10000 rpm durante 20 min, por precipitación con 3 volúmenes de etanol frío durante 24 h. Luego de centrifugar nuevamente a 10000 rpm 20 min el precipitado fue secado y resuspendido en agua destilada. La determinación cuantitativa de polisacáridos fue realizada por el método de antrona (Dische, 1962).

II-6. Ensayos de motilidad

La motilidad fue determinada sembrando 5 μ l de un cultivo de *B. japonicum* crecido en medio PSY, $DO_{600nm}=0,5$ en el centro de una placa de Petri conteniendo medio PSY semisólido (agar 0,3%) e incubada a 30 °C durante siete días (Lee *et al.*, 2010).

II-7. Ensayos de autoagregación

Las cepas de *B. japonicum* fueron crecidas en medio PSY con agitación de 150 rpm, a 30 °C durante 7 días. Posteriormente, los tubos fueron mantenidos verticalmente sin agitación a temperatura ambiente durante 24 h y observados para determinar la presencia o no de agregación.

II-8. Microscopía electrónica de transmisión de células de *B. japonicum*

Los análisis de microscopía electrónica de transmisión fueron llevados a cabo por el Servicio de Microscopía Central de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina.

Las muestras fueron teñidas negativamente con 2% de ácido fosfotúngstico pH 7,0 y observadas en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL, Tokyo, Japan) a 80 kV.

II-9. Ensayos de nodulación en plantas de soja

Las semillas de soja fueron desinfectadas superficialmente mediante inmersión en una solución de etanol 95% (v/v) durante 5 min, se enjuagaron con agua destilada estéril 3 veces, luego se sumergieron en una solución de NaClO 25% (v/v) durante 15 min. Posteriormente fueron lavadas con agua destilada estéril ocho veces y pre-germinadas en placas de Petri (14 cm de diámetro), sobre papel de filtro embebido en agua destilada estéril y algodón durante 3 días a temperatura ambiente y en oscuridad.

Una vez germinadas las plántulas fueron trasplantadas en vasos plásticos conteniendo vermiculita estéril e inoculadas con 1ml de cultivo de *B. japonicum* (1×10^8 UFC/ml) Las plantas fueron cultivadas en invernadero acondicionado a 24 °C con

fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Las plantas fueron regadas alternando agua estéril y medio Hoagland libre de nitrógeno.

Por cada cepa se inocularon 50 plantas. Para estudiar la cinética de nodulación, las plantas fueron cosechadas (de a 10 por vez) a los 7, 14, 21, 28 y 35 días.

Medio Hoagland (por litro) (Hoagland & Arnon 1938)

CaCl ₂	[1M]	1,0 ml
KCl	[1M]	1,0 ml
MgSO ₄	[1M]	0,4 ml
KH ₂ PO ₄	[1M]	0,2 ml
FeCl ₃	[5 mg/ml]	0,2 ml
Micronutrientes*		0,2 ml

***Micronutrientes** (por litro)

H ₃ BO ₃	2,83g
MnCl ₂ 4H ₂ O	1,81g
ZnCl ₂	0,11g
CuSO ₄	0,05g
NaMoO ₄	0,025g

II-10. Preparación de nódulos para microscopia electrónica

Los análisis de microscopía electrónica de transmisión fueron llevados a cabo por el Servicio de Microscopía Central de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina.

Los nódulos fueron extirpados de las raíces, cortados transversalmente y fijados al vacío en glutaraldehído 2% (v/v). Posteriormente fueron sumergidos en una solución de *buffer* fosfato-OsO₄ al 1% (p/v) durante una hora a temperatura ambiente. La fijación en osmio fue seguida por tres lavados con agua destilada de 10 min cada uno. Posteriormente la muestra fue sometida a deshidratación en concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 80, 90, 96 y 100%) durante 15 min. cada uno, a excepción de la última que fue durante una hora. Una vez deshidratadas, las muestras se infiltraron gradualmente con resina epoxy. El material se seccionó con una hoja de vidrio utilizando un

ultramicrotomo SuperNova Reichert-J. Para microscopía óptica, cortes de 2 μm de grosor, se tiñeron con azul de toluidina y las fotografías fueron tomadas con un microscopio óptico Carl Zeiss Jena acoplado a una cámara Kodak. Para microscopía electrónica de transmisión, cortes ultrafinos de 70 nm de espesor fueron colocados en una rejilla de cobre recubierta con colodión. Las secciones fueron teñidas con acetato de uranilo (p/v) durante 10 min y luego con citrato de plomo 1% (p/v) durante 5 min.; posteriormente fueron lavadas con agua y secadas por corriente de aire. Las rejillas fueron visualizadas en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (Jeol) a 80 kV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II-11. Efecto de la mutación *lpcC* de *B. japonicum* sobre los parámetros de crecimiento

Ha sido descrito en *Azospirillum brasilense*, *E. coli* y *Salmonella*, que mutaciones en el core interno del LPS usualmente producen un retraso en la velocidad de crecimiento (Lerner *et al.*, 2009, Kadrmas *et al.*, 1998). Para determinar si la alteración en el LPS, producto de la mutación en el gen *lpcC*, afecta al crecimiento de *B. japonicum*, se evaluó mediante curvas de crecimiento la cinética de crecimiento de la cepa salvaje, de la cepa mutante en *lpcC* y la cepa mutante complementada con el alelo salvaje.

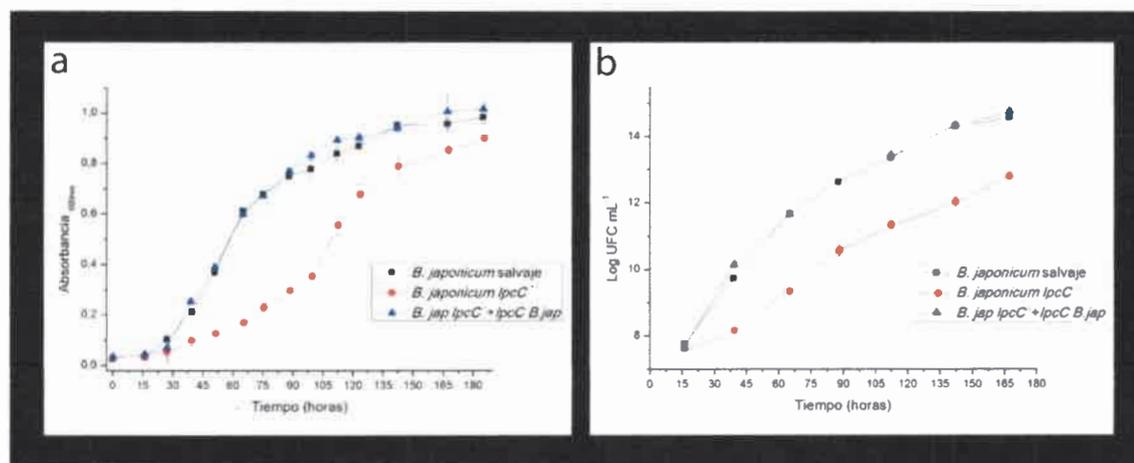


Figura 35. Efecto de la mutación en el gen *lpcC* sobre el crecimiento de *B. japonicum*. **a:** Curva de crecimiento expresada en absorbancia $_{600\text{nm}}$ vs tiempo; **b:** Curva de crecimiento expresada como Log UFC ml^{-1} vs tiempo.

Como se observa en la Figura 35, la cepa mutante *lpcC* de *B. japonicum* presenta un crecimiento demorado (tiempo de generación 8,59 horas) con respecto a la cepa salvaje (tiempo de generación 6,6 horas). Dicho efecto está asociado a la mutación en el LPS ya que el crecimiento demorado es restituido a los valores observados en la cepa salvaje cuando la mutación es complementada con el alelo salvaje. Existen estudios en los que se describe que bacterias con mutaciones en la estructura del LPS, frecuentemente también tienen afectada la integridad de la membrana externa. Estas alteraciones resultan en una mayor sensibilidad celular a detergentes y antibióticos (Jofré *et al.*, 2004).

II-12. Alteraciones en la estructura del LPS de *B. japonicum* resultan en un incremento de la producción de exopolisacáridos

Además de los LPS, también los exopolisacáridos (EPS) han sido descriptos como moléculas requeridas para la infección y nodulación de raíces de soja (*Glycine max*). Quelas *et al.*, (2010) demostraron que una mutación en el gen *exoB* (UDP-glucosa epimerasa) de *B. japonicum* produce EPS carente de galactosa y como consecuencia induce la formación de pseudonódulos vacíos en raíces de plantas de soja. Teniendo en cuenta este antecedente se determinó en el mutante *lpcC* de *B. japonicum* la producción de EPS en comparación a la cepa salvaje y al mutante complementado.

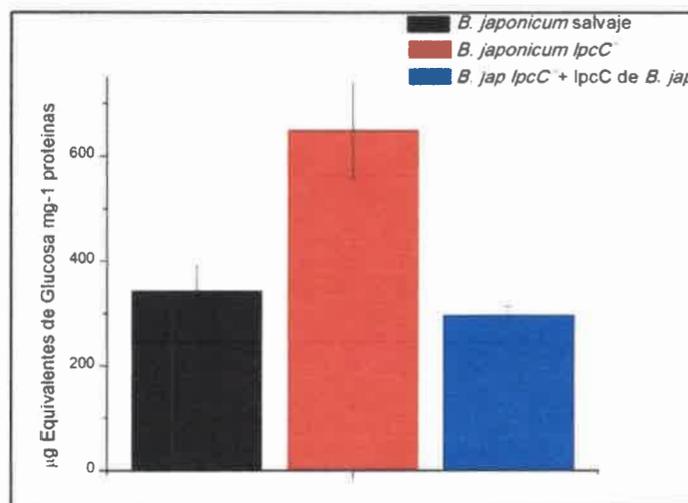


Figura 36. Efecto de la mutación en *lpcC* de *B japonicum* sobre la producción de EPS.

Al cuantificar la producción de EPS en *B. japonicum*, se observó un incremento aproximado del 90% en la producción de dicho polisacárido por parte de la cepa mutante *lpcC* con respecto a la cepa salvaje. Esta producción incrementada de EPS en el mutante *lpcC* fue restituida a los valores observados en la cepa salvaje cuando el mencionado mutante fue complementado con su alelo salvaje. En *R. etli* se describió un mutante carente de antígeno O, donde la producción de EPS se encontraba aumentada con respecto a la cepa salvaje (Araujo *et al.*, 1994). Asimismo en *Azospirillum brasilense* se ha reportado un mutante con alteraciones en el core del LPS cuya producción de EPS resultó aumentada (Jofré *et al.*, 2004).

El mutante *lpcC* de *B. japonicum*, al carecer de una porción significativa del LPS, y por ende al producirse un cambio tan drástico en su superficie, posiblemente aumente la producción de EPS para compensar los posibles cambios en la permeabilidad celular.

Si bien este fenotipo de producción incrementada de EPS en respuesta a una mutación en el LPS podría ayudar a estabilizar la integridad de la pared celular bacteriana; no restituye la capacidad de infectar y nodular raíces de plantas de soja.

II-13. Cambios en la estructura del LPS alteran la motilidad y capacidad de autoagregación

Luego de observar que el mutante *lpcC* de *B. japonicum* presenta disminuida su velocidad de crecimiento, se decidió evaluar si dicha mutación también produce alteraciones en la motilidad de esta cepa. Para ello se sembraron 5 μ l de un cultivo crecido en fase exponencial en el centro de una placa conteniendo medio PSY con agar semisólido y se incubó a 30 °C durante 7 días.

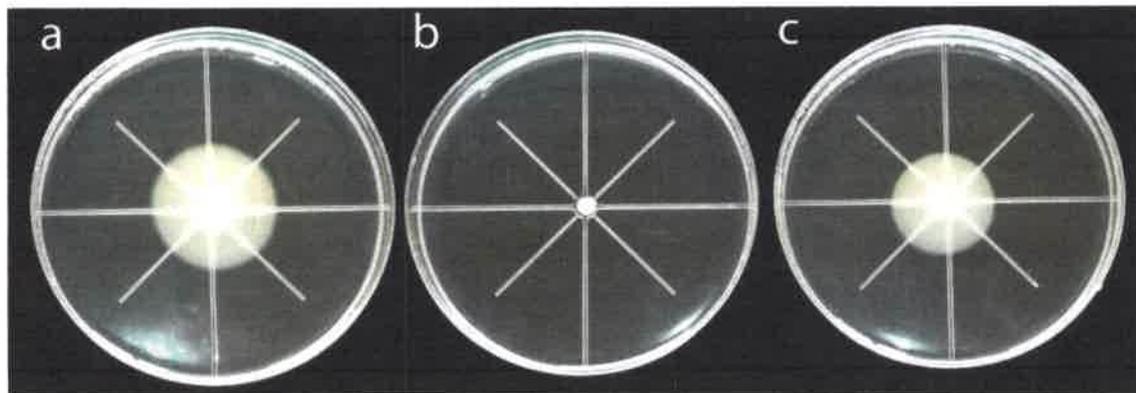


Figura 37. Motilidad de *B. japonicum*. a: *B. japonicum* salvaje; b: *B. japonicum lpcC*⁻; c: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. japonicum*.

Se observó que el mutante presenta significativamente menor motilidad (*t*-test, $P < 0,01$) en comparación con la cepa salvaje. Las medias de los diámetros fueron 32 ± 3 mm para la cepa salvaje, 4 ± 1 mm para el mutante *lpcC*⁻; y 28 ± 4 mm para la cepa mutante complementada con su alelo salvaje (Figura 37).

Estudios llevados a cabo por Lee *et al.*, (2010), demostraron que un mutante *B. japonicum* que carece antígeno O mostró una motilidad disminuida. Asimismo en *Pseudomonas aeruginosa* se ha descrito una cepa cuyo LPS carece de antígeno O y core externo; y también presentó una marcada disminución de motilidad en medios de cultivos semisólidos (Lindhout *et al.*, 2009).

Por otra parte en cultivos líquidos crecidos hasta fase estacionaria y luego mantenidos sin agitación durante 24 horas, se observó una mayor agregación de las células correspondientes a las cepas que poseen el LPS alterado (Figura 38).

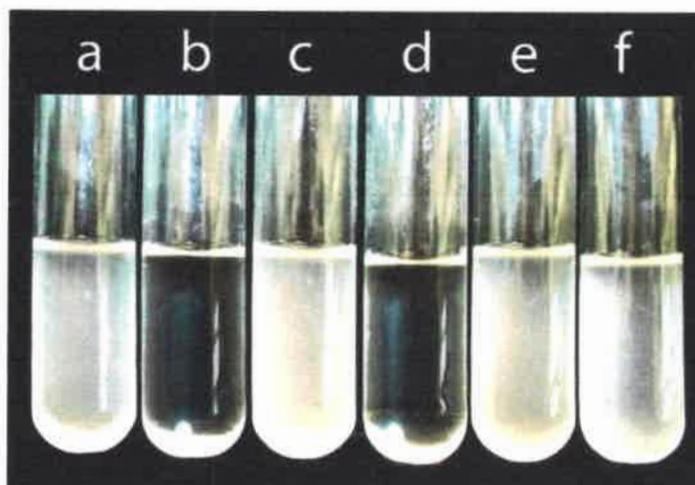


Figura 38. Ensayos de autoagregación. a: *B. japonicum* salvaje. b: *B. japonicum lpcC*⁻; c: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. japonicum*; d: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpsB* de *S. meliloti*; e: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *R. leguminosarum*; f: *B. japonicum lpcC*⁻ + *rfaC* de *M. loti*.

Teniendo en cuenta que el mutante *lpcC* posee un LPS truncado a la altura del core interno, es decir carece de una porción de glicano de tamaño considerable, y que mostró cambios en la hidrofobicidad celular, es probable que el incremento en la autoagregación sea consecuencia del aumento en la hidrofobicidad celular. Además, como consecuencia de la alteración del LPS, quedan más expuestos los residuos de GlcN que componen el lípido A. Se ha reportado que estos residuos de aminoazúcares pueden actuar como adhesinas intercelulares (Jefferson K. 2009). En *S. meliloti*, el mutante *lpsB* mostró un aumento en la autoagregación comparado a la cepa salvaje (Bogino *et al.*, 2013)

Dicha hidrofobicidad y la exposición de los residuos de GlcN podrían ser la causa de la mayor autoagregación y de la disminución en la movilidad observada en cepas carentes de antígeno O y de una porción del core.

II-14. La presencia de flagelos en *B. japonicum* no se encuentra afectada por las alteraciones en el LPS

En el apartado II-13 se describió que el mutante *lpcC* de *B. japonicum* presentaba una motilidad disminuida en medio de cultivo semisólido. Este fenotipo puede deberse al aumento de hidrofobicidad superficial por parte de las células, esto concuerda con lo reportado por Lee *et al.*, (2010).

Por otra parte Nakao *et al.*, (2012) describen un mutante *waaC* en *E. coli*, que produce un LPS truncado similar al mutante *lpcC* de *B. japonicum*. Dicha cepa mutante

además de ser más hidrofóbica superficialmente y presentar una motilidad reducida con respecto a la cepa salvaje, carece de flagelos.

Para determinar si la disminución en la motilidad observada en el mutante *lpcC* de *B. japonicum* está asociada al aumento de la hidrofobicidad superficial o es la consecuencia de la ausencia de flagelos; se determinó la presencia de dichas estructuras mediante microscopía electrónica de transmisión.



Figura 39. Microscopía electrónica de transmisión de *B. japonicum*. a: *B. japonicum* salvaje; b: *B. japonicum lpcC*⁻; c: *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. japonicum*.

Se ha descrito que *B. japonicum* posee dos tipos diferentes de flagelos, un flagelo grueso y unos pocos flagelos delgados; todos de localización subpolar (Kanbe *et al.*, 2007). Ambos tipos de flagelos están impulsados por fuerza protón-motriz (Aizawa, 2014).

En la Figura 39 solo se evidencia uno de los flagelos característicos de *B. japonicum* tanto en la cepa salvaje como en la cepa mutante en *lpcC*. A diferencia de lo reportado para *E. coli* (Nakao *et al.*, 2012), el mutante *lpcC* de *B. japonicum* presenta flagelos (Figura 39b).

Por lo tanto la disminución en la motilidad en la cepa mutante pueda deberse al aumento en la hidrofobicidad superficial, como lo ha descrito Lee *et al.*, (2010); o bien la modificación en la estructura del LPS (y por consiguiente en la membrana externa) de la bacteria produzca una alteración en la rotación normal del flagelo, como se ha observado en *P. aeruginosa* (Lindhout *et al.*, 2009); dando como consecuencia una motilidad reducida.

II-15. Una estructura de LPS intacta es requerida para el establecimiento de una simbiosis funcional entre *B. japonicum* y *Glycine max*

Se ha demostrado que mutantes *galE* (cuyo producto es una epimerasa que cataliza la interconversión de UDP-glucosa a UDP galactosa) de *B. japonicum* resultan en un perfil alterado del LPS y son incapaces de formar nódulos (Chang *et al.*, 2008). Para determinar si la mutación en el gen *lpcC* de *B. japonicum*, (que resulta en un fenotipo con LPS alterado), afecta la interacción simbiótica con su planta hospedadora, se analizó la capacidad de nodulación del mutante *lpcC* en plantas de soja. Para ello, se evaluó la cinética de nodulación en el transcurso de cinco semanas. Las plantas fueron inoculadas según se describe en el apartado II-9, con *B. japonicum* salvaje, *B. japonicum lpcC* mutante; y este mutante complementado en *trans* con *lpsB* de *S. meliloti*, *lpcC* de *R. leguminosarum*, *lpcC* de *B. japonicum* y *rfaC* de *M. loti*.

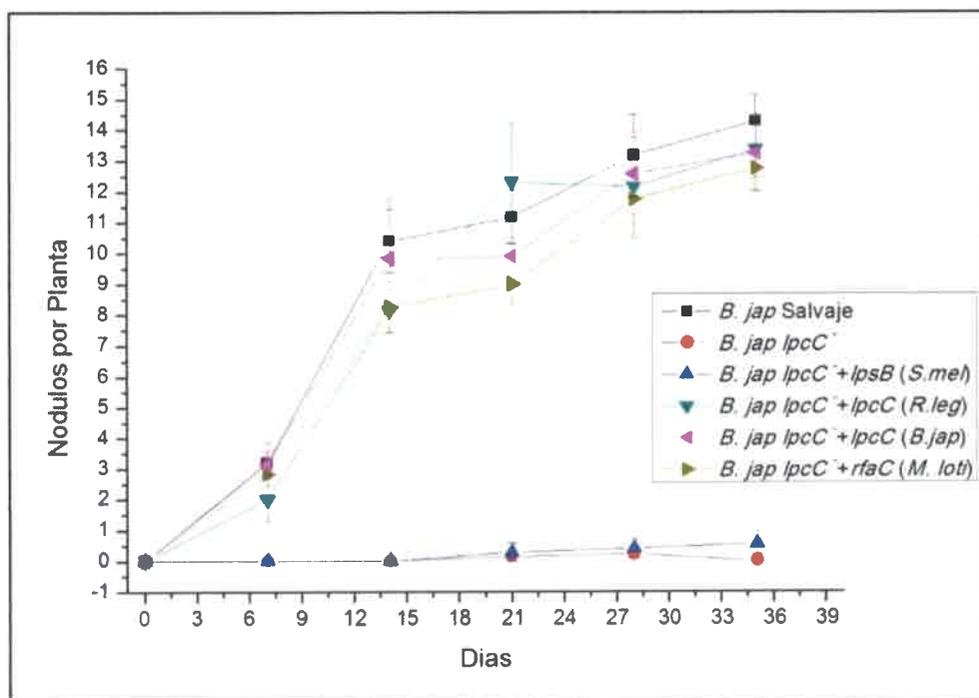


Figura 40. Cinética de nodulación de plantas de soja por *B. japonicum* salvaje y mutante *lpcC*. *B. japonicum* salvaje; *B. japonicum lpcC*⁻; *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpsB* de *S. meliloti*; *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *R. leguminosarum*; *B. japonicum lpcC*⁻ + *lpcC* de *B. japonicum*; *B. japonicum lpcC*⁻ + *rfaC* de *M. loti*.

En la Figura 40 se observa que la cepa de *B. japonicum* salvaje fue capaz de formar nódulos fijadores de nitrógeno en raíces de plantas de soja. En cambio la cepa con la mutación en el gen *lpcC* produjo unos pocos nódulos no fijadores de nitrógeno (pseudonódulos). La capacidad de nodulación de este mutante se restituyó cuando fue complementado en *trans* con su alelo salvaje. También se observó la presencia de nódulos

fijadores de nitrógeno en las raíces de plantas inoculadas con el mutante en *lpcC* de *B. japonicum* complementado con los ortólogos *lpcC* de *R. leguminosarum* y *rfaC* de *M. loti*.

A su vez en el caso del mutante *lpcC* de *B. japonicum* complementado con *lpsB* de *S. meliloti* no se observaron nódulos indicando que el producto del gen *lpsB* de *S. meliloti* no es capaz de restituir el fenotipo de nodulación observado en la cepa salvaje. Los mismos ortólogos que fueron capaces de restituir el fenotipo nodulador del mutante *lpcC* de *B. japonicum*, también fueron capaces de restituir el perfil electroforético del LPS en dicho mutante.

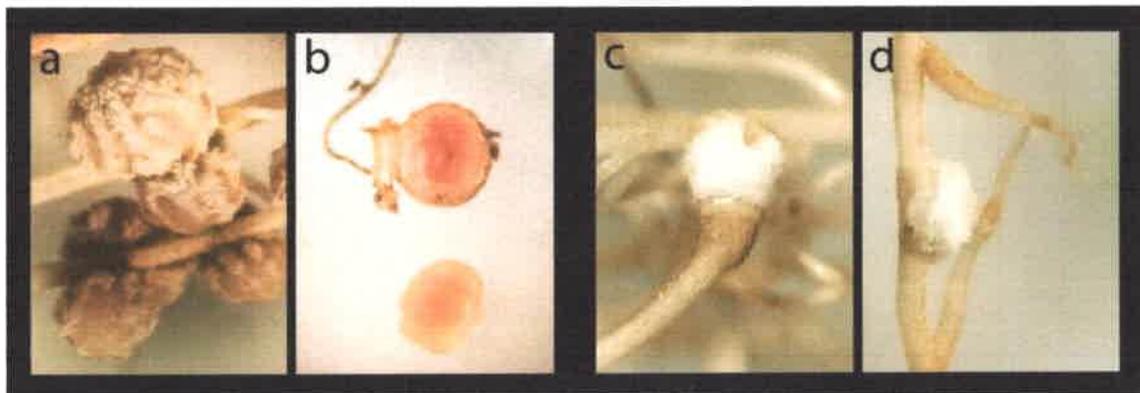


Figura 41. Imágenes de nódulos y pseudonódulos de raíces de plantas de soja inoculadas con *B. japonicum*. **a:** Nódulos de 5 semanas de raíces de soja inoculadas con *B. japonicum* salvaje. **b:** Nódulo de 4 semanas de raíces de soja inoculadas con *B. japonicum lpcC⁻ + lpcC* de *B. japonicum*. **c:** Pseudonódulo de 5 semanas de raíces de soja inoculadas con *B. japonicum lpcC⁻*. **d:** Pseudonódulo de 5 semanas de raíces de soja inoculadas con *B. japonicum lpcC⁻ + lpsB* de *S. meliloti*.

El desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno en plantas que forman nódulos determinados (como en el caso de *Glycine max*) requiere de una estructura completa del LPS en la superficie de los rizobios (Noel *et al.*, 2000; Kannenberg & Brewin 1994). En nuestro caso se observa que alteraciones en la estructura del core del LPS de *B. japonicum* disminuyen drásticamente el número de nódulos, los cuales a su vez son incapaces de fijar nitrógeno.

II-16. Observaciones microscópicas de cortes de nódulos de soja

La cepa mutante en *lpcC* de *B. japonicum*, fue incapaz de formar nódulos maduros y fijadores de nitrógeno; en cambio indujo la formación de estructuras similares a nódulos, pero de menor tamaño y no fijadores de nitrógeno (pseudonódulos). Estos pseudonódulos fueron descritos por Stacey *et al.* (1991) y denominados nódulos *pop*

corn de su traducción del idioma inglés: “pochoclo”. Por otra parte las complementaciones con su alelo salvaje, *lpsB* de *S. meliloti* y *rfaC* de *M. loti* restituyeron los fenotipos salvajes del LPS y de la nodulación.

Al macerar los nódulos y sembrar en placas con medio de cultivo suplementado con los antibióticos correspondientes, fue posible recuperar bacterias de los nódulos fijadores de nitrógeno; en contraste no se recuperaron bacterias a partir de los macerados de pseudonódulos. Este resultado sugiere que las células de estos pseudonódulos no han sido infectadas. Para corroborar este resultado, se llevaron a cabo observaciones por microscopía óptica y electrónica de transmisión de cortes semifinos y ultrafinos de dichos nódulos.

II-16.1. Los pseudonódulos inducidos por *B. japonicum* con LPS alterado presentan signos de defensa por parte de la planta

Al analizar los cortes semifinos de nódulos y pseudonódulos se observa una marcada diferencia entre las células de las raíces inoculadas con cepas que indujeron la formación de nódulos efectivos con respecto a las que indujeron la formación de pseudonódulos. En los cortes visualizados en la Figura 42 (a, c, e y f) se puede observar que la mayoría de células más internas de la raíces se hallan completamente coloreadas, lo cual se correlaciona con la infección por bacteroides. En cambio, en los cortes pertenecientes a los pseudonódulos (Figura 42b y d) no se observan células coloreadas en su interior, sugiriendo que estas células no están infectadas. En estos dos últimos cortes, especialmente el que corresponde a un pseudonódulo inoculado con el mutante *lpcC* de *B. japonicum*; puede observarse un engrosamiento en la pared de las células esclerenquimáticas de la endodermis (Figura 42b). Un engrosamiento similar al observado en estas células fue encontrado en nódulos de plantas de soja inoculadas con mutantes de *B. japonicum* afectados en la producción de EPS. Dicho engrosamiento son síntomas característicos de reacciones de defensa de la planta (Parniske *et al.*, 1994; Quelas *et al.*, 2010). En el corte correspondiente al pseudonódulo inoculado con el mutante *lpcC* de *B. japonicum* complementado con *lpsB* de *S. meliloti*, se observan pocas células con paredes engrosadas, posiblemente debido a la sección del corte donde fue registrada la fotografía (Figura 42d).

II-16.2. Las células vegetales que forman los pseudonódulos no poseen bacteroides en su interior

Las microfotografías de microscopía electrónica de transmisión permiten visualizar la presencia de bacteroides en el interior de las células vegetales provenientes de nódulos verdaderos (Figura 43a, c, e y f). En cambio, los pseudonódulos presentan “células vacías” es decir, carecen de estos bacteroides (Figura 43b y d). En el interior de las células infectadas se observa la presencia de 1 a 3 bacteroides rodeados por la membrana peribacteroidal, lo cual es característico de nódulos determinados (Gibson *et al.*, 2008). También puede divisarse dentro de estos bacteroides gránulos blancos, los cuales corresponden al material de reserva polihidroxi butirato (PHB) (Lodwig *et al.*, 2005).

A diferencia de lo observado en las células provenientes de nódulos verdaderos, las células de los pseudonódulos se encuentran “vacías”, solo se observa una gran vacuola central y unas pocas organelas, tales como ribosomas y peroxisomas.

Estos resultados confirman lo planteado precedentemente: para el establecimiento de una simbiosis efectiva entre *B. japonicum* y *Glycine max* se requiere una estructura completa del core del LPS. Sin embargo no es posible discernir si el fenotipo observado es debido a la carencia del core interno a la falta del Antígeno O del LPS ya que la mutación en el gen *lpcC* además de afectar el core interno del LPS bloquea el subsiguiente ensamble del core externo y del antígeno O. Estos resultados están en concordancia con el postulado que propone el requerimiento de una estructura completa del LPS en la superficie de los rizobios para el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno en plantas que forman nódulos determinados (Kannenberg & Brewin 1994; Stacey *et al.*, 1991).

En concordancia con los resultados obtenidos en este capítulo, Lee *et al.*, 2014 recientemente han reportado que una mutación en el gen *lpcC* de *B. japonicum* resulta en un LPS truncado carente de antígeno O y core externo. Y como consecuencia de esta alteración la cepa mutante presenta un crecimiento demorado con respecto a la salvaje. Además de presentar un incremento en la hidrofobicidad superficial, aumento en la capacidad de formar biofilm; y una disminución de en la motilidad en comparación a la cepa salvaje.

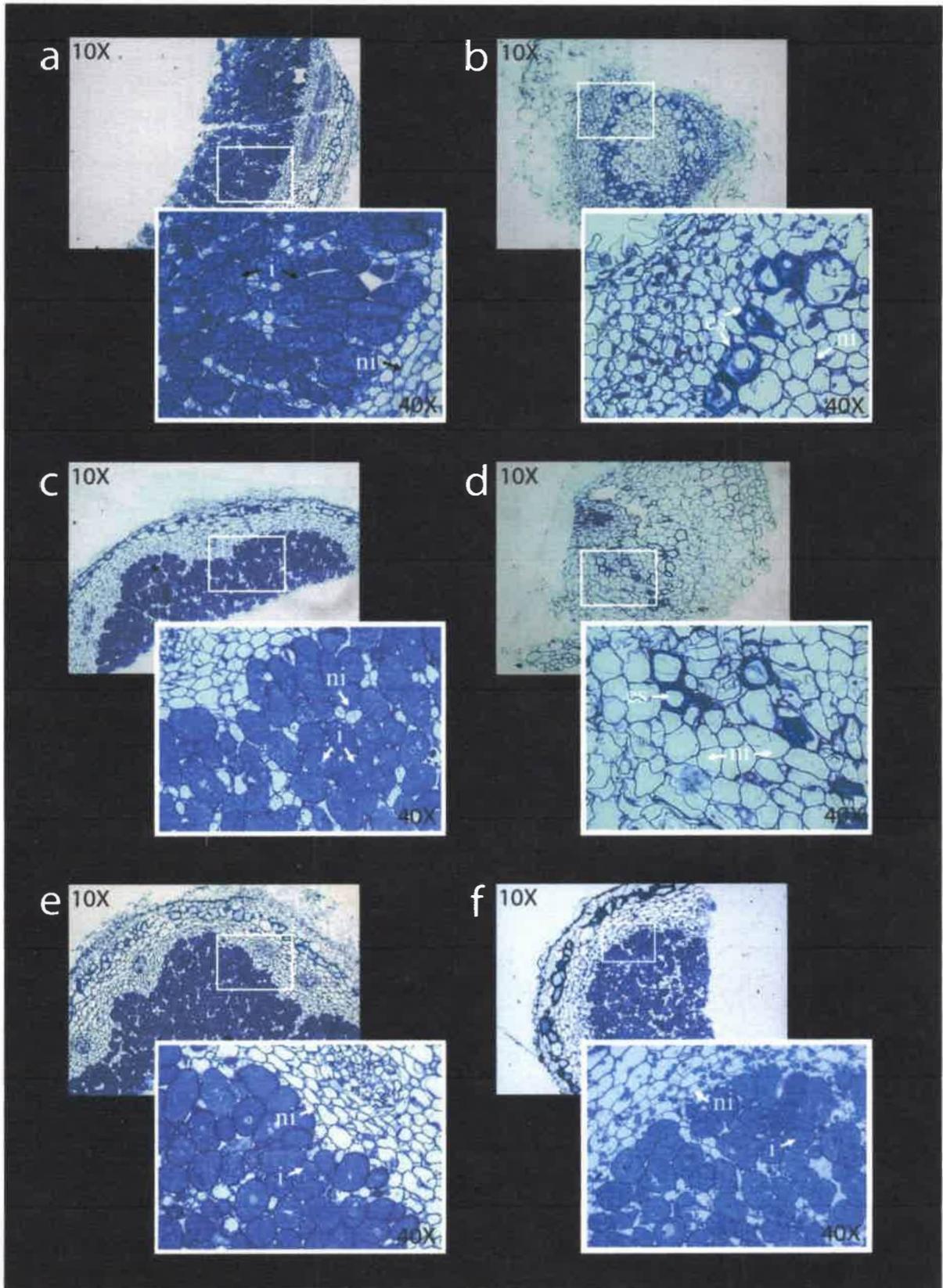


Figura 42. Microscopía óptica de cortes semifinos de nódulos de soja. a: Cortes de nódulos inoculados con *B. japonicum* salvaje; b: Cortes de nódulos inoculados con *B. japonicum lpcC⁻*; c: Cortes de nódulos inoculados con *B. japonicum lpcC⁻ + lpcC* de *B. japonicum*; d: Cortes de nódulos inoculados con *B. japonicum lpcC⁻ + lpsB* de *S. meliloti*; e: Cortes de nódulos inoculados con *B. japonicum lpcC⁻ + lpcC* de *R. leguminosarum*; f Cortes de nódulos inoculados con *B. japonicum lpcC⁻ + rfaC* de *M. loti*. i: Célula infectada; ni: Célula no infectada; es: esclerenquima.

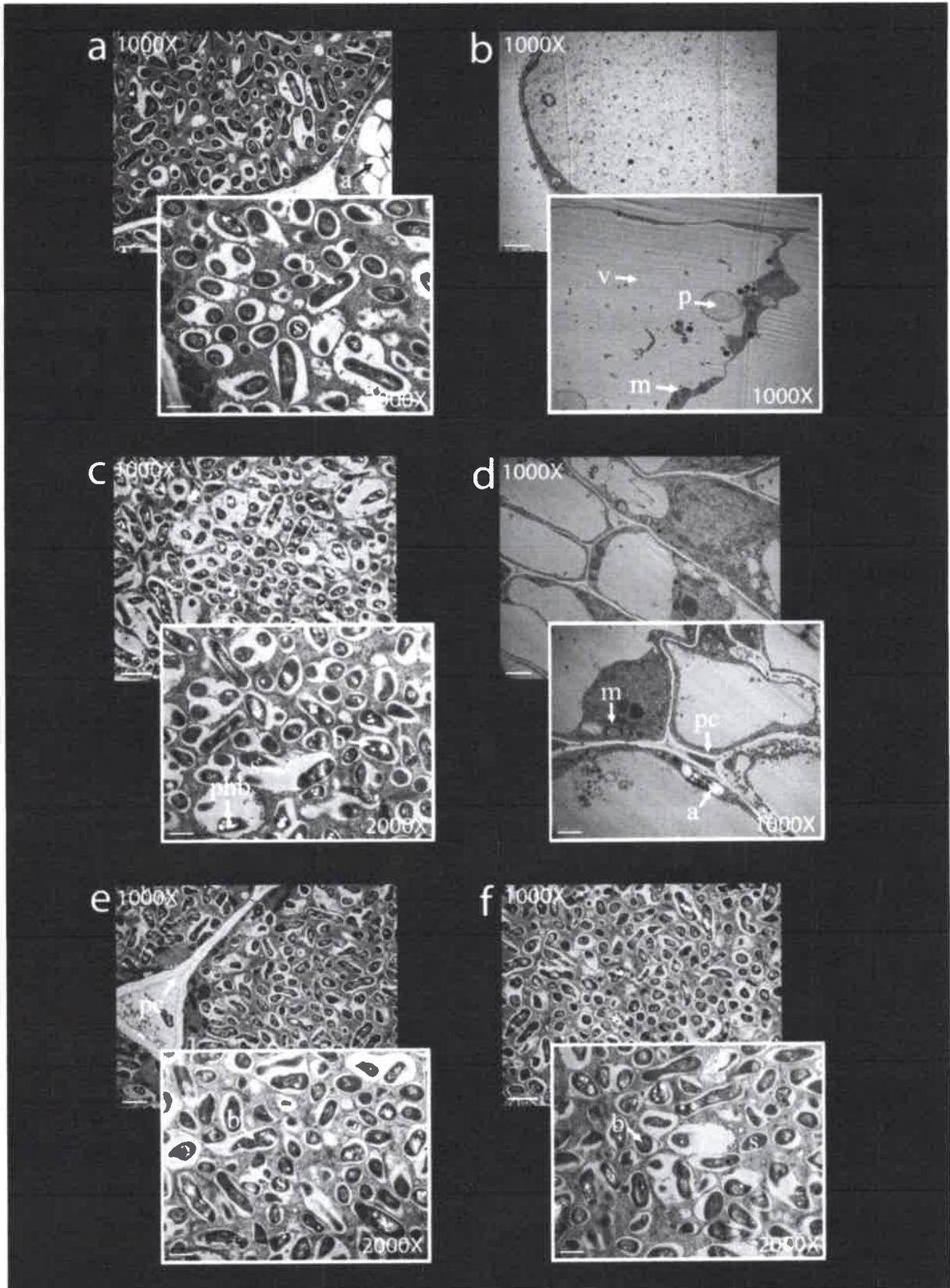


Figura 43. Microscopia electrónica de transmisión de cortes ultrafinos de nódulos de soja. a: Cortes de nódulos inoculados con *B. japonicum* salvaje; **b:** Cortes de nódulos inoculados con *B. japonicum lpcC⁻*; **c:** Cortes de nódulos inoculados con *B. japonicum lpcC⁻ + lpcC* de *B. japonicum*; **d:** Cortes de nódulos inoculados con *B. japonicum lpcC⁻ + lpsB* de *S. meliloti*; **e:** Cortes de nódulos inoculados con *B. japonicum lpcC⁻ + lpcC* de *R. leguminosarum*; **f:** Cortes de nódulos inoculados con *B. japonicum lpcC⁻ + rfaC* de *M. loti*. **b:** Bacterioide; **a:** Almidón; **pc:** Pared Celular; **p:** Peroxisoma; **phb:** Poli-hidroxibutirato; **s:** Simbiosoma; **v:** Vacuola; **m:** Mitocondria.

II-17. Consideraciones Generales

En este capítulo se describió al mutante *lpcC* de *B. japonicum*. Adicionalmente al fenotipo descrito en el capítulo I, se demostró que la cepa *lpcC*⁻ de *B. japonicum* presenta disminuida la velocidad de crecimiento, respecto a la cepa salvaje.

A causa de las alteraciones en el LPS, el mutante *lpcC* presenta marcada disminución en la motilidad e incremento en la autoagregación celular, estos fenotipos posiblemente sean consecuencia del incremento en la hidrofobicidad superficial.

Al inocular plantas de soja con cepas de *B. japonicum* que presenta el LPS alterado, estas indujeron la formación de pseudonódulos vacíos (es decir sin bacteroides en el interior de las células vegetales), lo cual indica que es necesario de un LPS intacto para formar una simbiosis funcional efectiva.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aizawa, S.** (2014). The Flagellar World: Electron Microscopic Images of Bacterial flagella and Related Surface Structures. Elsevier. 30-31.
- Araujo, R., Robleto, E., Handelsman, J.,** (1994). A hydrophobic mutant of *Rhizobium etli* altered in nodulation competitiveness and growth in the rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. 60, 1430–1436.
- Bogino, P. C., Oliva, M. de L., Sorroche, F.G., Giordano, W.** (2013). The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. Int J Mol Sci. 14(8):15838-59
- Brechenmacher, L., Lei, Z., Libault, M., Findley, S., Sugawara, M., Sadowsky, M.J., Sumner, L.W., Stacey G.** (2010). Soybean metabolites regulated in root hairs in response to the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. Plant Physiol. 153(4):1808-22.
- Chang, W.S., Park, K.M., Koh, S.C., So, J.S.** (2008). Characterization of the *Bradyrhizobium japonicum galE* gene: its impact on lipopolysaccharide profile and nodulation of soybean. FEMS Microbiol Lett 280, 242–249.
- Dische, Z.** (1962) General color reactions. Methods Carbohydr. Chem. 1, 478-492.
- Doyle, M., Beuchat, L. Montville, T.** (2001). Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras. España. Acribia.
- Frayse, N., Couderc, F., Poinso, V.** (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium-legume* symbiosis. Eur. J. Biochem. 270: 1365-1380.
- Gibson, K. E., Kobayashi, H., Walker, G. C.** (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. Annu Rev Genet. 42:413-41.
- González, N.** (2000). Inoculación e inoculantes. Fertilizar, V (21): 18-21.
- Hoagland, D.R.** (1938). Water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, Calif.: University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station. 1884-1949
- Jefferson K. K.** (2009). Poly-N-acetyl-glucosamine as a mediator of bacterial biofilm formation. En: Bacterial polysaccharides – Current innovations and future trends (Mathias Ullrich, ed.). Horizon Press.
- Jofré, E., Lagares, A., Mori, G.** (2004). Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiology Letters. 231: 267-275.
- Kadrmaz, J. L., Allaway, D., Studholme, R. E., Sullivan, J. T., Ronson, C. W., Poole, P. S., Raetz, C. R.** (1998). Cloning and overexpression of glycosyltransferases that generate the lipopolysaccharide core of *Rhizobium leguminosarum*. J Biol Chem., 273(41):26432-40.

- Kanbe, M., Yagasaki, J., Zehner, S., Göttfert, M., Aizawa, S.** (2007) Characterization of Two Sets of Subpolar Flagella in *Bradyrhizobium japonicum*. JOURNAL OF BACTERIOLOGY. 1083–1089.
- Kannenberg, E. L., Brewin, N. J.** (1994). Host-plant invasion by Rhizobium: The role of cell-surface components. Trends Microbiol. 2:277-283.
- Lee, H. I., In, Y. H., Jeong, S. Y., Jeon, J. M., Noh, J. G., So, J.S., Chang, W. S.** (2014). Inactivation of the *lpcC* gene alters surface-related properties and symbiotic capability of *Bradyrhizobium japonicum*. Lett Appl Microbiol., 59(1):9-16.
- Lee, Y., Jeong, S., In, Y., Kim, K., So, J., Chang, W.** (2010). Lack of Opolysaccharide enhances biofilm formation by *Bradyrhizobium japonicum*. Lett Appl Microbiol. 50(5):452-456.
- Lerner, A., Castro-Sowinski, S., Valverde, A., Lerner, H., Dror, R., Okon, Y., Burdman S.** (2009). The *Azospirillum brasilense* Sp7 *noeJ* and *noeL* genes are involved in extracellular polysaccharide biosynthesis. Microbiology. 155(Pt 12): 4058-68.
- Lindhout, T., Lau, P. C., Brewer, D., Lam, J. S.** (2009). Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. Microbiology. 155 (Pt 10):3449-60.
- Lodwig, E., Leonard, M., Marroqui, S., Wheeler, T., Findlay, K., Downie, J., Poole, P.** (2005). Role of polyhydroxybutyrate and glycogen as carbon storage compounds in pea and bean bacteroids. Mol Plant Microbe Interact. 18(1):67-74.
- Nakao, R., Ramstedt, M., Wai, S., Uhlin, B.** (2012). Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. PLoSOne. 7(12).
- Noel, K., Forsberg, L., Carlson, R.** (2000). Varying the abundance of O-antigen in *Rhizobium etli* and its effect on symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. J. Bacteriol. 182: 5317-5324.
- Noh, J., Kim, D.H., Oh, E.T., So, J.S.** (2002). Characterization of the *rfaD* gene region of *Bradyrhizobium japonicum* 61A101C. J Microbiol Biotechnol 12, 826–828.
- Parada, M., Vinardell, J. M., Ollero, F. J., Hidalgo, A., Gutiérrez, R., Buendía-Clavería, A. M., Lei, W., Margaret, I., López-Baeno, F. J., Gil-Serrano. A. M., Rodríguez-Carvajal, M. A., Moreno, J., Ruiz-Sainz, J. E.** (2006). *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. Mol. Plant-Microbe Interact. 19:43-52.
- Parniske, M., Schmidt, P. E., Kosch, K., Müller, P.** (1994). Plant defense response of host plants with determinate nodules induced by EPS defective *exoB* mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant-Microbe Interact.. 7:631-638.
- Patriarca, E. J., Tatè, R., Ferraioli, S., Iaccarino, M.** (2004). Organogenesis of legume root nodules. Int. Rev. Cytol. 234:201-262.
- Peral, T.** (1993), Introducción a la microbiología, Acribia.
- Quelas, J., Mongiardini, E., Casabuono, A., López-García, S., Althabegoiti, M., Covelli, J., Pérez-Giménez, J., Couto, A., Lodeiro.** (2010). Lack of galactose or



galacturonic acid in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 exopolysaccharide leads to different symbiotic responses in soybean. *Mol Plant Microbe Interact.* 23(12):1592-604.

Regensburger, B., and Hennecke, H. (1983) RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Arch Microbiol* 135: 103-109.

Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Pühler A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* 145(1):69-73.

Scheiner, J., Lavado, R., Gutiérrez Boem, F. (1999). Dinámica de la absorción de nutrientes en un cultivo de Soja. En: Mercosoja 99: Resumen de trabajos y conferencias presentadas, pp 6-8. Rosario.

Schvarzer, J., Tavošnanska, A. (2007) El complejo sojero argentino. Evolución y perspectivas Economicas, U de BAF de C, ed. Memorias 2010 -INTA Campo Experimental EEA Gral. Villegas 2122: 65-70.

Skorupska, A., Derylo, M., Lorkiewicz, Z. (1985). Role of non-carbohydrate substitutions of *Rhizobium* exopolysaccharide in nodulation process. *Arch. Microbiol.* 1: 307-310.

So, J.S., Kim, W.S., Stacey, G. (2000). Molecular characterization of a gene region involved in lipopolysaccharide biosynthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: cloning, sequencing and expression of *rfaF* gene. *FEMS Microbiol Lett* 190, 109-114.

Stacey, G., So, J., Roth, S., Bhagya, L., Lakshmi, S., Carlson R. W. (1991). A lipopolysaccharide mutant of *Bradyrhizobium japonicum* that uncouples plant from bacteria differentiation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 332-340

Caracterización bioquímica y estructural de LpsB y LpcC

Capítulo III

INTRODUCCIÓN

III-1. Glicosiltransferasas

La biosíntesis de carbohidratos complejos y polisacáridos presentan una remarcable importancia biológica. Estas moléculas regulan una amplia gama de funciones celulares, incluyendo el almacenamiento de energía, la estructura de paredes celulares, señalización e interacciones célula-célula; como también interacciones entre patógeno y hospedador. Debido a estas funciones, especialmente aquellas en las que los residuos de carbohidratos intervienen en el “lenguaje celular”, requieren de estructuras sacáridas precisas. La biosíntesis de oligosacáridos como también de polisacáridos puede involucrar la acción de cientos de glicosiltransferasas diferentes y algunas de ellas muy selectivas (Coutinho, *et al.*, 2003).

Las glicosiltransferasas (GTs) son enzimas involucradas en la síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados. Están ampliamente distribuidas en todos los sistemas vivos, por lo que sus funciones pueden considerarse fundamentales para la vida. Al analizar más de 500 genomas de organismos completamente secuenciados, Lairson *et al.* (2008) encontraron que entre el 1% y 2% de los genes de un genoma, codifican para glicosiltransferasas. Esta abundancia refleja la importancia de estas enzimas para los organismos, ya sean arqueobacterias, bacterias o eucariotas.

Las GTs catalizan la transferencia de un residuo azúcar a partir de un nucleótido-azúcar, también conocido como azúcar-donante o azúcar activado (con mayor frecuencia es un nucleótido difosfato, como UDP, GDP o ADP) a otra molécula conocida como aceptor. Este aceptor comúnmente suele ser otro azúcar, pero también pueden ser proteínas, ADN, antibióticos, lípidos u otras moléculas pequeñas. Además, aunque la transferencia del residuo de azúcar se produce con mayor frecuencia al oxígeno nucleofílico de un oxidrilo del aceptor, también puede ocurrir a un nitrógeno mediante enlaces *N*-glicosídicos (por ejemplo, en la formación de glicoproteínas), azufre (en la formación de tioglicósidos en las plantas), y nucleófilos de carbono (formando enlaces *O*-glicosídicos de glicoproteínas o antibióticos) (Breton., *et al* 2006; Lairson *et al.* 2008).

Tradicionalmente las glicosiltransferasas, como otras enzimas, han sido clasificadas según el azúcar donante utilizado, el aceptor y la especificidad del producto

(Sinnott, M., 1990). Sin embargo este sistema presentaba ciertas limitaciones en el momento de agrupar a una gran cantidad de enzimas. Actualmente las GTs se clasifican en familias, utilizando como base el porcentaje de similitud en sus secuencias (Coutinho, *et al.*, 2003). Hasta la fecha han sido identificadas 97 familias de GTs (*CAZy Carbohydrate Active Enzymes database*. <http://www.cazy.org/>).

La reciente expansión en el conocimiento de estructuras tridimensionales reportadas han revelado que prácticamente todas las GTs adoptan solamente dos tipos de plegamientos fundamentales: Glicosiltransferasas A (GT-A) y Glicosiltransferasas B (GT-B). Las primeras fueron descritas por primera vez al analizar la glicosiltransferasa SpsA de *Bacillus subtilis*. Las glicosiltransferasas pertenecientes a esta superfamilia están formadas por dos dominios estrechamente asociados ($\beta/\alpha/\beta$), los cuales tienden a formar una lámina central continua compuesta por al menos 8 láminas- β y rodeadas por hélices- α a ambos lados. Por este motivo a veces se suele decir que las GT-A están compuestas por un único dominio simple (Figura 44a). En eucariotas es común que las GT-A posean un dominio transmembrana seguido de un dominio globular donde se encuentra el sitio catalítico. Su característica principal es la presencia de un motivo Asp-X-Asp (DXD) el cual puede unir Mn^{2+} que interactúa con el grupo pirofosforilo de la molécula donante (Coutinho, *et al.*, 2003).

A diferencia de las GT-A, la arquitectura de las GT-B se compone de dos dominios $\beta/\alpha/\beta$ (dominios tipo-Rossman), unidos por una por una región bisagra. En este caso los dos dominios se encuentran enfrentados entre sí y con el sitio activo situado en la hendidura resultante (Figura 44b). El nucleótido-azúcar se une al dominio C-terminal y el aceptor al dominio N-terminal (Coutinho, *et al.*, 2003).

Por medio de análisis bioinformáticos, recientemente se ha revelado que un grupo de GTs aún no caracterizadas adoptarían un nuevo tipo de plegamiento, esta superfamilia fue designada como GT-C (Liu, & Mushegian, 2003). La arquitectura predicha para esta nueva superfamilia está compuesta por 8 a 13 hélices de transmembrana y un gran dominio citoplasmático donde se encontraría el sitio activo (Figura 44c) (Berg *et al.*, 2007). La primera glicosiltransferasa descrita con estas características fue la oligosacariltransferasa STT3 de *Pyrococcus furiosus* (Igura *et al.*, 2008).

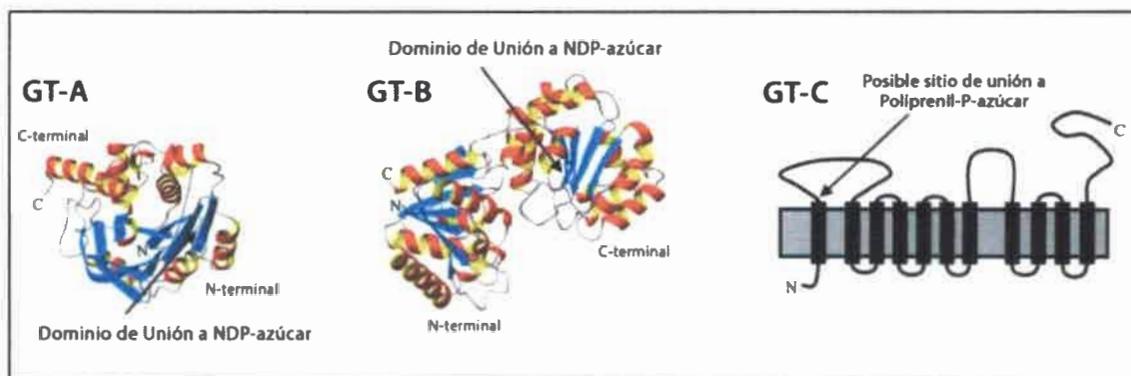


Figura 44. Diagrama de cintas de las estructuras representativas de dos superfamilias de glicosiltransferasas y diagrama de la topología propuesta para una GT-C. GT-A: Glicosiltransferasa SpsA de *B. subtilis* (PDB: 1QGS). GT-B: Glicosiltransferasa MurG de *E. coli* (PDB: 1F0K). C: Modelo de la topología de una Glicosiltransferasa-C de *M. tuberculosis*. Adaptado de (Berg *et al.*, 2007)

III-1.1. Mecanismo de las glicosiltransferasas

Hasta la actualidad no se ha podido conocer en detalle el mecanismo catalítico de estas enzimas, ni siquiera de aquellas de las cuales se conoce su estructura; no obstante, por analogía con otras estructuras de las que sí se conoce dicho mecanismo, se pueden plantear varias hipótesis. De hecho, se cree que las glicosiltransferasas actúan de forma similar a las glicosidasas, las cuales tienen dos tipos de mecanismos catalíticos: inversión y retención. En el primer caso, se invierte la configuración del carbono anomérico del azúcar que se transfiere, y en el segundo, la conformación anomérica sigue siendo la misma (Figura 45) (Lairson *et al.*, 2008).

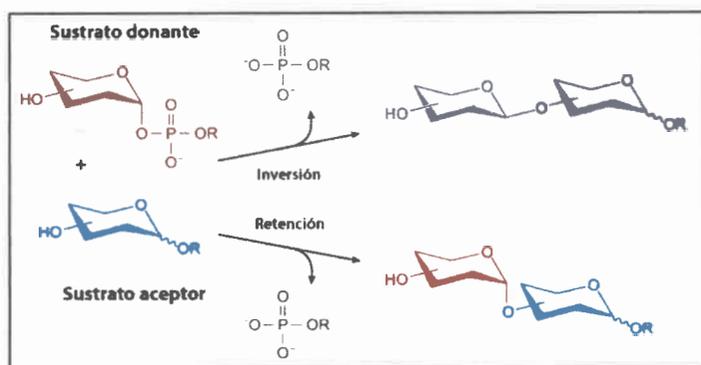


Figura 45. Posibles mecanismos catalíticos de las glicosiltransferasas. Al catalizar la transferencia de grupos glicosilo a un aceptor nucleofílico, el mecanismo puede ser por retención o inversión de la configuración en el centro anomérico. Adaptado de Lairson *et al.*, 2008.

A continuación se procederá a describir a las glicosiltransferasas WaaG y WaaC de *E. coli*. La estructura de estas dos enzimas se utilizaron como molde para analizar los

posibles plegamientos que podrían adoptar las glicosiltransferasas LpsB, LpcC y RfaC de *S. meliloti*, *R. leguminosarum* y *M. loti* respectivamente.

Si bien para el modelado de LpsB y LpcC también se utilizaron otras hexosiltransferasas como molde, solamente se describirá a WaaG debido a que esta es una enzima que implicada en la síntesis del LPS en *E. coli*.

PimA, PimB, MshA y 2JJM (los otros moldes) participan en la biosíntesis de otros polisacáridos, cuyas funciones se describirán en el apartado III-8. Por otra parte, para el modelado de RfaC de *M. loti* también se utilizó como molde a la hexosiltransferasa de *E. coli* WaaF, pero de esta enzima solo es conocida su estructura tridimensional, y hasta la fecha no existen reportes donde se describa a la misma.

III-1.2. WaaG de *E. coli*

En el apartado I-1.2 se describió la biosíntesis del core en *E. coli*. En la cual la glicosiltransferasa WaaG cataliza la adición del residuo de Glc I en el core externo de *E. coli*. En cuanto a su plegamiento, WaaG adopta una estructura tipo GT-B en la cual su dominio N-terminal está separado de la región C-terminal por un polipéptido conector que además cumple la función de bisagra. En ambos dominios se encuentran motivos tipo-Rossmann. El dominio N-terminal está situado entre los residuos 1-168 y presenta siete láminas- β paralelas flanqueadas por cinco hélices- α . Por su parte el dominio C-terminal se encuentra entre los residuos 169-371 y posee seis láminas- β paralelas flanqueadas por seis hélices- α . El polipéptido comprendido entre los residuos 338-371 vuelve a cruzar hacia el dominio N-terminal, ubicando una hélice- α muy próxima al motivo tipo-Rossmann de este dominio (Figura 46) (Martinez-Fleites *et al.*, 2006).

Al co-cristalizar a WaaG junto al nucleótido-azúcar, que en este caso es UDP-Glc, se observó que esta enzima hidrolizaba a dicho nucleótido-azúcar. Para evitar este inconveniente, WaaG fue co-cristalizada con un análogo no hidrolizable: UDP-2-desoxi-2-fluoro-Glc (UDP-2FGlc) (Gibson *et al.*, 2004). En la estructura de WaaG co-cristalizada con su ligando, se observa que a excepción de la Gly 15, todos los residuos que interactúan con la UDP-2FGlc se ubican en el dominio C-terminal (Martinez-Fleites *et al.*, 2006).

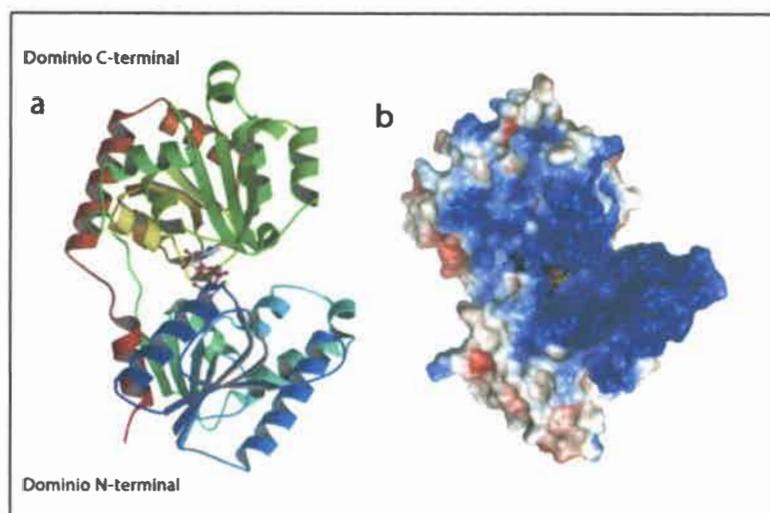


Figura 46. Estructura de WaaG. a) Diagrama de cintas de WaaG. b) Superficie molecular electrostática de WaaG. Adaptado de Martínez-Fleites *et al.*, 2006.

III-1. 3. WaaC de *E. coli*

Al igual que WaaG, WaaC adopta el plegamiento típico de la superfamilia GT-B y por lo tanto está formada por dos dominios conectados por un solo polipéptido conector (bisagra). El dominio N-terminal se encuentra entre los residuos 1-152, seguido por un polipéptido conector entre los residuos 153-179; y por último el dominio C-terminal se encuentra entre los residuos 180-320. Ambos dominios presentan un motivo tipo-Rossman, compuesto por seis láminas- β paralelas flanqueadas por hélices- α . Estos dominios tipo-Rossman son típicos de proteínas que unen nucleótidos (Rao *et al.*, 1973). Entre los dos dominios de WaaC se forma un surco extenso, si bien la molécula de nucleótido azúcar (ADP-L,DHep) se une al dominio C-terminal y el aceptor (Kdo₂-lípidio IV_A) al dominio N-terminal; es en este surco donde ocurre la reacción enzimática (Figura 47) (Grizot *et al.*, 2006). WaaC presenta una distribución asimétrica de cargas, el dominio N-terminal (pI 10,2) posee en su mayoría cargas negativas, en cambio el dominio C-terminal es ligeramente ácido (pI 6,0). Esta disimetría puede estar relacionada con la naturaleza del aceptor, que en este caso es una molécula de Kdo₂-lípidio IV_A, el cual se encuentra inmerso en la cara interna de la membrana plasmática. Como en las GT-B, el dominio N-terminal es el que interactúa con el aceptor (Ha *et al.*, 2001). Por lo tanto se cree que esta naturaleza alcalina del dominio N-terminal podría favorecer la interacción con las cargas negativas de la membrana (y por ende con el aceptor). En cambio, la molécula del azúcar donante interactúa exclusivamente con el dominio C-terminal (Grizot

et al., 2006). Al co-cristalizar a WaaC junto al donante (ADP-L,D-Hep), se observó que esta enzima hidrolizaba al nucleótido-azúcar, obteniéndose como resultado a WaaC interaccionando solamente con ADP. Para subsanar este inconveniente, WaaC fue co-cristalizada con un análogo no hidrolizable: ADP-2-desoxi-fluoro-heptosa (Dohi, *et al.*, 2008). De esta manera se pudo determinar el sitio de unión de la GT con el azúcar activado.

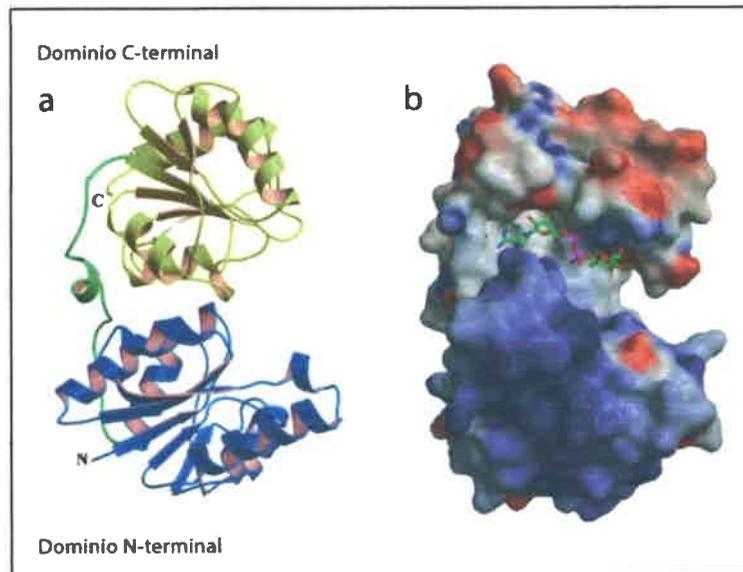


Figura 47. Estructura de WaaC. a) Diagrama de cintas. b) Superficie molecular electrostática junto a ADP-2-desoxi-fluoro-heptosa. Adaptado de Grizot *et al.*, 2006

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 7. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo

Escherichia coli

Cepa	Características	Referencia
DH5 α	<i>recA1</i> , DlacU169, 80dlacZDM15. Cepa hospedadora utilizada en los experimentos de clonado	Colección Lab
BL 21	<i>E. coli B F- dcm ompT hsdS(rB - mB)</i>	Novagen
BL21 (DE3)	<i>E. coli B F- dcm ompT hsdS (rB - mB) gal λ(DE3)</i> .	Novagen

Tabla 8. Plásmidos empleados en el presente capítulo

Plásmido	Características	Referencia
pET28a+	Vector de expresión. Promotor T7lac. Tag de Hexahistidina N o C terminal. Km ^r	Novagen
pJF340	Derivado de pET28a+, conteniendo <i>lpsB</i> de <i>S. meliloti</i> . Tag de Hexahistidina N-terminal.	Esta tesis
pJF350	Derivado de pET28a+, conteniendo <i>lpcC</i> de <i>R. leguminosarum</i> . Tag de Hexahistidina N-terminal.	Esta tesis
pJF360	Derivado de pET28a+, conteniendo <i>lpsB</i> de <i>S. meliloti</i> . Tag de Hexahistidina C-terminal.	Esta tesis
pJF370	Derivado de pET28a+, conteniendo <i>rfaC</i> de <i>M. Loti</i> . Tag de Hexahistidina N-terminal.	Esta tesis

Tabla 9. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Gen	Secuencia
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (Para el clonado en pET28a+ 6xHis N-terminal)	
<i>lpsB</i>	<u>Forw.</u> 5'-GGTGGT <u>CATATGGT</u> CGATATCCGCGACGT-3' NdeI
<i>lpsB</i>	<u>Rev.</u> 5'-CGGGATCCTCAACGCATCAGGCTTTCGTAA-3' BamHI
<i>Rhizobium leguminosarum</i> (Para el clonado en pET28a+ 6xHis N-terminal)	
<i>lpcC</i>	<u>Forw.</u> 5'-GGTGGT <u>CATATGCCT</u> GATATCCGTGACGT-3' NdeI
<i>lpcC</i>	<u>Rev.</u> 5'-CGGGATCCTCAGCTGCGATTGTCGCCGAG-3' BamHI
<i>Mesorhizobium loti</i> (Para el clonado en pET28a+ 6xHis C-terminal)	
<i>rfaC</i>	<u>Forw.</u> 5'-GGGAATTCCATATGAAGGTTCTGATCGTCAA -3' NdeI
<i>rfaC</i>	<u>Rev.</u> 5'-CGGGATCCCTAAGCCGGCGCCTGCAATT-3' BamHI

III-2. Programas y servidores utilizados para el modelado de LpsB, LpcC y RfaC

Para obtener los posibles moldes de las glicosiltransferasas, estas fueron alineadas con secuencias de proteínas conocidas utilizando el servidor HHpred (*Homology detection & structure prediction*) (Söding *et al.*, 2005).

Las estructuras de los moldes se obtuvieron del servidor PDB (Protein Data Bank) (<http://www.rcsb.org>).

Los alineamientos se llevaron a cabo con la aplicación Align X, componente programa Vector NTI Advance 11.5, Invitrogen.

Para el modelado de las glicosiltransferasas se utilizó el programa Modeller 9.11 (Sali & Blundell, 1993).

Los alineamientos múltiples se realizaron con el programa MAMMOTH-mult 1.0 (Lupyan *et al.*, 2005).

Los modelos *ab initio* se generaron con el servidor I-TASSER (*Iterative Treading ASSEmbly Refinement algorithm*) (Zhang, 2008).

La visualización y superposición de los modelos se realizó con el programa Chimera 1.9rc (Pettersen *et al.*, 2004).

La determinación de los puntos isoeléctricos (pI) de los dominios se realizó con la herramienta Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/) (Bjellqvist *et al.*, 1994).

III-3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las diferentes muestras de proteínas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida a una concentración de 10%, utilizando una cuba Mini-PROTEAN® 3, BIO-RAD.

La composición de los geles fue la siguiente:

Gel de Apilamiento (Stacking):

Acril-Bis 30:08 (30 % T 2, 67 % C)	0,6 ml
Stacking <i>Buffer</i> *	0,625 ml
H ₂ O	1,21 ml
TEMED [10 %]	0,125 ml
APS [10 %]	0,05 ml

Gel de Resolución:

Acril-Bis 30:08 (30% T 2, 67% C)	2,5 ml
4X Gel <i>Buffer</i> **	1,875 ml
H ₂ O	2,95 ml
TEMED [10 %]	0,125 ml
APS [10 %]	0,05 ml

*Stacking *Buffer* (pH 6,8):

Tris HCl	500 mM
SDS	0,4 %

**4X GEL *Buffer* (pH 8,8)

Tris HCl	1,5 M
----------	-------

SDS	0,4 %
-----	-------

La electroforesis se llevó a cabo a 90 Voltios (voltaje constante) en el gel de apilamiento y a 150 Voltios (voltaje constante) en el gel de resolución hasta que el frente de corrida alcanzó el borde inferior del gel, aproximadamente durante 60-90 min. La composición del *buffer* de corrida fue la siguiente:

Buffer de corrida 10X

Tris	250 mM
Glicina	1,92 M
SDS	1 % (p/v)
pH 8,2-8,4 (no ajustar)	

III-4. Tinción de geles de proteínas

Al finalizar la corrida electroforética, los geles fueron sumergidos en 100 ml de solución de tinte Azul de *Coomassie* y dejados en agitación durante toda la noche. Para decolorar los geles, los mismos fueron sumergidos en solución de desteñido y puestos en agitación por un período de 30 min, pasado este tiempo, la solución fue remplazada y el gel puesto en agitación nuevamente.

La documentación se llevó a cabo mediante el escaneado de los geles.

Azul de *Coomassie*

<i>Coomassie</i> Brilliant Blue R250	2 g
Etanol	475 ml
H ₂ O	425 ml
Ácido Acético Glacial	100 ml

Solución de desteñido

Etanol	210 ml
H ₂ O	510 ml
Ácido Acético Glacial	80 ml



III-5. Purificación de LpsB de *S. meliloti*, LpcC de *R. leguminosarum* y RfaC de *M. loti* por cromatografía de afinidad utilizando el sistema pET

Para sobreexpresar y purificar estas proteínas, se decidió utilizar el sistema pET (Novagen), ya que existen reportes de niveles óptimos de producción de la proteína LpsB empleando este sistema (Kanipes *et al.*, 2003). Dicho sistema genera una proteína recombinante, que se encuentra constituida por la proteína diana unida a un péptido de seis residuos de histidina (*His tag*) que tiene la capacidad de unirse a iones de Ni^{2+} inmovilizados en esferas de sefarosa. En esta ocasión se utilizó el plásmido pET28a+ ya que permite fusionar el péptido 6xHis tanto al extremo N- como C-terminal de la proteína a purificar. En este caso el péptido 6xHis se fusionó al extremo N-terminal de la proteína.

III-5.1. Obtención de los Clones Recombinantes

En este apartado se describe la obtención del plásmido pJF340 (pET28a-*lpsB* de *S. meliloti* 6xHis N-terminal), ya que los demás constructos se obtuvieron de manera similar.

La secuencia de ADN codificante para el gen *lpsB* fue amplificada mediante PCR usando cebadores específicos (Tabla 9); y la ADN polimerasa de alta fidelidad *Pfx* Platinum (Invitrogen). Tanto el amplicón como el plásmido pET28a+ fueron digeridos con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, purificados; y posteriormente ligados. Con el producto de esta ligación se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α . Estas células transformadas fueron sembradas en placas conteniendo medio LB-agar suplementado con kanamicina. Para determinar los clones portadores del plásmido recombinante, se procedió a purificar plásmidos de varios clones. Los mencionados plásmidos fueron separados en geles de agarosa y se comparó la movilidad electroforética de los mismos con respecto al plásmido vacío (pET28a+). Aquellos plásmidos que mostraron una movilidad electroforética disminuida con respecto al vector vacío fueron digeridos con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*. Una vez identificado el plásmido recombinante, este fue secuenciado y utilizado para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3).

III-5.2. Sobreexpresión heteróloga de *lpsB*, *lpcC* y *rfaC*

Luego de transformadas células de *E. coli* BL21 (DE3) con el vector recombinante pJF340, se tomó una colonia aislada y con ésta se inocularon 20 ml de medio LB suplementado con kanamicina a una concentración final de 25 µg/ml y se incubó toda la noche a 37 °C y 150 rpm. De este pre-cultivo se tomaron 10ml para inocular 500ml de LB suplementado con kanamicina 25µg/ml que se incubó a 37 °C y 150 rpm hasta que el cultivo alcanzó una $DO_{600nm}=0,6$. Una vez alcanzada esta densidad óptica, se agregó el inductor IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se incubó a 20 °C con agitación de 150 rpm durante toda la noche. Pasado el tiempo de inducción, el cultivo fue centrifugado a 7000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante descartado. El *pellet* resultante fue resuspendido en 5 ml de *buffer* de lisis conteniendo 10 µl de PMSF 0,5%.

Esta suspensión fue sonicada durante 7 minutos con amplitud 80 y pulsos de 4 segundos en hielo. El lisado se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue luego ultracentrifugado a 30000 rpm durante 1 hora a 4 °C. El sobrenadante correspondiente a la fracción soluble fue separado del *pellet* de membranas celulares y ambos se conservaron a -20 °C para su posterior utilización.

III-5.3. Purificación de *LpsB*, *LpcC* y *RfaC*

La purificación se llevó a cabo utilizando un sistema en *batch*, para lo cual se agregaron 200 µl de suspensión de resina Ni-NTA (QIAGEN) en un tubo de 1,5 ml. La resina fue equilibrada agregando 1 ml de *buffer* de lisis, posteriormente centrifugado y el sobrenadante descartado. Este lavado se llevó a cabo dos veces. Luego se agregó 1ml del sobrenadante de la ultracentrifugación conteniendo la fracción soluble (resultante de lo descrito en el apartado anterior) y se dejó en agitación durante una hora en hielo. Posteriormente por medio de un pulso de centrifugación se sedimentó la resina junto a las proteínas unidas a ella y se lavó 4 veces con 1 ml de *buffer* de lavado cada vez.

Una vez eliminadas las proteínas unidas inespecíficamente a la resina se procedió a eluir la proteína de fusión mediante tres lavados secuenciales con *buffer* de elución (150 µl c/u) conteniendo concentraciones crecientes de imidazol (100mM, 250mM y 500mM). Para cada concentración de imidazol se dejó la muestra en agitación durante una hora en hielo, luego por centrifugación se sedimentó la resina y se colectó el sobrenadante.

Una vez obtenidas las distintas fracciones resultantes de las eluciones, las mismas fueron concentradas empleando una columna Millipore Ultracel -3K 3.000 NMWL siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente la proteínas fue resuspendida en 50 mM Tris base (pH 7,5).

Posteriormente se cuantificó la concentración de proteínas utilizando el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). Además, para observar el grado de pureza, las distintas eluciones fueron separadas por SDS-PAGE.

Buffer de lisis

NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	300mM
Imidazol	10mM
Ajustado a pH 8	NaOH

Buffer de lavado

NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	300mM
Imidazol	20mM
Ajustado a pH 8	NaOH

Buffer de elución

NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	300mM
Imidazol	100-250-500mM
Ajustado a pH 8	NaOH

*Las condiciones de crecimiento para *E. coli*, amplificación por PCR y transformación bacteriana han sido descritas en el apartado I-3.5.

III-6. Determinación de actividad enzimática *in vitro* de LpsB

En la reacción enzimática *in vitro* principalmente intervienen tres componentes, el precursor biosintético (o aceptor) presente en el mutante *lpsB* (sobre el cual la enzima

deposita el residuo de azúcar); la glicosiltransferasa en estudio y los sustratos UDP- ^{14}C Glc y GDP- ^3H Man.

Como aceptor, se utilizaron precursores biosintéticos de lipopolisacáridos aislados del mutante *lpsB* de *S. meliloti*. Este mutante al carecer de la glicosiltransferasa LpsB es incapaz de depositar el residuo de Glc sobre el precursor biosintético del LPS, dando como resultado la interrupción de la polimerización del LPS en *S. meliloti* (véase apartado I-18.1). Estos LPS (carentes de core externo y antígeno O) fueron aislados utilizando polimixina B inmovilizada en agarosa (véase apartado I-11.1.1). Como sustrato se utilizó una mezcla en proporción 1:10 de UDP- ^{14}C Glc(325 $\mu\text{Ci}/\mu\text{M}$):UDP-Glc. Y como fuente de enzimas, se utilizaron membranas de *E. coli* BL21 (DE3) sobreexpresando *lpsB*. La reacción fue iniciada en el momento del agregado de las membranas y fue incubada a 30 °C durante 1h. Luego la reacción fue finalizada mediante tres lavados de 1ml de TrisCl 50 mM (pH 7,5).

Finalmente para determinar indirectamente la cantidad de Glc- ^{14}C unida al aceptor, el precursor inmovilizado en Polimixina B-agarosa se mezclaron con 3 ml de líquido de centelleo y la radioactividad fue determinada en un contador de centelleo Beckman LS 6000.

Mezcla de reacción (para 50 μL) adaptada de Kanipes *et al.* 2003:

H ₂ O bidestilada		8 μl
Triton X100	[10%]	2 μl
MgCl ₂	[50mM]	5 μl
TrisCl	[500mM] pH7,5	5 μl
Precursor inmovilizado en polimixina		20 μl
UDP-Glc	(mezcla 1:10)	5 μl
Membranas	[9mg/ml]	5 μl

Líquido de centelleo (Hamzah *et al.*, 2011):

PPO	0,4g
POPOP	0,04g
Solución de tolueno*	100ml

*Solución de tolueno (para 100 ml):

H ₂ O	20ml
Tolueno	40ml
Tritón	40ml

III-6.1. Determinación de V_{\max} y K_m

Para determinar la velocidad de reacción se utilizaron diferentes concentraciones del sustrato UDP-Glc. Dichas concentraciones fueron 0,1; 0,5; 1, 2, 4 y 6 mM; y la concentración de enzimas fue 0,1 mg/ml de proteínas en membranas. La reacción se llevó a cabo a 30 °C durante 1h, por cuadruplicado. Cabe destacar que las reacciones se llevaron a cabo a concentraciones saturantes de aceptor.

Al tratarse de una reacción bisustrato, es decir hay un sustrato aceptor y un sustrato donador, (este último será nombrado solamente como sustrato) se utilizó la ecuación de Lineweaver-Burk derivada de la de Michaelis-Menten, la cual corresponde a una recta:

Ecuación de Michaelis-Menten:
$$V = \frac{V_{\max (\text{aparente})} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Ecuación de Lineweaver-Burk:
$$\frac{1}{V_{\max (\text{aparente})}} = \frac{K_m (\text{aparente})}{V_{\max (\text{aparente})}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max (\text{aparente})}}$$

RESULTADOS y DISCUSIÓN

III-7. Análisis *in silico* de glicosiltransferasas involucradas en la biosíntesis del core interno del LPS

Desde el comienzo de esta tesis se describen dos grupos de glicosiltransferasas que son las encargadas de depositar el primer azúcar sobre el precursor Kdo₂-lípidio IV_A del LPS. Inicialmente creíamos (de manera errónea) que la mayoría de las bacterias Gram negativas poseían una hexosiltransferasa encargada de adicionar el primer residuo de hidrato de carbono sobre dicho precursor.

Con el objeto de obtener un panorama evolutivo de estos dos tipos de glicosiltransferasas, se decidió hacer una búsqueda al azar en bacterias del filum Proteobacteria, incluyendo a algunas especies bacterianas de las clases α , β , γ y ϵ - proteobacteria. Para esto se utilizó como referencia al esquema del Árbol de la Vida Interactivo (*Interactive Tree of Life*) <http://itol.embl.de/> (Cicarelli *et al.*, 2006). Para agrupar a las distintas especies bacterianas seleccionadas se utilizó como criterio la secuencia del gen *rpoB* (Case *et al.*, 2007). Dichas secuencias fueron alineadas utilizando el programa Clustal X y posteriormente el árbol fue visualizado con el programa FigTree.

Con el objeto de conocer si la enzima encargada de glicosilar al precursor Kdo₂-lípidio IV_A es una hexosil- o heptosiltransferasa se realizó una búsqueda, utilizando el programa BlastP (*Basic Local Alignment Search Tool Protein*), de las enzimas LpsB/LpcC (lo cual sugiere la presencia de una hexosiltransferasa) y WaaC (lo que indica la presencia de una heptosiltransferasa) en cada uno de los genomas de las bacterias seleccionadas. Asimismo se determinó la presencia de la Kdo-transferasa WaaA, esta es una glicosiltransferasa bifuncional encargada de depositar los dos primeros residuos de Kdo sobre el lípidio A (véase apartado I-1.2); la heptosiltransferasa WaaF que deposita el residuo de HepII sobre la HepI y WaaQ, que se encarga de producir una ramificación en el core por adición de la Hep III sobre la HepII.

En el dendograma de la Figura 48 se observan a las distintas especies bacterianas agrupadas principalmente en cuatro clados, los cuales corresponden a α , γ , β y ϵ -proteobacteria. Cabe aclarar que las α -Proteobacterias contienen más especies ya que se incluyeron a todas las bacterias pertenecientes al orden *Rhizobiales* que son objeto de estudio en esta tesis.

En cuanto a la presencia (o ausencia) de las glicosiltransferasas involucradas en la síntesis del LPS, puede observarse que la Kdo-transferasa WaaA se encuentra presente en todas las bacterias. Con respecto a la heptosiltransferasa WaaC se encuentra presente en prácticamente todas las bacterias, a excepción de *B. japonicum*, *B. melitensis*, *R. leguminosarum*, *A. tumefaciens* y *S. meliloti*; las cuales poseen las hexosiltransferasas LpsB o LpcC. Es decir, los rizobios poseen la hexosiltransferasa LpsB/LpcC; excepto *M. loti* que presenta la heptosiltransferasa WaaC, también conocida como RfaC.

Extrañamente puede observarse dentro de las γ -Proteobacteria que *Vibrio cholerae* y *Haemophilus influenzae* no poseen WaaC ni LpsB/LpcC; sino que tienen una heptosiltransferasa llamada OpsX, la cual difiere en la especificidad de sustrato con respecto a la heptosiltransferasa WaaC, es decir, requiere de un Kdo fosforilado para depositar el residuo de Hep (Gronow *et al.*, 2005). Próximo a OpsX, pero en orientación divergente se encuentra la Kdo-kinasa necesaria para fosforilar al residuo de Kdo.

En cuanto a la heptosiltransferasa II o WaaF, la cual deposita un segundo residuo de heptosa en el core interno del LPS, puede observarse que está presente en todas las bacterias que posean la heptosiltransferasa I (ya sea WaaC o OpsX). La excepción la presenta *B. japonicum*, ya que además de poseer esta segunda heptosiltransferasa WaaF, presenta la hexosiltransferasa LpcC.

Por otra parte en todas las bacterias de la clase γ -Proteobacterias se encuentra presente la heptosiltransferasa III WaaQ, la que indica que el core de estas bacterias presenta una ramificación.

Este diagrama nos da un panorama del tipo de glicosiltransferasas implicadas en la síntesis del core interno de las Proteobacterias. Contrariamente a lo que creíamos inicialmente, la mayoría de las bacterias poseen una heptosiltransferasa (ya sea WaaC u OpsX); y solo un pequeño grupo, que comprende a los rizobios (excepto *M. loti*) posee una hexosiltransferasa (LpsB/LpcC).

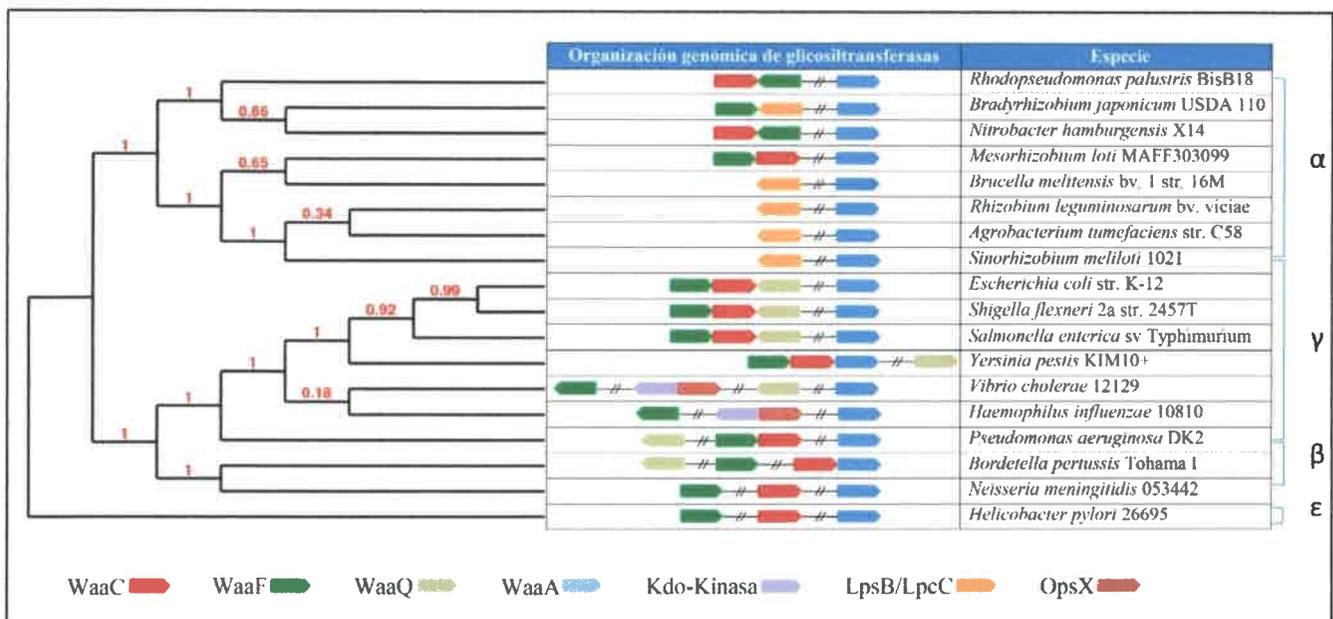


Figura 48. Detección de hexosil- heptosiltransferasas de la biosíntesis del core en Proteobacterias. WaaC: Heptosiltransferasa I; **WaaF:** Heptosiltransferasa II; **WaaQ:** Heptosiltransferasa III; **WaaA:** Kdo-transferasa; **LpsB/LpcC:** Hexosiltransferasa; **OpsX:** Heptosiltransferasa I.

III-7.1. Análisis de Identidad y Similitud entre glicosiltransferasas

Con el objetivo de encontrar posibles ortólogos de LpsB en los genomas disponibles, se comparó la secuencia de esta enzima contra las bases de datos de genomas secuenciados existentes utilizando la herramienta BLASTP disponible en el *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). También se realizó el mismo análisis para RfaC de *E. coli* K12. Estas dos glicosiltransferasas fueron elegidas debido a que LpsB de *S. meliloti* posee actividad hexosiltransferasa (Kanipes *et al.*, 2003), en cambio la actividad de RfaC de *E. coli* fue descrita como heptosiltransferasa (Gronow *et al.*, 2000). Con los datos obtenidos se confeccionó la Tabla 10 donde se muestra el grado de similitud e identidad entre dichas enzimas y sus ortólogos.

		Similitud / Identidad								
	Sm	RI	Bj	At	Bm	Bh	MAFF	K12	Sf	St
Sm	-	68/55	52/37	69/52	72/55	71/54	N/S	N/S	N/S	N/S
RI		-	58/45	77/67	79/67	76/61	N/S	N/S	N/S	N/S
Bj			-	55/41	56/44	55/40	N/S	N/S	N/S	N/S
At				-	77/63	76/59	N/S	N/S	N/S	N/S
Bm					-	81/69	N/S	N/S	N/S	N/S
Bh						-	N/S	N/S	N/S	N/S
MAFF							-	56/41	53/39	56/41
K12								-	96/94	91/84
Sf									-	90/82
St										-

Tabla 10. Comparación de similitud e identidad entre las proteínas en estudio de diferentes especies de bacterias, tanto simbióticas como patógenas. Los datos numéricos fueron obtenidos mediante el uso del algoritmo BLAST y están expresados en porcentajes (%). Las celdas indicadas con (-) representan el 100%. N/S indica que los valores no son significativos, **Referencias:** Sm (*S. meliloti*); Bh (*B. henselae*); Bm (*B. melitensis*); At (*A. tumefaciens*); RI (*R. leguminosarum*); Bj (*B. japonicum*); K12 (*E. coli* K12); Sf (*S. flexneri*); MAFF (*M. loti* MAFF 303099); St (*S. typhimorium*).

III-7.2. Organización genómica de la región que comprende a *lpsB/lpcC* en distintos genomas

Con el objeto de establecer una comparación de la organización genómica de la región que comprende a *lpsB/lpcC* en los genomas de las bacterias en estudio se analizó la sintenia de la región genómica que flanquea a dichos genes.

En la Figura 49 se observa que en *S. meliloti*, *R. leguminosarum*, *A. tumefaciens*, *B. melitensis* y *B. henselae* los genes *lpsB/lpcC* se encuentran precedidos por el regulador transcripcional *greA*. Margaret *et al.* (2013) reportaron que en *S. fredii* el gen *greA* codifica para un factor de transcripción que regula positivamente la expresión de *lpsB*; y una mutación en *greA* produce un LPS de mayor movilidad electroforética. Por su parte el gen *lrp* que se cree codifica para otro regulador transcripcional también se encuentra presente en la vecindad de *lpsB/lpcC* de *S. meliloti*, *R. leguminosarum*, *A. tumefaciens* y *B. melitensis*, pero en orientación contraria a estos. A excepción de *S. meliloti* y *B. japonicum*, los genes *lpcC* no se encuentran en proximidad de otras glicosiltransferasas implicadas en la síntesis del core de lipopolisacáridos.

Este análisis del contexto genómico de *lpsB/lpcC* revela una baja conservación en la vecindad de las glicosiltransferasas en estudio.

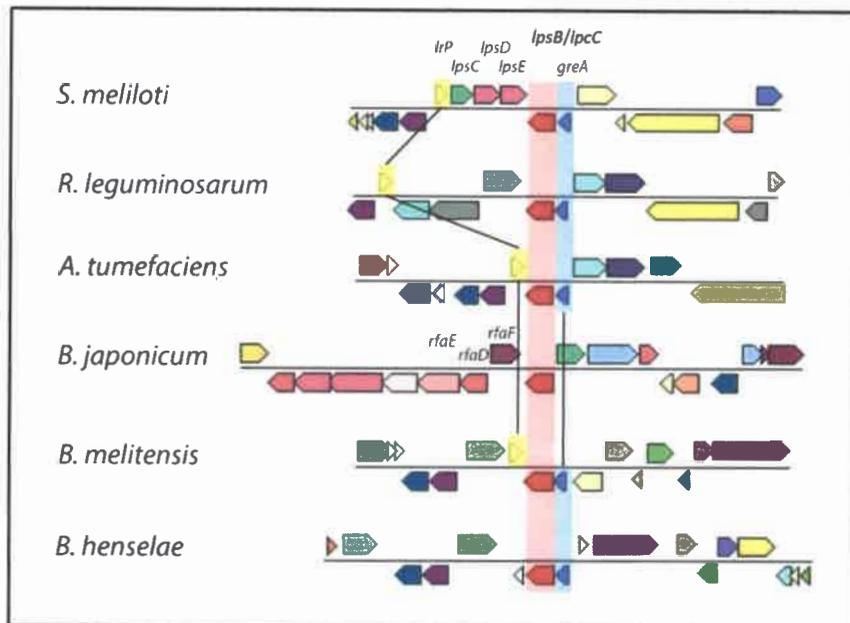


Figura 49. Organización genómica de la región comprendida entre *greA*, *lpsB/lpcC* y *lrp* en distintos genomas. *greA*: gen que codifica al regulador transcripcional GreA. *lpsB/lpcC*: hexosiltransferasas en estudio; *lrp*: gen que codifica para regulador transcripcional LrP. *lpsC*, *lpsD* y *lpsE*: hexosiltransferasas implicadas en la síntesis del core en *S. meliloti*. *rfaE* y *rfaF*: posibles heptosiltransferasas implicadas en la síntesis del core en *B. japonicum*. *rfaD* heptosa-6-epimerasa. Alineamiento con IMG: *the integrated microbial genomes database and comparative analysis system*.

III-7.3. Organización genómica de la región que comprende a *rfaC* en distintos genomas.

A diferencia de lo observado en el apartado anterior, en el contexto genómico de los genes *rfaC* se encuentran otros genes implicados en la síntesis del LPS. En *E. coli*, *S. typhimorium*, *S. flexneri* y *M. loti*; *rfaC* se encuentra precedido por los genes *rfaD* y *rfaF*, los cuales codifican para una heptosa-epimerasa y una heptosiltransferasa II respectivamente. *E. coli* y *S. typhimorium* presentan una disposición similar de los genes que se encuentran corriente abajo, pero en sentido inverso de *rfaC*. En *S. flexneri* se observa esta conservación, pero en menor medida. En contraste, *M. loti* no presenta estos genes en la vecindad de *rfaC*, pero se encuentra el gen que codifica para el regulador *greA*; también presentes en las hexosiltransferasas descritas en el apartado anterior.

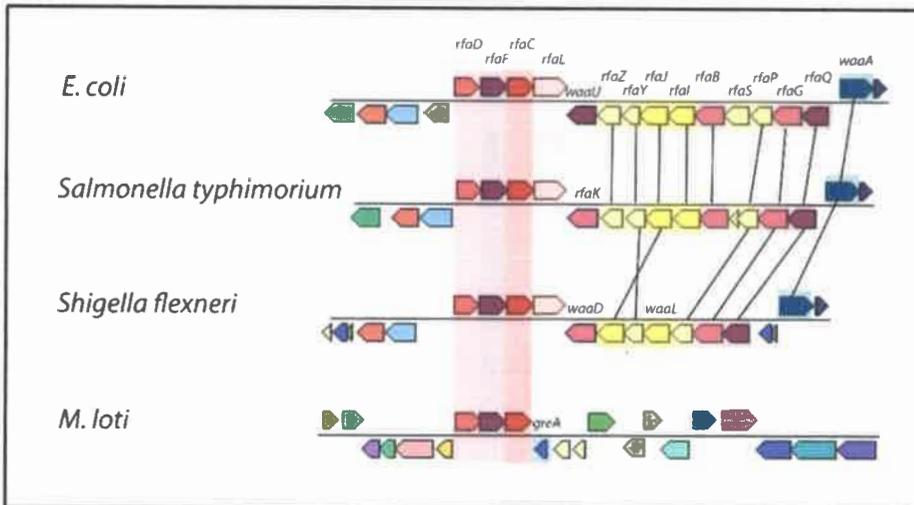


Figura 50. Organización genómica de la región comprendida por *rfaD*, *rfaF*, *rfaC* y *rfaL*. *rfaD*: gen que codifica para una heptosa epimerasa; *rfaF* y *rfaC*: codifican para las heptosiltransferasas II y I respectivamente. *rfaL*: codifica para la ligasa del antígeno O. *waaU*, *rfaZ*, *rfaY*, *rfaJ*, *rfaI*, *rfaB*, *rfaS*, *rfaP*, *rfaG*, *rfaQ* y *rfaA*: enzimas implicadas en la síntesis de lipopolisacáridos. *greA*: gen que codifica al regulador transcripcional GreA. Alineamiento con IMG: *the integrated microbial genomes database and comparative analysis system*.

III-8. Búsqueda de los moldes más probables para LpsB y LpcC

En primera instancia las secuencias de aminoácidos de LpsB y LpcC fueron alineadas y comparadas con secuencias de proteínas de estructuras conocidas. Para ello se utilizó el servidor HHpred (*Homology detection & structure prediction*) (Söding *et al.*, 2005). Como resultado se encontraron varias proteínas con una identidad cercana al 20%. Se seleccionaron dos glicosiltransferasas como moldes para LpsB y LpcC: PimB y 2JJM. La primera es una manosiltransferasa de *Corynebacterium glutamicum* (Batt *et al.*, 2010) implicada en la síntesis de fosfatidil-mio-inositol (código PDB *Protein Data Bank*: 3OKP), y la segunda una glicosiltransferasa de *Bacillus anthracis*, cuya función exacta aún no ha sido descrita (Ruane *et al.*, 2008) (código del PDB *Protein Data Bank*: 2JJM). Además para el modelado de LpsB se adicionó la presencia del ligando UDP-Glc proveniente de la estructura de WaaG, una glucosiltransferasa de *E. coli*, implicada en la síntesis de LPS (código PDB *Protein Data Bank*: 2IW1). Para el modelado de LpcC se agregó el ligando GDP-Man que proviene de MshA, una glicosiltransferasa de *Corynebacterium glutamicum* involucrada en la biosíntesis de micotioles (código PDB *Protein Data Bank*: 3C4Q).

III-8.1. Búsqueda de los moldes más probables para RfaC

Al igual que para LpsB y LpcC, la secuencia de aminoácidos de RfaC fue alineada y comparada con secuencias de proteínas de estructuras conocidas depositadas en el servidor HHpred. Se seleccionaron dos heptosiltransferasas: WaaC y WaaF de *E. coli*. Ambas enzimas están involucradas en la síntesis del LPS, la primera cataliza la adición de la primera heptosa al precursor Kdo₂-lípidos IV_A, y WaaF deposita la segunda, sobre la heptosa depositada por WaaC (Raetz & Whitfield, 2002). WaaC presenta 40% de identidad con RfaC y E-value $5e^{-55}$; y WaaF 19% de identidad y E-value $2.7e^{-46}$.

III-9. Alineamientos de secuencias de glicosiltransferasas

Para analizar el grado de conservación a nivel de secuencia de aminoácidos entre las glicosiltransferasas en estudio se llevaron a cabo alineamientos múltiples de sus secuencias aminoacídicas. Como resultado de dichos alineamientos se desprenden dos grupos de glicosiltransferasas, las hexosiltransferasas y heptosiltransferasas. El primero agrupa a LpsB de *S. meliloti* y LpcC de *R. leguminosarum*; y el segundo a RfaC de *M. loti* (Figura 51 y 52 respectivamente).

III-9.1. Alineamientos de Hexosiltransferasas

Para determinar los residuos aminoacídicos que podrían estar formando parte del sitio activo de LpsB de *S. meliloti* y LpcC de *R. leguminosarum*, se alinearon las secuencias de las hexosiltransferasas que fueron utilizadas como moldes para obtener los modelos tridimensionales (véase apartado III-8). Dichos moldes fueron 2JJM de *Bacillus anthracis*, PimB, PimA y MshA de *Corynebacterium glutamicum* y WaaG de *E. coli*. Las estructuras tridimensionales de estas glicosiltransferasas fueron determinadas por cristalografía y difracción de rayos X. Además en PimB, PimA, MshA y WaaG fueron descritos los residuos que forman parte del sitio catalítico (Ruane *et al.*, 2008; Vetting *et al.*, 2008; Batt *et al.*, 2010).

Al analizar el alineamiento de los moldes, (Figura 51) puede observarse que en todas las hexosiltransferasas, la mayoría de los residuos que interactúan con sus respectivos ligandos y que están formando parte del sitio activo (residuos resaltados con

asteriscos) se encuentran conservados. Estos son: Gly entre las posiciones 20-30, Lys entre las posiciones 230-240, un *cluster* formado por Glu, Ser, Phe, Gly, Ile/Leu y Val entre las posiciones 320-330, y Glu entre los residuos 330 y 340.

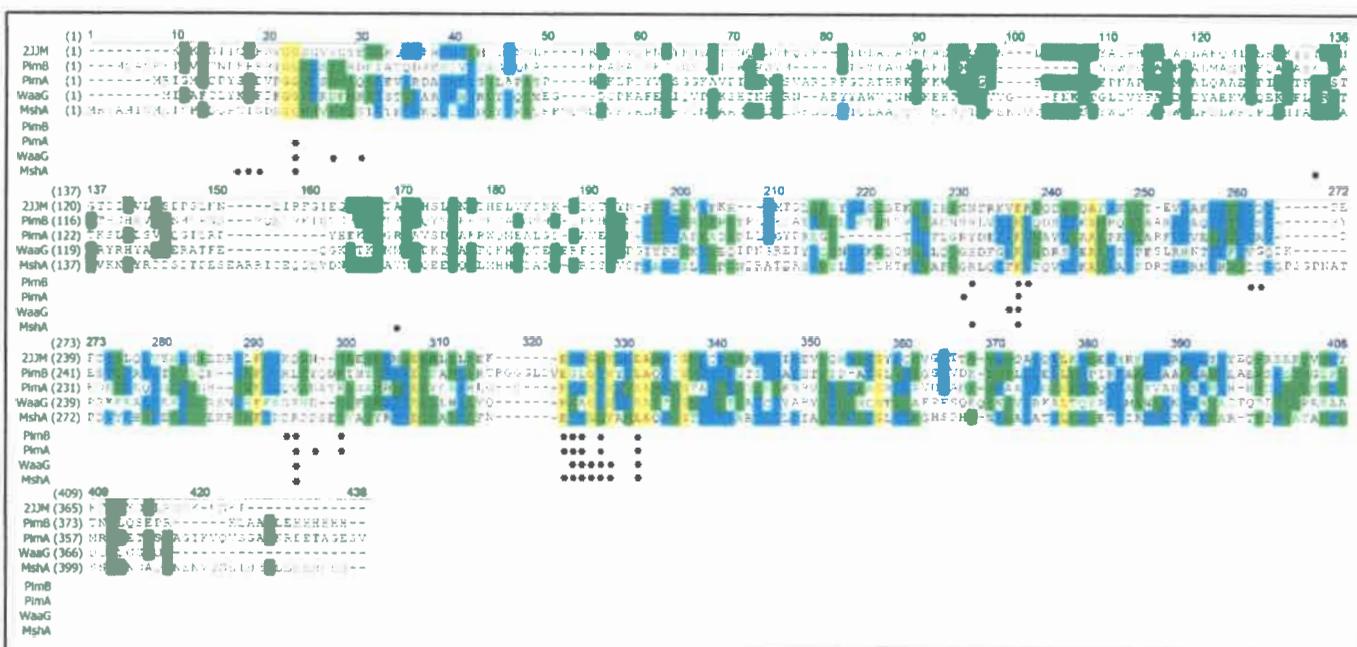


Figura 51. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de hexosiltransferasas utilizadas como moldes para determinar la posible estructura de LpsB y LpcC. 2JJM: Glicosiltransferasa con función desconocida de *Bacillus anthracis*. PimB y PimA: Manosiltransferasas de *C. glutamicum*. WaaG: Glucosiltransferasa de *E. coli*. MshA: Glicosiltransferasa de *C. glutamicum*. Los asteriscos (*) representan los residuos que forman el sitio activo. Los Alineamientos se llevaron a cabo con la aplicación Align X, componente programa Vector NTI Advance 11.5, Invitrogen.

Por otra parte se alinearon las secuencias LpsB de *S. meliloti* y LpcC de *R. leguminosarum*, *A. tumefaciens*, *B. japonicum*, *B. melitensis* y *B. henselae*, y se observó la presencia de varios bloques altamente conservados (Figura 52).

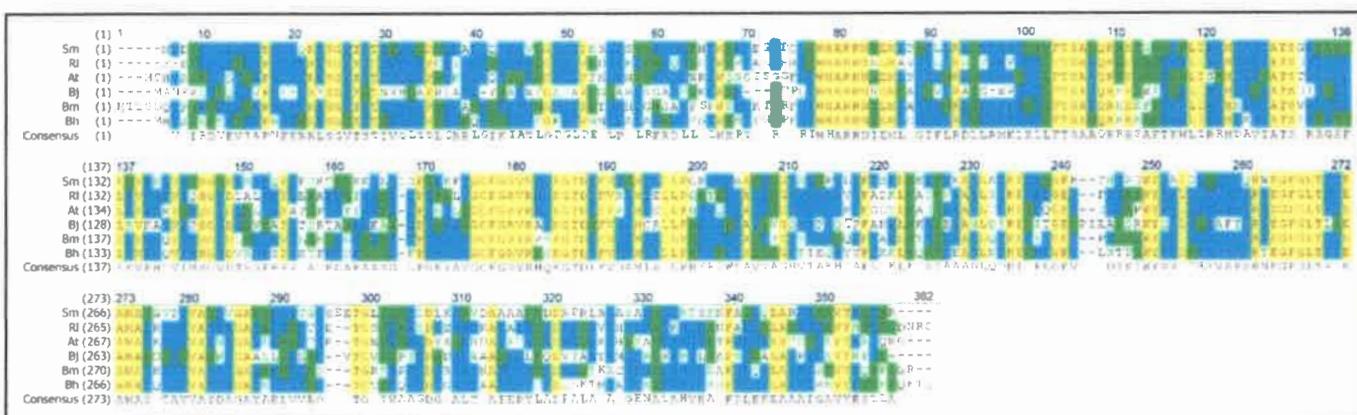


Figura 52. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de hexosiltransferasas involucradas en la síntesis del core del LPS. Sm: LpsB de *S. meliloti*; Ri: LpcC de *R. leguminosarum*; At: LpcC de *A. tumefaciens*; Bj: LpcC de *B. japonicum*, Bm: LpcC de *B. melitensis*, Bh: LpcC de *B. henselae*.

Para determinar si dichos bloques conservados se corresponden con los residuos catalíticos presentes en las glicosiltransferasas con estructura resuelta se generó una secuencia consenso a partir del alineamiento mostrado en la Figura 52, el cual fue comparado con las secuencias de 2JJM, PimB, PimA, MshA WaaG (Figura 53).

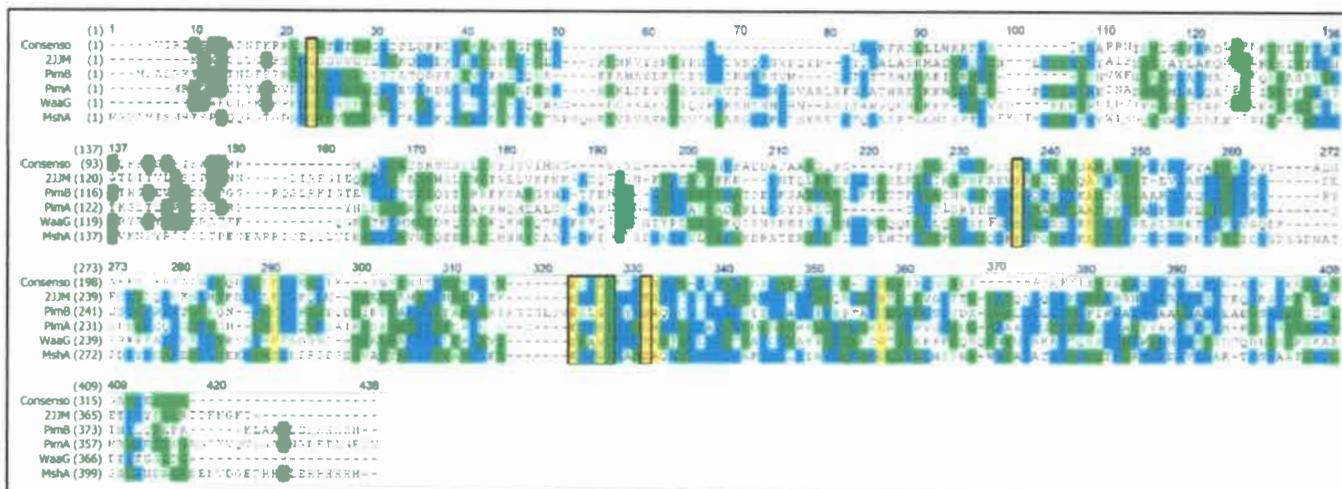


Figura 53. Alineamiento múltiple de la secuencia consenso de aminoácidos de hexosiltransferasas de Rhizobiales comparada con las secuencias utilizadas como moldes para determinar la estructura de LpsB y LpcC. Consenso: Secuencia consenso producto del alineamiento de hexosiltransferasas de rizobios. 2JJM: Glicosiltransferasa con función desconocida de *Bacillus anthracis*. PimB y PimA: Manosiltransferasas de *C. glutamicum*. WaaG: Glucosiltransferasa de *E. coli*. MshA: Glicosiltransferasa de *C. glutamicum*.

En la Figura 53 se puede observar que la mayoría de los residuos que conforman el sitio catalítico descrito en las glicosiltransferasas cuya estructura ha sido resuelta, también se mantienen conservados en las hexosiltransferasas implicadas en la síntesis de LPS de rizobios. Este resultado permite inferir que dichos residuos también conformarían el sitio activo de las hexosiltransferasas de los rizobios. Estos residuos son Gly entre las posiciones 20-30, Lys entre 230-240, un *cluster* formado por Glu, Gly, Phe, Gly y Leu entre las posiciones 320-330 y Glu entre 330-340.

En la Tabla 11 se resumen los residuos que forman los sitios activos de las hexosiltransferasas moldes y su interacción las distintas subunidades del ligando (Nucleótido-Azúcar).

PimB	Interactúa	PimA	Interactúa	WaaG	Interactúa	MshA	Interactúa
		Gly 16	Fosfato	Gly 15	Fosfato	Gly 16	Fosfato/Uracilo
Lys 211	Fosfato	Lys 202	Fosfato	Lys 209	Fosfato	Lys 236	Fosfato
Glu 290	Man	Glu 274	Man			Glu 316	GlcN
Gly 291	Man	Ser 275	Man	Ala 282	Glc	Ser 317	GlcN
Leu 292	Man	Phe 276	Man	Ala 283	Glc	Phe 318	GlcN
Ile 294	Man	Ile 278	Man	Gly 284	Glc	Gly 319	GlcN
				Ile 285	Fosfato	Leu 320	Fosfato
Glu 298	Rib	Glu 282	Rib	Glu 289	Rib	Glu 234	Rib

Tabla 11. Aminoácidos del sitio activo de hexosiltransferasas con estructura resuelta y la interacción con sus correspondientes ligandos. PimB y PimA: Manosiltransferasas de *C. glutamicum*. WaaG: Glucosiltransferasa de *E. coli*. MshA: Glicosiltransferasa de *C. glutamicum*. Resumen de Batt *et al.*, 2010; Guerin *et al.*, 2007; Ruane *et al.*, 2008; Vetting *et al.*, 2008.

Por lo observado en alineamiento de la Figura 53 y la Tabla 11, se pueden inferir los posibles residuos del sitio activo de LpsB y LpcC y sus posibles interacciones con sus respectivos ligandos. Esto nos lleva a suponer que la Gly (20-30) y la Lys (230-240) interaccionarían con algunos de los grupos fosfatos del ligando. Por otra parte, el *cluster* (320-330) estaría interactuando con el azúcar (ya sea Man o Glc); y por último el Glu (330-340) interaccionaría con la ribosa del ligando.

Como se muestra en la Tabla 11, el residuo de Gly que en LpsB y LpcC ocupan la posición 20; y el residuo de Lys 180 en LpsB y Lys 179 en LpcC, estarían interactuando con el fosfato distal del nucleótido-azúcar. Esta interacción del ligando con residuos básicos estabilizan al sustrato dentro del bolsillo de unión de la proteína. El residuo de Lys junto a otros residuos podría estar neutralizando la carga negativa de los grupos fosfato. Una mutación en la Lys 211 de la glicosiltransferasa PimB de *M. tuberculosis*, causa una disminución en la actividad de la enzima (Buschiazzo *et al.*, 2004; Guerin *et al.*, 2007; Batt *et al.*, 2010).

El motivo comprendido entre el Glu 257 y el Glu 265 en LpsB y entre el Glu 256 y el Glu 264 en LpcC es denominado motivo EX₇E. Se ha sugerido que este motivo es característico de las glicosiltransferasas con mecanismo catalítico por retención (véase apartado III-1.1 (Kapitonov & Yu, 1999; Kostova *et al.*, 2003). Se ha reportado que en la manosiltransferasa WbdA de *E. coli*, una mutación puntual en el primer residuo de Glu, provoca la pérdida de la actividad enzimática, en cambio una mutación puntual en el segundo Glu no resulta en cambios significativos en la actividad de la enzima (Greenfield *et al.*, 2012). En concordancia con lo anteriormente mencionado, la manosiltransferasa

AceA de *Acetobacter xylinum* también posee el dominio EX₇E. Una mutación en el primer residuo Glu del mencionado dominio, produce una marcada disminución de la actividad enzimática, tanto *in vitro* como *in vivo*. A su vez una mutación en el segundo residuo de Glu produce una leve disminución en la actividad de la enzima (Abdian *et al.*, 2000).

III-9.2. Alineamientos de Heptosiltransferasas

Para el caso de las heptosiltransferasas se pretende generar un modelo tridimensional y predecir los posibles residuos del sitio activo de la heptosiltransferasa RfaC de *M. loti*.

Las dos proteínas utilizadas como molde fueron WaaC y WaaF de *E. coli*, y solamente en la primera se describieron los residuos del sitio activo y su interacción con el ligando (en este caso es ADP-2F-Heptosa) (Grizot *et al.*, 2006).

En esta ocasión al tratarse solamente de dos moldes y una sola glicosiltransferasa a ser analizada, se alinearon las tres secuencias de manera conjunta (Figura 54).

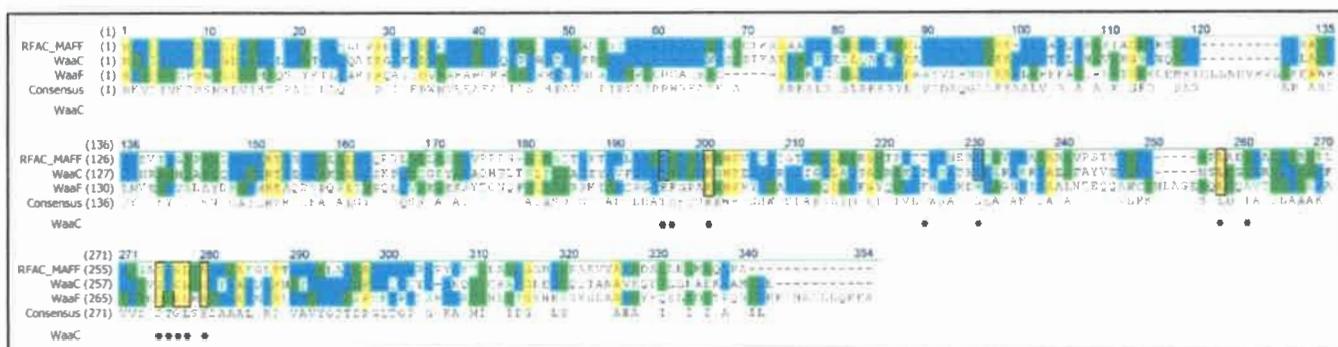


Figura 54. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de heptosiltransferasas de estructura resuelta y RfaC de *M. loti*. RFAC_MAFF: RfaC de *M. loti*; WaaC: WaaC de *E. coli*; WaaF: WaaF de *E. coli*. Los asteriscos (*) representan a los residuos que forman el sitio activo en una de las proteínas utilizadas como molde. Residuos recuadrados: residuos que posiblemente formen parte del sitio activo de RfaC.

Al igual que en la Figura 51, se señalan con asteriscos los residuos que componen el sitio activo de WaaC de *E. coli*. Luego de alinear estas tres secuencias, se puede observar que varios residuos se mantienen conservados, incluso algunos de los que forman parte del sitio activo de WaaC. En vista de los resultados es posible suponer que estos residuos también formarían parte del sitio activo de RfaC de *M. loti*. En la Tabla 12 se muestran los aminoácidos de WaaC y las subunidades del ligando con las que interaccionan.

WaaC	Interactúa:
Thr 187	Fosfato
Lys 192	Fosfato
Glu 222	Rib
Leu 244	Adenina
Asp 261	Hep
Thr 262	Fosfato
Gly 263	Fosfato
Leu 264	Adenina
His 266	Hep

Tabla 12. Aminoácidos del sitio activo de la heptosiltransferasa WaaC y la interacción con las subunidades de su ligando. WaaC: WaaC de *E. coli*. Resumen de Grizot *et al.* (2006).

En base a los resultados del anterior alineamiento y a lo descripto por Grizot *et al.* (2006) se podría inferir las posibles interacciones de los residuos de RfaC con su respectivo ligando (se asume que se trataría de ADP-Heptosa). La adenina heterocíclica posiblemente se ubique en un bolsillo hidrofóbico formado por pequeños residuos hidrofóbicos tales como Leu 242, Leu 262 e Ile 245. Por su parte la ribosa podría estar interactuando con el Glu 220. Este residuo de Glu está presente en la mayoría de las GT-B, y se cree que es crucial para unir específicamente a la ribosa. Por ejemplo, las glicosiltransferasas GtfA y GtfD, que se unen a TDP- desoxirribosa, no poseen este residuo glutamato (Mulichak *et al.*, 2003; Mulichak *et al.*, 2004). En cuanto a los grupos fosfato, la Thr 185 y la Thr 260 estarían interactuando con el α fosfato y la Gly 261 con el β fosfato. En algunas heptosiltransferasas como WaaC, WaaF y WaaQ se encuentra un motivo estrictamente conservado [D(S/T)(G/A)XXH] el cual comprende en RfaC de *M. luti* los residuos Asp 259, Thr 260, Gly 261 e His 264 que interactúan con la heptosa, (Mamat *et al.*, 2011).

III-10. Modelado de LpsB

Como se citó anteriormente, a partir de las búsquedas en las bases de datos se encontraron varias proteínas que podrían ser utilizadas como molde. Si bien todas presentaban bajos porcentajes de identidad, se seleccionaron a PimB y 2JJM, la primera presenta 22% de identidad y E-value $5e^{-50}$; y la segunda, 20% de identidad y E-value $2.4e^{-48}$. A partir de los alineamientos producidos por HHpred se generaron dos modelos independientes para LpsB, uno utilizando como molde a la glicosiltransferasa PimB y

otro a 2JJM (Figura 55). Dichos modelos se realizaron utilizando el programa Modeller 9.14 (Sali & Blundell, 1993) y fueron visualizados con el programa Chimera 1.6.2 (Pettersen *et al.*, 2004).

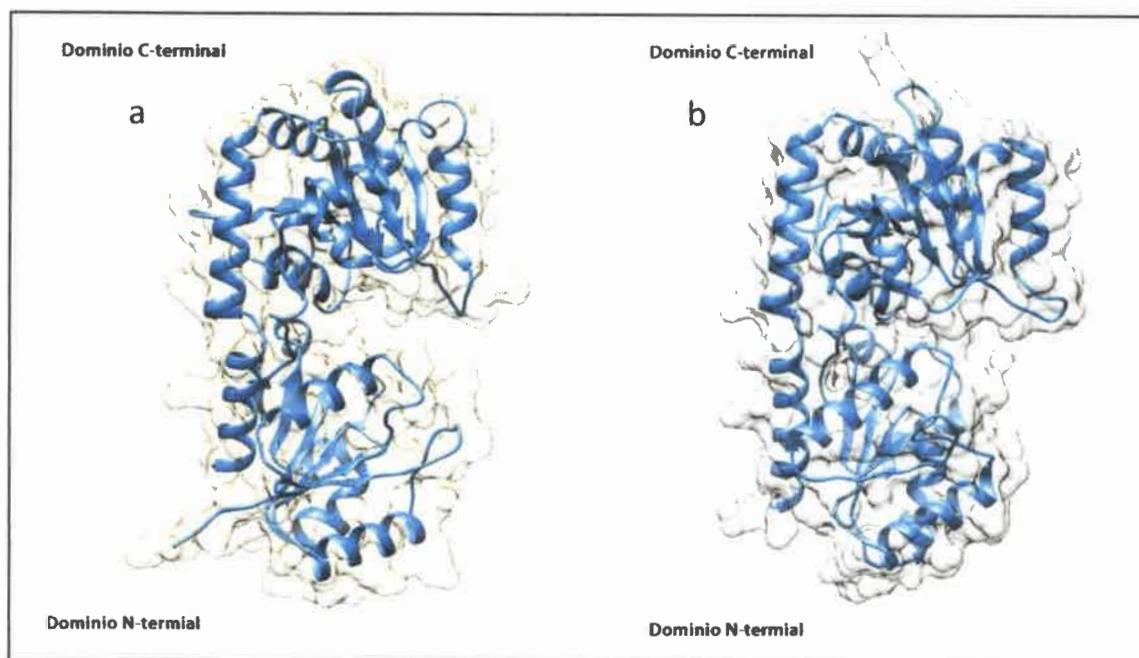


Figura 55. Modelado por homología de LpsB. a- Modelo de LpsB utilizando como molde PimB. b- Modelo de LpsB utilizando como molde 2JJM.

En la Figura 55 puede observarse que los dos modelos generados de LpsB, poseen, al igual que las glicosiltransferasas de la familia B (GT-B), los dos dominios (N- y C-terminal) separados por una gran hendidura. Ambos modelos fueron evaluados con el servidor ModEval (*Model Evaluation Server Results*), obteniéndose valores RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de 4.898Å para el modelo donde se utilizó como molde a PimB, y 3.771 Å para el modelo que utilizó a 2JJM.

Posteriormente, los dos modelos obtenidos fueron utilizados para realizar un alineamiento múltiple, para ello se utilizó el programa MAMMOTH-mult 1.0 (Lupyan *et al.*, 2005). En base a este alineamiento múltiple se modeló LpsB utilizando nuevamente el programa Modeller 9.11. Además se adicionó como ligando una molécula de UDP-Glc proveniente de la glicosiltransferasa WaaG de *E coli* Figura 56.

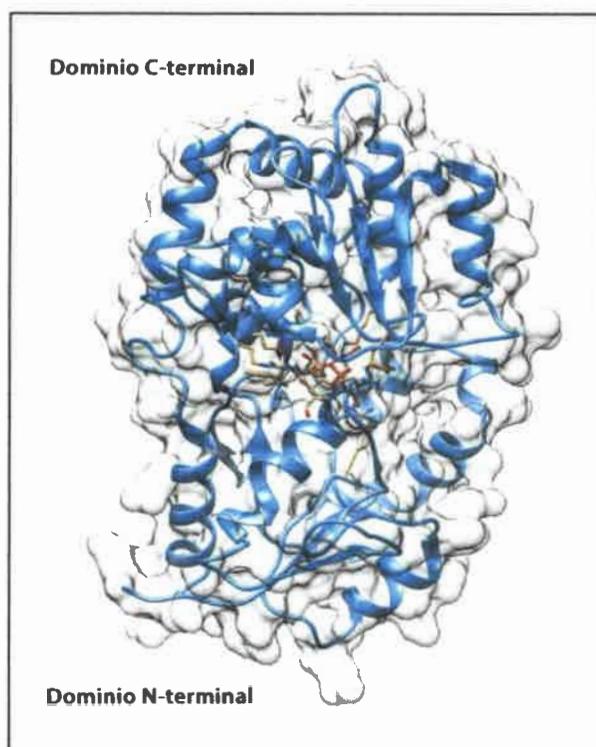


Figura 56. Modelado por homología de LpsB. Posible estructura de LpsB utilizando como molde PimB y 2JJM. Ligando UDP-Glc de WaaG.

En la Figura 56 puede observarse la posible localización del ligando UDP-Glc. Dicho ligando se ubica en la hendidura que separa a los dominios N- y C-terminal. Este modelo fue evaluado con el servidor ModEval, obteniéndose un valor RMSD de 5,95. Si bien este valor sugiere que el modelo presenta errores, nos da una pauta de su estructura aproximada, como también la posible ubicación del sitio activo.

Además como lo muestra la Figura 57 los residuos que posiblemente estén formando el sitio activo se ubican principalmente en el dominio C-terminal y próximo a la hendidura. En dicha figura se han señalado dichos residuos del sitio catalítico de LpsB (véase apartado III. 9.1).

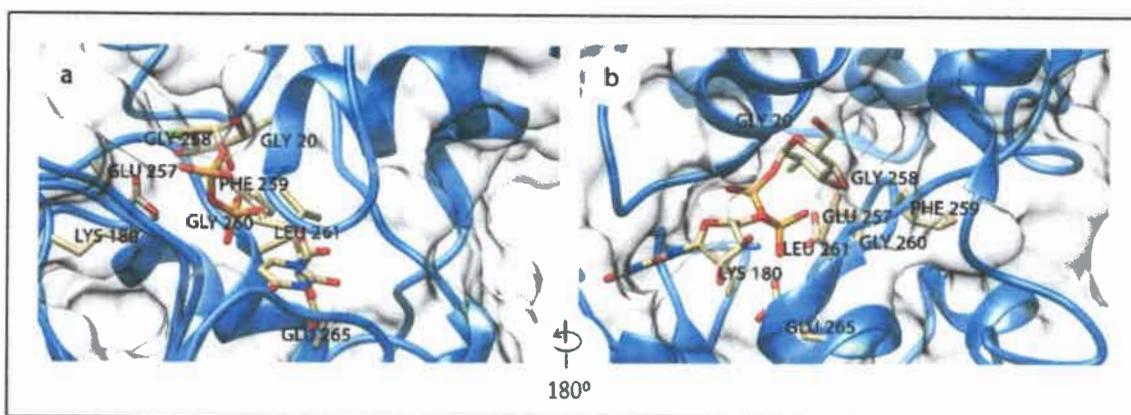


Figura 57. Vista parcial de la región que posiblemente pertenezca al sitio catalítico de LpsB. Se destacan los residuos conservados y UDP-Glc. Gly 20 y Lys 180 se encuentran próximos al fosfato distal, Glu 257, Gly 258, Phe 259 y Gly 260 posiblemente interactúen con la Glucosa del UDP-Glc. Leu 261 y Glu 265 estarían interactuando con el fosfato proximal y la Rib respectivamente

III-10.1. Generación de modelo *ab initio* de LpsB

Frente al inconveniente de poseer moldes con baja identidad para los modelados anteriores, también se generó la estructura de LpsB utilizando modelado *ab initio*. Para ello se utilizó el servidor I-TASSER (*Iterative Treading ASSEMBly Refinement algorithm*) (Zhang, 2008). El mejor modelo generado posee un valor RMSD 5,7 y un C-score 0,38 (los valores de C-score se encuentran en el rango [-5 a 2]).

Al superponer la estructura generada con el programa Modeller donde se utilizó como molde a PimB y 2JJM, con la generada *ab initio*; se puede observar que ambas estructuras son muy similares, principalmente en el dominio C-terminal. En las glicosiltransferasas de la familia B, el dominio C-terminal se encuentra más conservado, ya que en la mayoría de los casos es en este dominio donde se une el nucleótido-azúcar (Figura 58).

Como ocurre con glicosiltransferasas que actúan sobre aceptores unidos a las membranas plasmáticas (PimA, MurG, WaaC), existe una disimetría de cargas entre su dominio N- y C-terminal. Al analizar la secuencia de LpsB con la herramienta Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/) (Bjellqvist *et al.*, 1994), se encontró que LpsB también posee dicha disimetría de cargas con un punto isoeléctrico teórico en el dominio N-terminal de 11,71 (aa 1-138), y un pI de 5,46 en el dominio C-terminal (152-351). La naturaleza alcalina del dominio N-terminal podría favorecer la interacción con las cargas negativas de la membrana en el momento de la catálisis (Guerin *et al.*, 2007; Ha *et al.*, 2001; Grizot *et al.*, 2006).

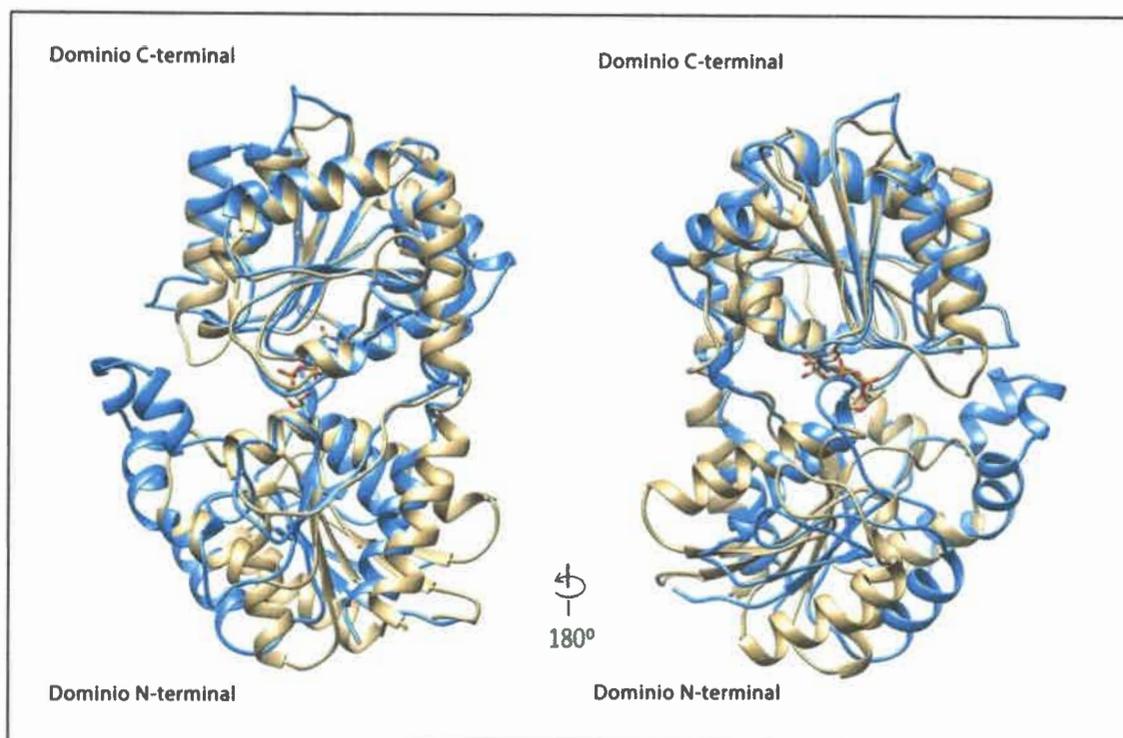


Figura 58. Superposición de dos modelos de LpsB. Azul: modelo generado con Modeller utilizando como molde 3OKP y 2JJM. Bronce: modelo generado *ab initio*.

III-11. Modelado de LpcC

Al igual que con LpsB, luego del alineamiento con HHpred, también se seleccionaron como moldes a las glicosiltransferasas PimB y 2JJM, ambas presentaron una identidad del 19% y el valor de E-value fue $6.1e^{-53}$ y E-value $2.4e^{-49}$ respectivamente. A diferencia de lo obtenido con LpsB, en este caso la identidad de los respectivos moldes es aún menor.

A partir de los alineamientos producidos por HHpred, se generaron dos modelos independientes para LpcC, uno utilizando como molde a la glicosiltransferasa PimB y otro a 2JJM. Ambos modelos, al igual que con LpsB se realizaron utilizando el programa Modeller 9.14 y visualizados con Chimera 1.6.2.

En la figura Figura 59 puede observarse que los dos modelos generados de LpcC, similar a lo obtenido para LpsB y las glicosiltransferasas de la familia B (GT-B), poseen los dominios N- y C-terminal separados por una hendidura. Ambos modelos fueron evaluados con el servidor ModEval (*Model Evaluation Server Results*), obteniéndose valores RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de 7.959 Å para el modelo donde se utilizó como molde a PimB, y 6.750 Å para el modelo que utilizó a 2JJM. Estos valores nos

indican que los modelos son menos confiables que los obtenidos para LpsB, lo cual posiblemente se deba a la menor identidad entre LpcC y los moldes utilizados.

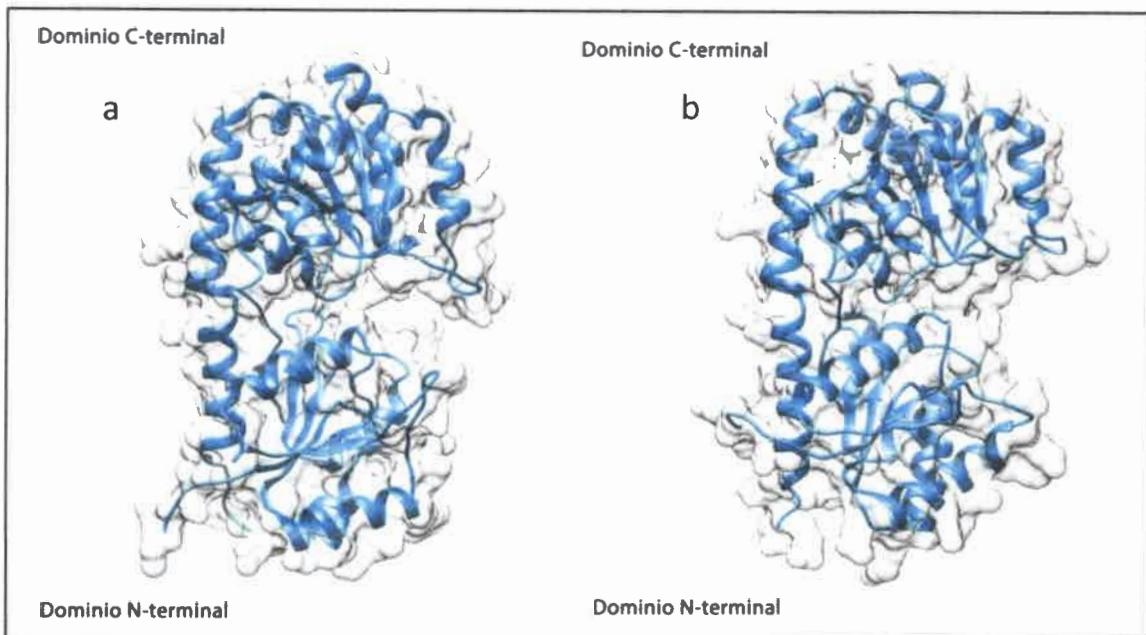


Figura 59. Modelado por homología de LpcC. a- Modelo de LpcC utilizando como molde PimB. b- Modelo de LpsB utilizando como molde 2JJM.

Posteriormente, los dos modelos obtenidos fueron utilizados para realizar un alineamiento múltiple, utilizando el programa MAMMOTH-mult 1.0 (Lupyan *et al.*, 2005). En base a este alineamiento se modeló LpcC utilizando nuevamente el programa Modeller 9.11, y como molde a PimB y 2JJM. Además se adicionó como ligando una molécula de GDP proveniente de la glicosiltransferasa PimA de *Mycobacterium smegmatis*.

Al igual que para el modelo de LpsB, en la Figura 60 se observa la posible localización del ligando GDP, el cual se ubica en la hendidura que separa entre sí a los dominios N- y C-terminal.

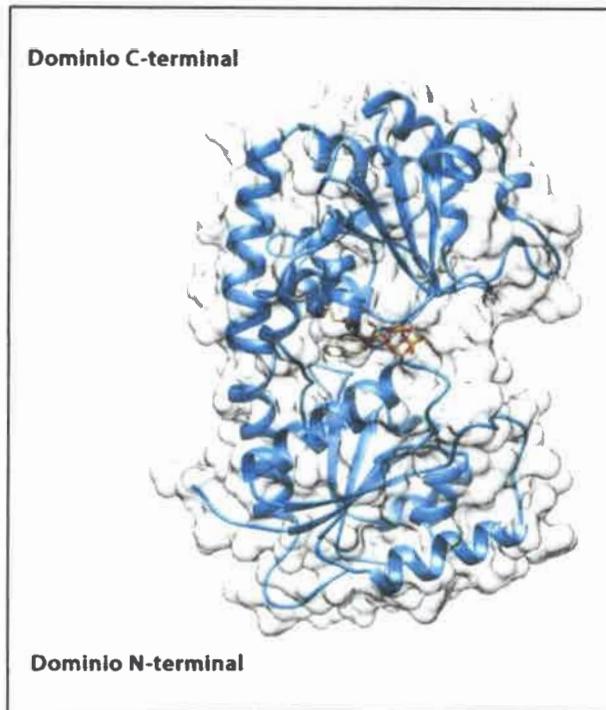


Figura 60. Modelado por homología de LpcC. Posible estructura de LpcC utilizando como molde PimB y 2JJM. Ligando GDP de PimA.

En la Figura 61 se señalaron los residuos que según lo predicho en el apartado III. 9.2 se consideran que podrían estar formando parte del sitio activo de LpcC.

Aunque el modelo obtenido no presenta alta confiabilidad, nos da una pauta de la estructura aproximada de LpcC, además de la posible localización y composición del sitio activo.

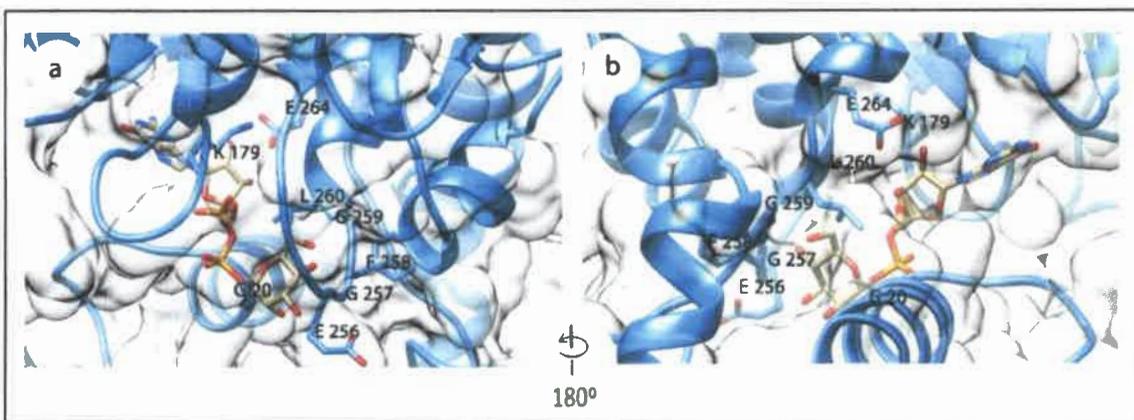


Figura 61. Vista parcial de la región que posiblemente pertenezca al sitio catalítico de LpcC. Se destacan los residuos conservados y GDP. Gly 20 se encuentran próximos al fosfato distal, de la misma manera se espera que la Lys 179 interactue con dicho fosfato, pero en este modelo no se encuentran próximos entre sí. Glu 256, Gly 257, Phe 258 y Gly 259 posiblemente interactúen con la Manosa del GDP-Man. Leu 260 y Glu 264 estarían interaccionando con el fosfato proximal y la Rib respectivamente

III-11.1. Generación de modelo *ab initio* de LpcC

Frente al inconveniente de poseer moldes con baja identidad para los modelados anteriores, también se generó la estructura de LpcC utilizando modelado *ab initio*. Para ello se utilizó el servidor I-TASSER (*Iterative Treading ASSEmbly Refinement algorithm*) (Zhang, 2008). El mejor modelo generado posee un valor RMSD 5,6 y un C-score 0,44 (los valores de C-score se encuentran en el rango [-5 a 2]).

Al superponer la estructura generada con el programa Modeller donde se utilizó como molde a PimB y 2JJM, con la generada *ab initio*; se puede observar que ambas estructuras son muy similares, principalmente en el dominio C-terminal. En las glicosiltransferasas de la familia B, el dominio C-terminal se encuentra más conservado, ya que en la mayoría de los casos es en este dominio donde se une el nucleótido-azúcar.

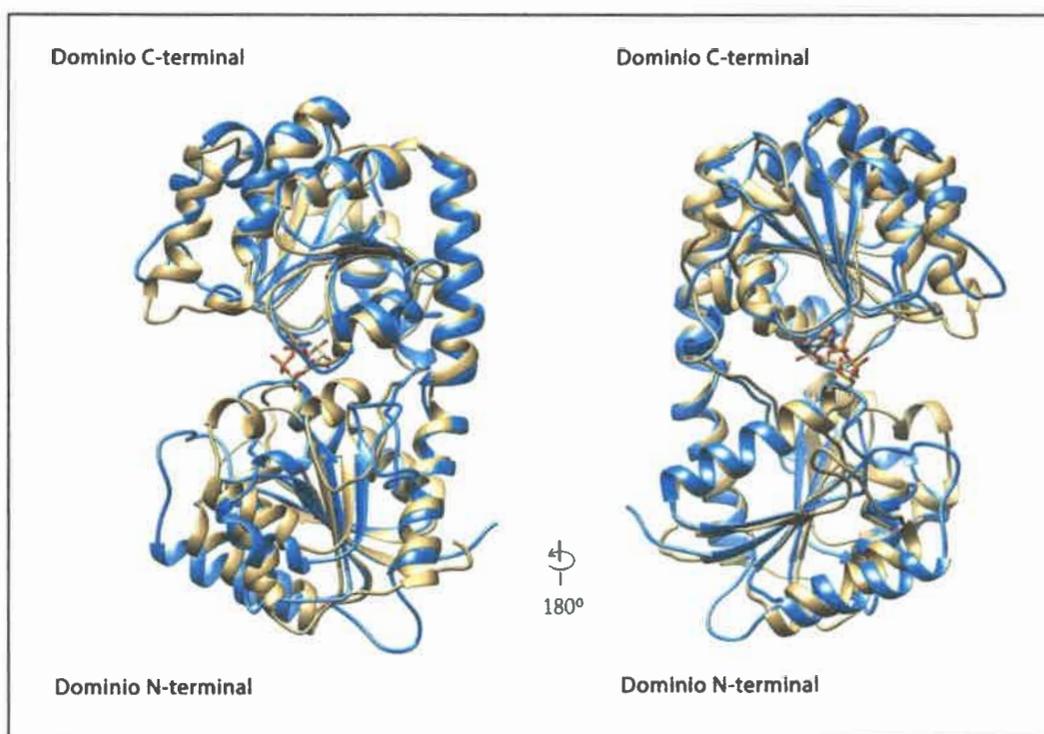


Figura 62. Superposición de dos modelos de LpcC. Azul: modelo generado con Modeller utilizando como molde 3OKP y 2JJM. Bronce: modelo generado *ab initio*.

Al igual que lo encontrado para LpsB, cuando se analizó la secuencia de LpcC con la herramienta Compute pI/Mw tool (Bjellqvist *et al.*, 1994), se encontró que esta enzima también posee dicha disimetría de cargas. Presentando un punto isoeléctrico teórico en el dominio N-terminal de 11,96 (aa 1-123), y un pI de 5,96 en el dominio C-terminal (168-353). Como se discutió en el apartado III-1. 3 la naturaleza alcalina del

dominio N-terminal podría favorecer la interacción con las cargas negativas de la membrana en el momento de la glicosilación.

III-12. Modelado de RfaC

Al igual que para LpsB y LpcC, la secuencia de aminoácidos de RfaC fue alineada y comparada con secuencias de proteínas de estructuras conocidas en el servidor HHpred. Se seleccionaron dos heptosiltransferasas: WaaC y WaaF de *E. coli*. Ambas enzimas están involucradas en la síntesis del LPS, la primera cataliza la adición de la primera heptosa al precursor Kdo₂-lípidio IV_A, y WaaF deposita la segunda, sobre la heptosa depositada por WaaC (Raetz & Whitfield, 2002). WaaC presenta 40% de identidad y E-value $5e^{-55}$, y WaaF 19% de identidad y E-value $2.7e^{-46}$. Para el modelado y visualización también se utilizaron los programas Modeller 9.14 y Chimera 1.6.2 respectivamente.

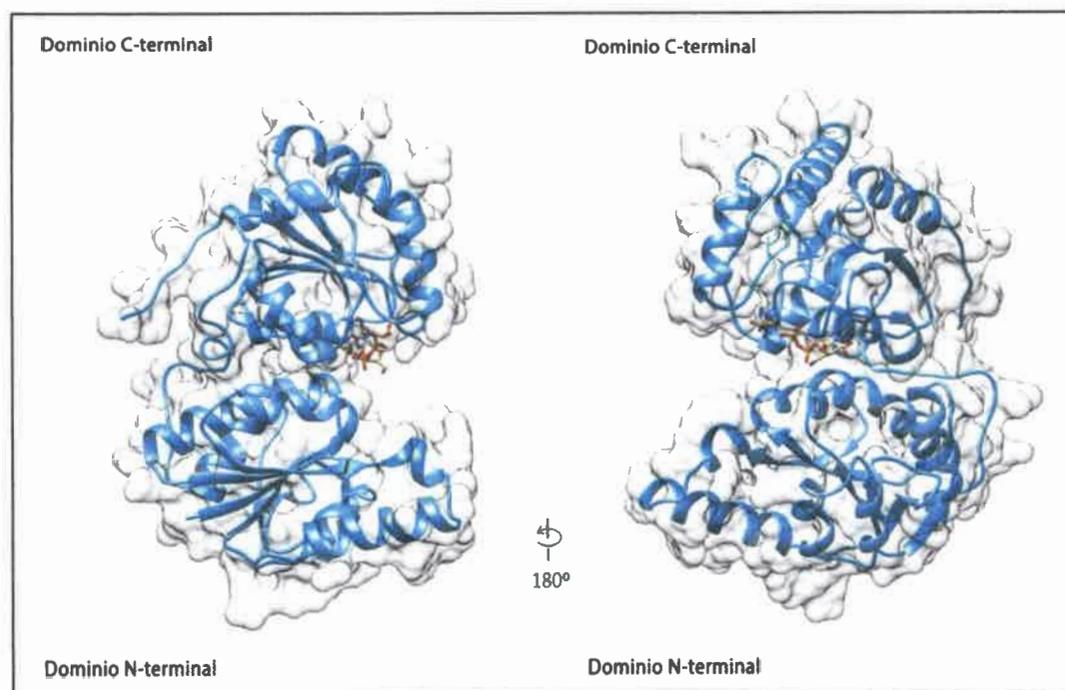


Figura 63. Modelado por homología de RfaC. Posible estructura de RfaC utilizando como moldes WaaC y WaaF. Ligando ADP-2F-Heptosa de WaaC.

En la Figura 63 se observa que el modelo generado de RfaC, igual a lo encontrado para LpsB, LpcC, y las glicosiltransferasas de la familia B (GT-B); poseen los dos dominios (N- y C- terminal) separados por una hendidura. Además, los residuos que posiblemente estén formando el sitio activo se ubican principalmente en el dominio C-

terminal y próximo a dicha hendidura. Este modelo también fue evaluado con el servidor ModEval, obteniéndose el valor RMSD de 4,378Å.

En la Figura 64 se señalan los residuos que según lo predicho en el apartado III-9.2, se consideran podrían estar formando parte del sitio activo de RfaC.

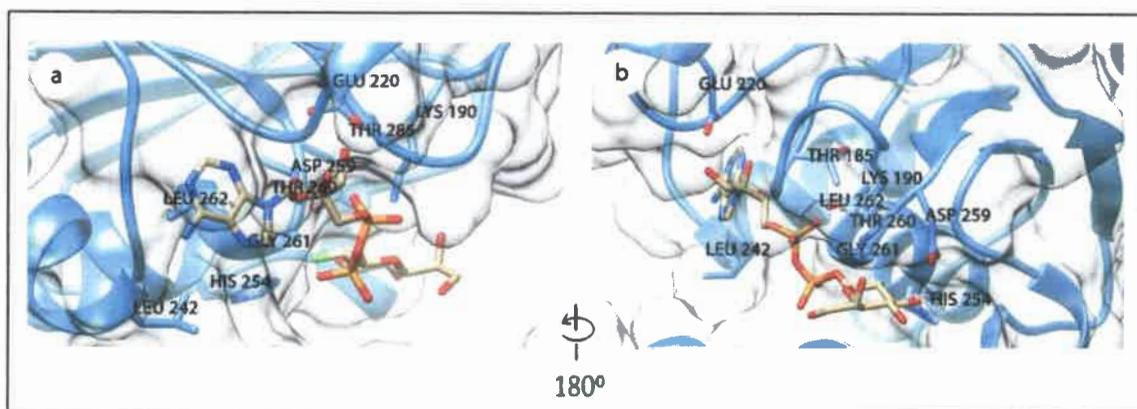


Figura 64. Vista parcial de la región que posiblemente conforme el sitio catalítico de RfaC. Se destacan los residuos conservados y ADP-Hep. Leu 242 y Leu 262 estarían formando parte de un bolsillo hidrofóbico donde se ubicaría la adenina heterocíclica. Glu 220 interactúa con la ribosa. Las Thr 185 y 260 posiblemente interaccionen con el fosfato α , y la Gly 261 con el fosfato β . Por otra parte los residuos Asp 259, Thr 260, Gly 261 e His 264 forman parte de el motivo [D(S/T)(G/A)XXH] que interactúa con la Hep.

III-12.1. Generación de modelo *ab initio* de RfaC

A diferencia de los modelos generados para LpsB y LpcC, en este caso el molde WaaC presenta una identidad del 40 % con RfaC, esto hace suponer que el modelo generado será más confiable. De igual manera se generó la estructura de RfaC utilizando modelado *ab initio*. Para ello se también utilizó el servidor I-TASSER. El mejor modelo generado posee un valor RMSD 2,9 y un C-score 1,72 (los valores de C-score se encuentran en el rango [-5 a 2]).

Al superponer la estructura generada con Modeller donde se utilizó como molde a WaaC y WaaF, con la generada *ab initio*; se observa que ambas estructuras son muy similares.

Al analizar la secuencia de RfaC con la herramienta Compute pI/Mw tool (Bjellqvist *et al.*, 1994), también se encontró que esta heptosiltransferasa posee disimetría de cargas. Presentando un punto isoeléctrico teórico en el dominio N- terminal de 10,00 (aa 1-151), y un pI de 6,07 en el dominio C-terminal (178-324). Y como se discutió para LpsB y LpcC, la naturaleza alcalina del dominio N-terminal podría favorecer la interacción con las cargas negativas de la membrana en el momento de la catálisis.

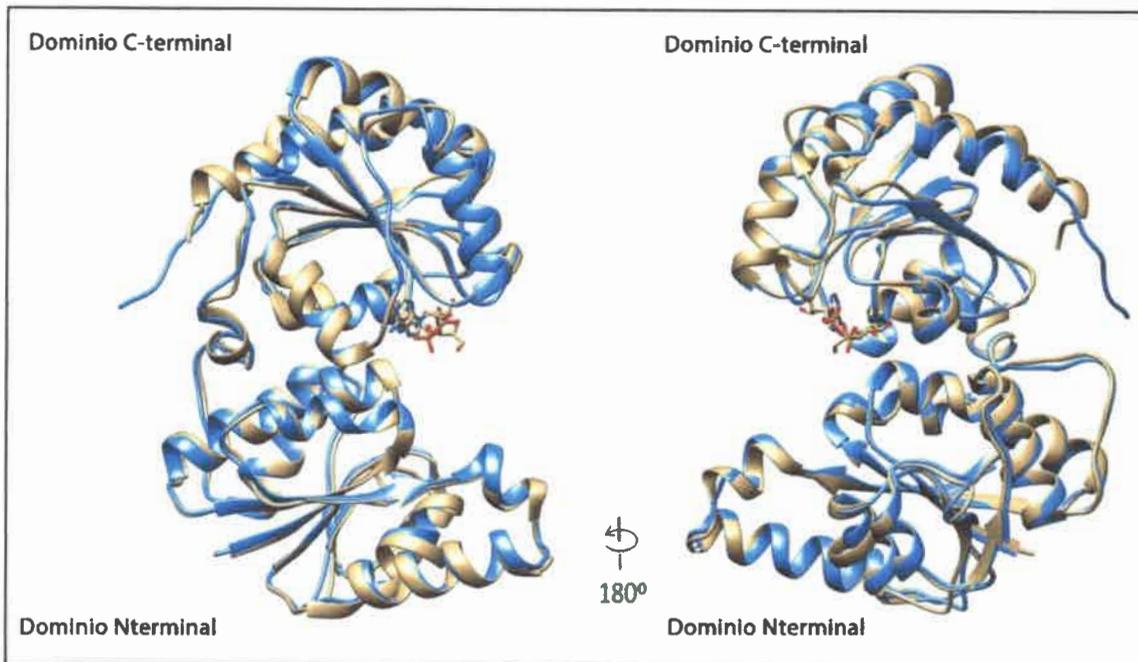


Figura 65. Superposición de dos modelos de RfaC. Azul: modelo generado con Modeller utilizando como molde WaaC y WaaF. Bronce: modelo generado *ab initio*.

III-13. Sobreexpresión de *lpsB*, *lpcC* y *rfaC*

Para cumplimentar con el objetivo correspondiente a la caracterización funcional de glicosiltransferasas involucradas en la síntesis del core de lipopolisacáridos, es necesario determinar *in vitro* las actividades enzimáticas de estas proteínas. Para lo cual resulta indispensable obtener estas glicosiltransferasas purificadas y en cantidades considerables.

A continuación se describe la sobreexpresión y purificación de estas enzimas.

III-13.1. Clonado y sobreexpresión de *lpsB*, *lpcC* y *rfaC* utilizando el sistema pET

En un primer intento no fue posible purificar a LpsB ni a LpcC utilizando el sistema IMPACT™-CN. Por consiguiente se decidió utilizar el sistema pET, ya que existen reportes exitosos de sobreexpresión de genes que participan en la biosíntesis de lipopolisacáridos utilizando dicho sistema (Leipold *et al.*, 2007; Grizot *et al.*, 2006; Yethon & Whitfield, 2001).

III-13.1.1. Clonado de *lpsB* en el vector de expresión pET28a+

Las secuencias de ADN codificante para *lpsB*, *lpcC* y *rfaC* de *S. meliloti*, *R. leguminosarum* y *M. loti*, respectivamente, fueron clonadas en el plásmido de sobreexpresión pET28a+. La expresión de dicho vector en células de *E. coli*, y frente a la inducción por IPTG, produce una proteína quimérica. Esta proteína recombinante corresponde a la proteína diana que lleva unida en su extremo N-terminal un péptido de seis residuos de Histidinas (*His-tag*). Los sitios de clonados para los tres genes fueron *Bam*HI y *Nde*I. Dicho clonado fue corroborado por digestión con enzimas de restricción y posteriormente por secuenciación. A continuación se describe la obtención del plásmido pJF340 (pET28a-*lpsB* de *S. meliloti*). De igual manera se obtuvieron los vectores pJF350, y pJF370 correspondientes a pET28a-*lpcC* de *R. leguminosarum* y pET28a-*rfaC* de *M. loti* respectivamente. Inicialmente un fragmento de ADN conteniendo la secuencia del gen *lpsB* de *S. meliloti* fue amplificado por PCR y posteriormente digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Nde*I, al igual que el plásmido pET28+.

Los productos resultantes de la digestión del plásmido y del producto de PCR fueron ligados y la mezcla resultante se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Posteriormente estas células fueron sembradas en placas conteniendo LB-agar en presencia de kanamicina. Las colonias resultantes fueron examinadas para determinar la presencia del plásmido recombinante. Para ello se purificaron plásmidos de dichas colonias y fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa. De este modo se seleccionaron aquellos plásmidos que presentaron menor movilidad electroforética en comparación al vector vacío pET28a+. En la Figura 66 puede observarse que los plásmidos con menor movilidad fueron los pertenecientes a las calles 3 y 14.

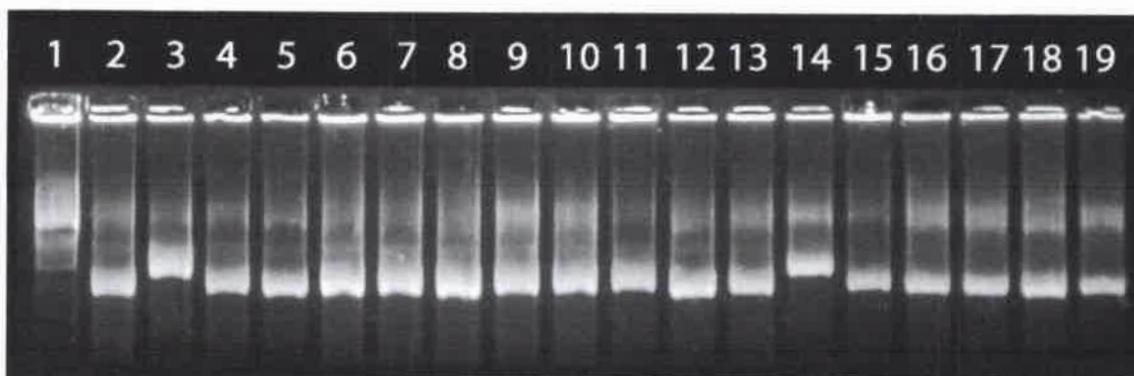


Figura 66. Electroforesis en geles de agarosa donde se muestra la movilidad de los posibles plásmidos recombinantes. 1: pET28a+ (vacío); 2-17: Plásmidos pET281+ que posiblemente contengan el gen *lpsB*.

Una vez identificados los plásmidos con menor movilidad, los mismos fueron digeridos con las mismas enzimas de restricción *Bam*HI y *Nde*I y los productos resultantes analizados mediante electroforesis en geles de agarosa.

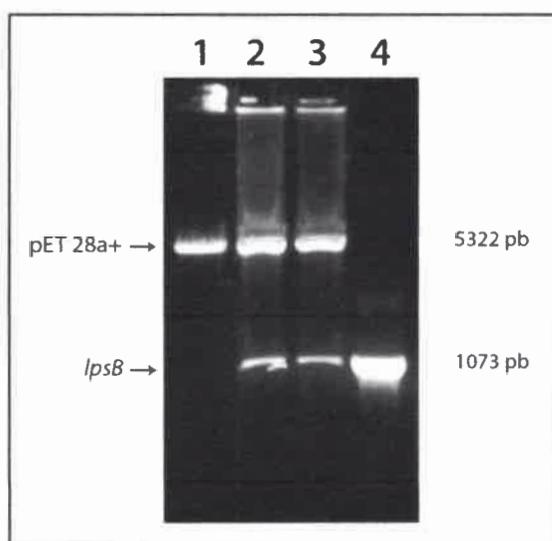


Figura 67. Análisis de restricción (*Bam*HI y *Nde*I,) de los vectores con menor movilidad mostrados en la Figura 66. 1: pET28a+ linealizado; 2 y 3: plásmidos pertenecientes a las calles 3 y 14 de la Figura 66; 4: *lpsB* amplificado por PCR.

Luego de corroborado el clonado del gen *lpsB* en el plásmido pET28a+, tanto por digestión como por secuenciación; el plásmido recombinante fue introducido en células de *E. coli* BL21 (DE3) mediante transformación.

III-13.1.2. Sobreexpresión de *lpsB* utilizando el sistema pET

En primera instancia se probaron dos condiciones diferentes de inducción, la primera fue a 20 °C durante toda la noche y la segunda a 30 °C, durante 3 h. Como puede

observarse en la Figura 68, en la condición de menor temperatura pero de mayor tiempo de inducción se obtuvo una mayor sobreexpresión (comparación entre las calles 2 y 3).

Luego de establecidas las condiciones de sobreexpresión, el siguiente paso fue determinar la solubilidad de la proteína de fusión. Para ello una alícuota del clarificado del producto de la ultracentrifugación fue analizada mediante SDS PAGE. En las calles 5 y 6 (comparando con la calle 4) de la Figura 68 se puede observar que una gran cantidad de la proteína recombinante se encuentra soluble.

Para determinar la proporción de la proteína quimérica en forma soluble con respecto a aquella que podría estar asociada a membrana; la fracción correspondiente al *pellet* obtenido por ultracentrifugación fue tratada con una solución de Tritón X-100 a una concentración final de 2% (v/v) durante una hora en agitación, y vuelto a ultracentrifugar. Una fracción de este sobrenadante fue analizada por SDS PAGE, y como se observa en las calles 8 y 9 de la Figura 68, las cantidades resolubilizadas son relativamente bajas en comparación con la fracción soluble (calles 5 y 6). Esto nos permite inferir que la mayoría de la proteína recombinante se encuentra soluble.

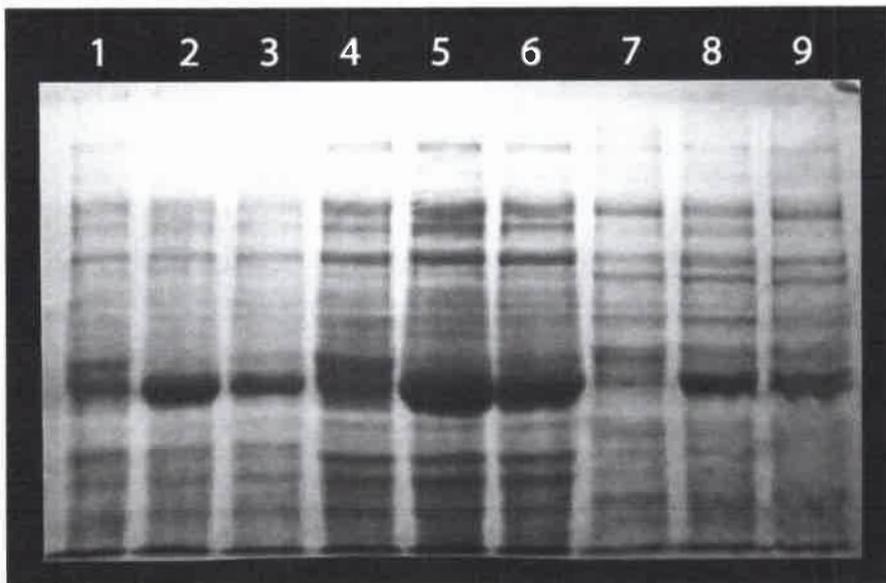


Figura 68. Determinación de solubilidad de 6XHis-LpsB: 1 Células sin inducir (células enteras); 2 Células inducidas a 20 °C toda la noche (células enteras); 3 Células inducidas a 30 °C durante 3 horas (células enteras); 4 Clarificado post ultracentrifugación (fracción citoplasmática) sin inducir; 5 Clarificado post ultracentrifugación (fracción citoplasmática) inducido a 20 °C; 6 Clarificado post ultracentrifugación (fracción citoplasmática) inducido a 30 °C; 7 Solubilizado de membranas (sobrenadante) sin inducir; 8 Solubilizado de membranas (sobrenadante) inducido a 20 °C; 9 Solubilizado de membranas (sobrenadante) inducido a 30 °C.

III-13.2 Purificación de LpsB por cromatografía de afinidad

Como se mostró en la Figura 68 la fusión 6XHis-LpsB se encuentra soluble en cantidades considerables. El siguiente paso fue la purificación de la misma. Para ello se utilizó una resina de níquel retenido en ácido nitrilotriacético (Ni-NTA). Como se describió anteriormente, la proteína LpsB tiene unido en su extremo N-terminal un hexapéptido de histidinas. Al pasar la muestra (clarificado) a través de una columna cargada con microesferas de agarosa que están recubiertas por Ni-NTA; estas proteínas recombinantes quedan fuertemente unidas a dicha resina. Por su parte, las proteínas unidas de manera inespecífica son eliminadas luego de sucesivos lavados; manteniéndose unida (no covalentemente) a la matriz de la resina solamente la proteína que posee fusionado el hexapéptido de histidina. Para liberar a la proteína de interés de la resina pueden seguirse dos procedimientos distintos, uno de ellos consiste en clivado por uso de proteasas (la proteína recombinante posee un sitio de reconocimiento de proteasa entre el hexapéptido y la proteína diana) que dará como resultado la liberación de la proteína sin el hexapéptido de histidina. El otro método consiste en eluir la fusión por el agregado de altas concentraciones de imidazol (el grupo funcional de la histidina es un anillo imidazol). En este último método, si bien la proteína diana sigue unida al hexapéptido de histidina, dicho péptido produce poca o ninguna interferencia en la función normal de la proteína purificada.

En este caso la purificación fue realizada en *batch* (véase apartado III-5.3). Luego de la elución con tres concentraciones crecientes de imidazol (100, 250 y 500 mM), una alícuota de las mismas fue analizada por SDS-PAGE. En la Figura 69 se observa que al eluir con 100 mM de imidazol se libera una cantidad relativa baja de la fusión 6XHis-LpsB; y al eluir con 250 mM la cantidad eluída es relativamente menor. En contraste la elución con 500 mM de imidazol resultó ser la más efectiva.



Figura 69. Purificación de LpsB. 1: Células inducidas (células enteras); 2: Lavado de resina posterior al cargado de la muestra; 3: Eluído con 100 mM de Imidazol; 4: Eluído con 250 mM de Imidazol; 5: Eluído con 500 mM de Imidazol.

III-13.3. Sobreexpresión de *lpcC* de *R. leguminosarum*

Similar a lo descrito para la sobreexpresión de *lpsB*, luego de ser clonada la secuencia de ADN que codifica para el gen *lpcC* en el plásmido pET 28a+, y corroborada por secuenciación, dicho plásmido recombinante fue introducido en *E. coli* BL21 (DE3) mediante transformación. Se probaron dos condiciones diferentes de inducción. La primera durante toda la noche a 20 °C y la segunda a 30 °C, durante 3 h. Al igual que para *lpsB*, la condición de menor temperatura pero de mayor tiempo de inducción resultó en una mayor sobreexpresión (imágenes de geles no mostradas).

Pese a obtenerse sobreexpresión de *lpcC*, en el momento de determinar su solubilidad, la misma no fue detectada en la fracción soluble. Este resultado concuerda con los estudios publicados por Kanipes *et al* (2003), donde se propone que esta proteína se podría encontrar asociada fuertemente a la membrana plasmática, o bien formando cuerpos de inclusión (Figura 70).

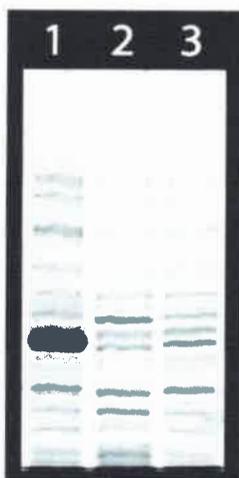


Figura 70. Sobreexpresión y purificación de LpcC. 1: Células inducidas (células enteras); 2: Células sin inducir (células enteras); 3: Clarificado post ultracentrifugación (fracción citoplasmática) inducido.

III-13.4. Sobreexpresión y purificación de RfaC por cromatografía de afinidad

Si bien en un principio se propuso determinar la actividad glicosiltransferasa de RfaC, pero frente a la imposibilidad de obtener un LPS truncado de *M. loti* (que pueda ser utilizado como aceptor), la mencionada actividad no fue determinada.

Una vez clonada la secuencia de ADN que codifica para *rfaC* de *M. loti* en el plásmido pET28a+; el vector recombinante fue introducido en *E. coli* BL21(DE3) mediante transformación. Las condiciones de expresión fueron las mismas utilizadas para la sobreexpresión de *lpsB*.

En la Figura 71a) puede observarse que la inducción de cultivo de *E. coli* a 20 °C durante toda la noche resulta en la obtención de cantidades mayores de la fusión 6XHis-RfaC. De la misma manera, luego del lisado de las células y la obtención del clarificado, se observa que esta fusión se encuentra en la fracción citoplásmica.

La purificación de la fusión 6XHis-RfaC se describe en el apartado III-13.2 La proteína fue eluída directamente con una concentración única de imidazol de 500 mM. En la Figura 71b) se visualiza que en estas condiciones es posible obtener cantidades considerables de la fusión purificada.

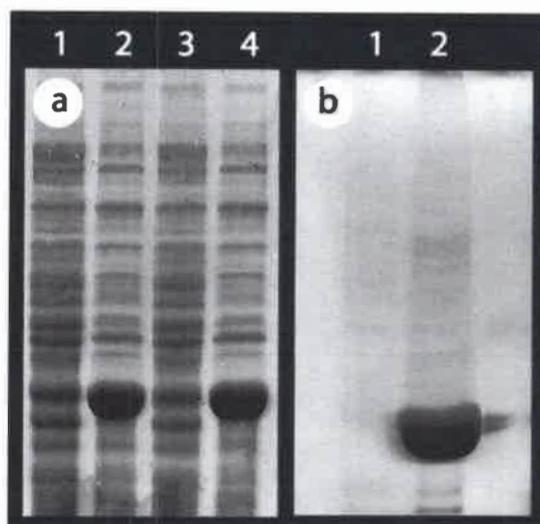


Figura 71. Sobreexpresión y purificación de RfaC: a- Determinación de solubilidad de 6XHis-RfaC. 1: Células sin inducir (células enteras); 2: Células inducidas a 20 °C toda la noche (células enteras); 3: Clarificado post ultracentrifugación (fracción citoplasmática) sin inducir; 4: Clarificado post ultracentrifugación (fracción citoplasmática) inducido a 20 °C. b- Purificación de RfaC. 1: Lavado de resina posterior al cargado de la muestra; 2: Eluido con 500 mM de Imidazol.

En resumen, se establecieron las condiciones óptimas para la sobreexpresión de *lpsB* de *S. meliloti* y *rfaC* de *M. loti*. Asimismo el hecho de contar con estas proteínas en grandes cantidades y puras, permitirán en un futuro determinar las estructuras de las mencionadas proteínas mediante estudios cristalográficos.

III-14. Determinación de actividad glicosiltransferasa *in vitro*

En el momento de determinar la cinética enzimática de LpsB nos encontramos que no existían protocolos previos para tal fin. Para LpsB, Kanipes *et al.* (2003) solamente determinaron la actividad de la enzima utilizando TLC (*Thin Layer Chromatography*), y consideramos que utilizar esta metodología para determinar la cinética de una reacción enzimática no es adecuada. Por otra parte Grizot *et al.* (2006) han descrito un método donde se determinó la cinética de reacción de WaaC de *E. coli*, esta metodología consiste en una reacción acoplada cuyo fundamento se describe a continuación: cuando un residuo de azúcar es incorporado al aceptor, libera el nucleótido di-fosfato (ADP), el cual es utilizado por la enzima piruvato quinasa dando como producto una molécula de nucleótido tri-fosfato (ATP) que es utilizada por la enzima luciferasa que en presencia de luciferina genera luz; y la intensidad de esta luminiscencia es cuantificada mediante fluorimetría. Este método está limitado solamente a reacciones que utilicen

como azúcar activado a moléculas de ADP-azúcar. Pero como se citó anteriormente LpsB y LpcC utilizan preferentemente UDP-Glc y GDP-Man respectivamente.

III-14.1. Determinación de actividad glucosiltransferasa de LpsB

En un principio se intentó determinar la actividad enzimática de LpsB purificada, para ello se utilizaron distintas concentraciones de enzima, precursor y UDP-Glc. En ninguna de estas condiciones se observó incorporación de [¹⁴C]Glc al precursor. Esta ausencia de actividad por parte de LpsB purificada puede deberse a que ésta enzima, como otras glucosiltransferasas implicadas en la síntesis de LPS se encuentran asociadas a la cara interna de la membrana plasmática y por consiguiente su actividad requiera de un entorno lipídico.

Frente a esta hipótesis, se decidió utilizar membranas de la cepa de *E. coli* que sobreexpresa a *lpsB*, como fuente de enzima. En el apartado III-13.1.2 se describió que luego de la sobreexpresión la mayor parte de LpsB se encuentra soluble en el citoplasma, pero aún una menor cantidad de esta proteína recombinante se encuentra asociada a las membranas. Al igual que Kanipes *et al.* 2003 consideramos que esta fracción es suficiente para llevar a cabo la determinación de la actividad enzimática.

Para ello, en la sobreexpresión de *lpsB* en *E. coli*, (véase apartado III-5.2), luego del paso de ultracentrifugación, en vez de descartar el *pellet* (que corresponde a las membranas celulares), éste fue resuspendido en 50 mM Tris base (pH 7,5) y fue utilizado en la reacción como fuente enzimática. De estas membranas se determinó la concentración de proteínas y se agregaron a la reacción a una concentración final de 0,1mg/ml (véase apartado III-6.).

Además, independientemente se utilizaron membranas de *S. meliloti* salvaje, las cuales también fueron resuspendidas en 50 mM Tris base (pH 7,5), pero en este caso, se agregaron a la reacción enzimática a una concentración final de 1mg/ml (10 veces más que para las membranas de *E. coli* sobreexpresando *lpsB*) similar a lo descrito por Kanipes *et al.* 2003.

En primera instancia, para determinar la velocidad inicial de la reacción, se evaluó la incorporación de [¹⁴C]Glc en diferentes tiempos (véase figura 72).

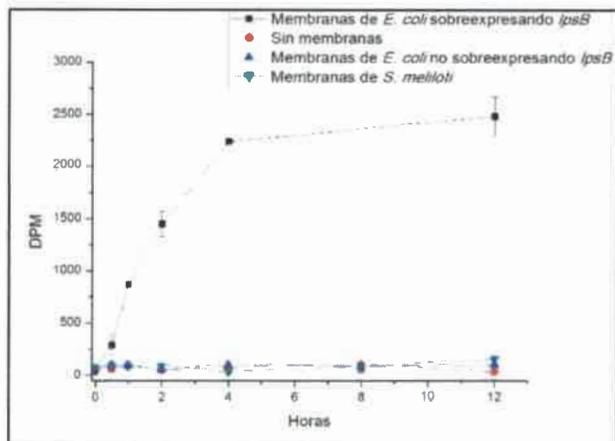


Figura 72. Curva de reacción en el tiempo. Membranas de *E. coli* sobreexpresando *lpsB*: membranas *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pJF340 e inducida con IPTG. **Sin membranas:** en la reacción o se usaron membranas de *E. coli* ni de *S. meliloti*. **Membranas de *E. coli* no sobreexpresando *lpsB*:** membranas *E. coli* BL21 (DE3). **Membranas de *S. meliloti*:** Membranas de *S. meliloti* salvaje.

En la Figura 72 donde se grafica la curva de avance de reacción, se observa un incremento en las Desintegraciones por Minuto (DPM) en función al tiempo. Es decir incorporación de radioactividad al aceptor biosintético como consecuencia de la adición de [^{14}C]Glc cuando se utilizaron membranas de *E. coli* que sobreexpresan *lpsB* (como fuente de enzima), en cambio no se observó dicho incremento de la radioactividad en las reacciones utilizando membranas de *E. coli* que no sobreexpresan *lpsB*, membranas de *S. meliloti* salvaje; como tampoco en las reacciones sin membranas.

Como se muestra en la Figura 73a la actividad glucosiltransferasa de LpsB es linealmente dependiente del tiempo y la concentración de proteínas. En cambio no se observó dicha linealidad cuando se utilizaron membranas de *S. meliloti* como fuentes de enzima, incluso utilizando una concentración de enzimas 10 veces superior a las de *E. coli* sobreexpresando *lpsB* (Figura 73b).

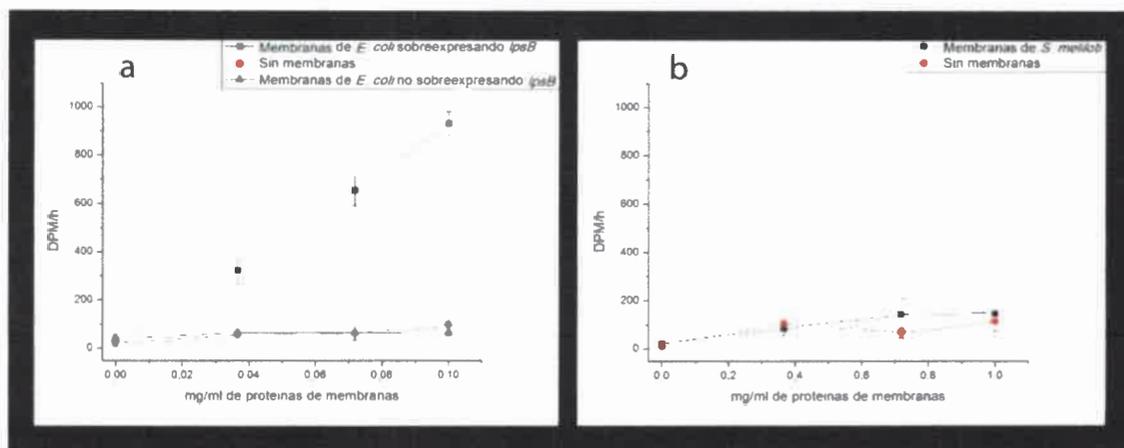


Figura 73. Relación entre la concentración de membranas como fuente de enzimas y la velocidad reacción. Membranas de *E. coli* sobreexpresando *lpsB*: membranas *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pJF340 e inducida con IPTG. **Sin membranas:** en la reacción o se usaron membranas de *E. coli* ni de *S. meliloti*. **Membranas de *E. coli* no sobreexpresando *lpsB*:** membranas *E. coli* BL21 (DE3). **Membranas de *S. meliloti*:** Membranas de *S. meliloti* salvaje. Para las reacciones con membranas de *E. coli* como fuente de enzima, las concentraciones de proteínas fueron 0; 0,036; 0,072 y 0,1 mg/ml; en cambio para las reacciones donde se utilizaron membranas de *S. meliloti* las concentraciones de proteínas fueron 0; 0,36; 0,7 y 1 mg/ml. Todas las reacciones se llevaron a cabo durante 1h a 30 °C.

En las reacciones para determinar la cinética de reacción se observa que a medida se incrementa la concentración de sustrato, se produce un aumento en la incorporación de [14 C]Glc, al precursor; lo cual es proporcional hasta que el sustrato alcanza una concentración aproximada a 4 mM. Posteriormente a ese punto, velocidad de la reacción no aumenta de manera proporcional e inclusive se observa una disminución de la misma, llegando a valores cercanos a la velocidad máxima (V_{\max} aparente) (Figura 74a).

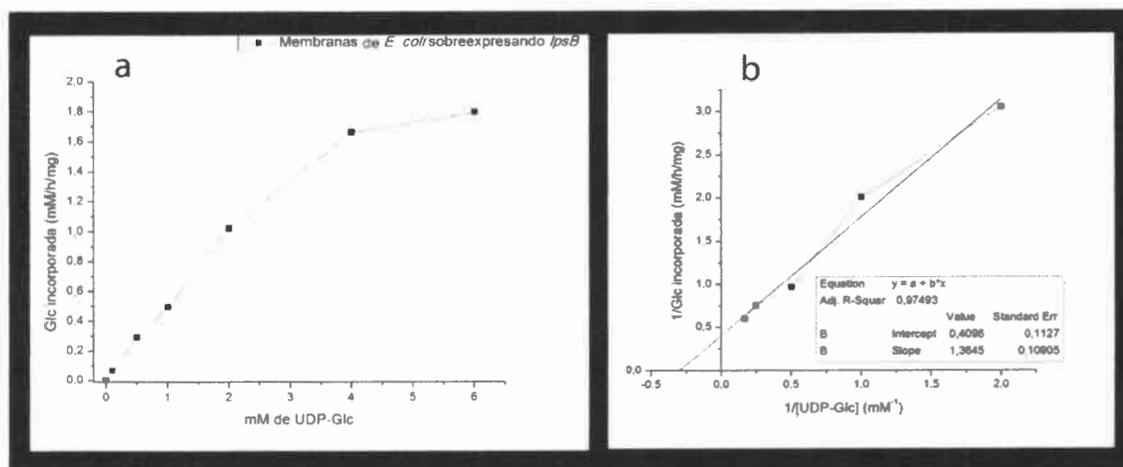


Figura 74. Cinética de reacción: a- Utilizando membranas de *E. coli* sobreexpresando *lpsB* como fuente de enzima y distintas concentraciones de UDP-Glc. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando membranas de *E. coli* sobreexpresando *lpsB* cuya concentración de proteínas fue 0,1 mg/ml; durante 1h a 30 °C. b- Representación de dobles recíprocas para los puntos de la Figura 74a.

Al representar en la Figura 74b las dobles recíprocas de la Figura 74a, y realizando el ajuste lineal obtenemos los valores de Intersección: 0,4096 y la Pendiente de la recta: 1,3645. Utilizando la ecuación Lineweaver-Burk (véase apartado III-6.1) se pueden obtener los valores de K_m (aparente) y V_{max} (aparente) de la reacción enzimática de LpsB.

	K_m (aparente)(mM)	V_{max} (aparente) (mM h ⁻¹ mg ⁻¹)
LpsB sobreexpresada en membranas de <i>E. coli</i>	3,32	2,44

Hasta la fecha no hay reportes de estudios de cinética de la glucosiltransferasa LpsB. En contraste existen estudios de cinética de LpcC de *R. leguminosarum* y WaaC de *E. coli*. Para la primera, (Kadrmaz *et al.*, 1996) se encontró un valor de K_m (aparente)= 4,3 μ M utilizando GDP-Man como sustrato, y Kdo₂-[4'-³²P]-lípidio IV_A como aceptor; y como fuente de enzimas se utilizaron membranas internas de *R. leguminosarum*. Por otra parte, Kadrmaz & Raetz (1998) reportan la cinética de WaaC de *E. coli*, obteniendo un valor de K_m (aparente)= 1,5 Mm utilizando ADP-Man como sustrato, y Kdo₂-[4'-³²P]-lípidio IV_A como aceptor. Más recientemente Grizot *et al.* (2006) describen un valor de K_m (aparente) =7 μ M utilizando como sustrato ADP-Hep.

Al comparar los valores de K_m (aparentes) obtenidos para LpsB con los publicados para LpcC y WaaC puede observarse una gran heterogeneidad de valores, posiblemente debido a los distintos métodos de determinación utilizados. En nuestro caso, la metodología empleada no nos permite conocer la concentración del aceptor en la reacción, aunque se mantuvo la misma proporción en todas las reacciones (cabe destacar que se han utilizado concentraciones saturantes de dicho aceptor). Como se citó anteriormente se generó y puso a punto una metodología para llevar a cabo los estudios de cinética enzimática para LpsB.

III-14.2. Determinación de actividad manosiltransferasa de LpsB y LpcC

Kanipes *et al.* (2003) reportaron que LpsB presenta actividad glucosiltransferasa y manosiltransferasa (la primera actividad fue demostrada en el apartado anterior, incluso se determinó la cinética de la reacción) mientras que LpcC de *R. leguminosarum* posee solamente actividad manosiltransferasa. En dichos estudios como fuente enzimática se utilizaron membranas de *E. coli* sobreexpresando *lpsB* o *lpcC*; y como precursor, Kdo₂-

[4'-³²P]-lípidio IV_A sintetizado artificialmente. A diferencia, en nuestro caso en el momento de determinar la actividad glucosiltransferasa de LpsB se utilizó en el precursor Kdo₂-lípidio IV_A de *S. meliloti* (véase apartado III-6).

En este caso para determinar la actividad manosiltransferasa de LpsB y LpcC se utilizaron como fuente de enzima membranas *E. coli* sobreexpresando *lpsB* o *lpcC*. Como aceptor se emplearon el precursor biosintético de *S. meliloti* y *R. leguminosarum*; y como sustrato GDP-[³H]Man. Debido a la escasa cantidad de GDP-[³H]Man disponible, no se llevaron a cabo ensayos de cinética, sino que solamente se determinó la actividad enzimática en una sola condición. Las reacciones fueron similares a las utilizadas para la determinación de actividad glucosiltransferasa para LpsB (véase mezcla de reacción en el apartado III-6). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y en cada reacción se utilizó como sustrato 5 µl de GDP-[³H]Man (21,6 Ci/mmol).

Condiciones	DPM
Membranas de <i>E. coli</i> expresando <i>lpsB</i> + Precursor de <i>S. meliloti</i>	1469±324
Membranas de <i>E. coli</i> expresando <i>lpsB</i> + Precursor de <i>R. leguminosarum</i>	601±249
Membranas de <i>E. coli</i> expresando <i>lpcC</i> + Precursor de <i>S. meliloti</i>	35752±382
Membranas de <i>E. coli</i> expresando <i>lpcC</i> + Precursor de <i>R. leguminosarum</i>	

Tabla 13. Actividad manosiltransferasa de LpsB y LpcC. Los valores de DPM (Desintegraciones por minuto) corresponden a un promedio de tres muestras. Las distintas reacciones fueron incubadas a 30 °C durante 1 h.

En la Tabla 13 puede observarse que LpsB posee relativamente baja actividad manosiltransferasa, ya sea utilizando el precursor de *S. meliloti* o de *R. leguminosarum*. En cambio, LpcC presenta actividad manosiltransferasa con ambos precursores. Resulta sorprendente que LpcC presente mayor actividad manosiltransferasa utilizando el precursor de *S. meliloti* que el de *R. leguminosarum*, sugiriendo que LpcC tendría mayor afinidad por el aceptor de *S. meliloti* que por el de su propia especie.

En el apartado I-18.1 se discutió acerca de las posibles razones por las cuales LpcC era incapaz de complementar en *trans* la mutación en *lpsB* de *S. meliloti*. Uno de los postulados fue que LpcC no fuese capaz de reconocer al precursor de *S. meliloti*, y como consecuencia no depositaría el residuo de azúcar (en este caso Man) y la reacción de polimerización del LPS se detendría. En base a lo expuesto en la Tabla 13, donde se observa que LpcC es capaz de reconocer dicho precursor, esta hipótesis puede ser descartada. Lo que posiblemente ocurra es que LpcC deposite el residuo de Man sobre el precursor, pero la enzima encargada de adicionar el siguiente residuo de hidrato de

carbono, no reconozca o no sea capaz de depositar el siguiente residuo azúcar por encontrarse Man en vez de Glc y de esta manera la síntesis se detendría.

III-15. Consideraciones generales

En este capítulo se examinó la distribución de heptosil/hexosiltransferasas implicadas en la síntesis del core en bacterias perteneciente al filum Proteobacteria. A partir de dicho análisis es posible concluir que solamente un pequeño grupo de bacterias comprendidas por *S. meliloti*, *R. leguminosarum*, *B. japonicum*, *A. tumefaciens* y *B. melitensis*, posee una hexosiltransferasa encargada de glicosilar el precursor Kdo₂-lípidio IV_A.

Se obtuvieron modelos tridimensionales de las estructuras de LpsB, LpcC y RfaC de *S. meliloti*, *R. leguminosarum* y *M. loti* respectivamente. Las mismas adoptan una estructura conocida como Glicosiltransferasas B (GT-B). Asimismo se logró predecir los posibles residuos de aminoácidos que estarían formando el sitio catalítico de estas glicosiltransferasas. En LpsB y LpcC se encontró el motivo conservado EX₇E, en cambio en RfaC el motivo [D(S/T)(G/A)XXH]. Ambos motivos posiblemente interaccionan con el azúcar del sustrato, es decir EX₇E estaría interactuando con la Glc (de UDP-Glc) en LpsB con la Man (de GDP-Man) en LpcC. Y por su parte [D(S/T)(G/A)XXH] de RfaC interaccionaría con la Hep (de ADP-Hep).

Además se establecieron las condiciones óptimas para la sobreexpresión de *lpsB* de *S. meliloti* y *rfaC* de *M. loti*. Si bien no se pudo determinar actividad enzimática de LpsB en estado puro, el hecho de contar con estas proteínas en grandes cantidades, permitirán en un futuro determinar las estructuras de las mencionadas proteínas mediante estudios cristalográficos.

Al momento de determinar la actividad glucosiltransferasa de LpsB, utilizando membranas de *E. coli* que sobreexpresan *lpsB*, se observó actividad glucosiltransferasa, adicionando Glc al precursor biosintético de *S. meliloti* con un valor de K_m (aparente)⁼⁼ 3,32mM. En cambio se observó que LpsB posee poca actividad manosiltransferasa ya sea con el precursor de *S. meliloti* como con el de *R. leguminosarum*. Por su parte, LpcC presenta actividad manosiltransferasa utilizando al precursor de *S. meliloti* con mayor afinidad que con el precursor de *R. leguminosarum*.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abdian, P.L., Lellouch, A.C., Gautier, C., Ielpi, L., Geremia, R.A.** (2000). Identification of essential amino acids in the bacterial alpha -mannosyltransferase aceA. *J Biol Chem.* 275(51):40568-75.
- Batt, S.M., Jabeen, T., Mishra, A.K., Veerapen, N., Krumbach, K., Eggeling, L., Besra, G.S., Fütterer, K.** (2010). Acceptor substrate discrimination in phosphatidylmyo-inositol mannoside synthesis: structural and mutational analysis of mannosyltransferase *Corynebacterium glutamicum* PimB'. *J. Biol. Chem.* 26, 285 (48):37741-52.
- Berg, S., Kaur, D., Jackson, M., Brennan, P. J.** (2007). The glycosyltransferases of *Mycobacterium tuberculosis* - roles in the synthesis of arabinogalactan, lipoarabinomannan, and other glycoconjugates. *Glycobiology.* 17(6):35-56.
- Bjellqvist, B., Basse, B., Olsen, E., Celis, J.** (1994). Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis* 15, 529-539.
- Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Breton, C., Snajdrová, L., Jeanneau, C., Koca, J., Imberty, A.** (2006). Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology.* 16(2):29R-37R.
- Buschiazzo, A., Ugalde, J.E., Guerin, M.E., Shepard, W., Ugalde, R.A., Alzari, P.M.** (2004). Crystal structure of glycogen synthase: homologous enzymes catalyze glycogen synthesis and degradation. *EMBO J.* 23(16):3196-205.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., Kjelleberg, S.** (2007). Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol.* 73(1):278-88
- Ciccarelli, F. D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C. J., Snel, B., Bork, P.** (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science.* 311(5765):1283-7.
- Coutinho, P., Deleury, E., Davies, G., Henrissat, B.** (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* 328:307-317.
- Dohi, H., Périon, R., Durka, M., Bosco, M., Roué, Y., Moreau, F., Grizot, S., Ducruix, A., Escaich, S., Vincent, S.** (2008). Stereoselective glycol fluorophosphorylation: synthesis of ADP-2-fluoroheptose, an inhibitor of the LPS biosynthesis. *Chemistry.* 14 (31):9530-9539.
- Gibson, R. P., Tarling, C. A., Roberts, S., Withers, S. G., Davies, G. J.** (2004). The donor subsite of trehalose-6-phosphate synthase: binary complexes with UDP-glucose and UDP-2-deoxy-2-fluoro-glucose at 2 Å resolution. *J Biol Chem.*, 279 (3):1950-5.

- Greenfield, L.K., Richards, M.R., Vinogradov, E., Wakarchuk, W.W., Lowary, T.L., Whitfield, C.** (2012). Domain organization of the polymerizing mannosyltransferases involved in synthesis of the *Escherichia coli* O8 and O9a lipopolysaccharide O-antigens. *J Biol Chem.* 287(45):38135-49.
- Grizot, S., Salem, M., Vongsouthi, V., Durand, L., Moreau, F., Dohi, H., Vincent, S., Escaich, S., Ducruix, A.** (2006). Structure of the *Escherichia coli* Heptosyltransferase WaaC: Binary Complexes with ADP AND ADP-2-deoxy-2-fluoro Heptose. *J. Mol. Bio.* 363: 383-394.
- Gronow, S., Brabetz, W., Lindner, B., Brade, H.** (2005). OpsX from *Haemophilus influenzae* represents a novel type of heptosyltransferase I in lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol.* 187(17):6242-7.
- Guerin, M., Kordulakova, J., Schaeffer, F., Svetlikova, Z., Buschiazzo, A., Giganti, D., Gicquel, B., Mikusova, K., Jackson, M., Alzari, P.M.** (2007). Molecular recognition and interfacial catalysis by the essential phosphatidylinositol mannosyltransferase PimA from Mycobacteria. *J Biol Chem.* 282(28):20705-14.
- Ha, S., Gross, B., Walker, S.** (2001). *E. Coli* MurG: A Paradigm for a Superfamily of Glycosyltransferases. *Current Drug Targets - Infectious Disorders.* 1: 201-213.
- Hamzah, Z., Alias, M., Ahmad, Z.** (2011). Discriminator setting and cocktail preparation for analysis of alpha and beta emitters in aqueous solution using liquid scintillation counter. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences.* 15, pp. 27-36
- Igura M., Maita, N., Kamishikiryo, J., Yamada, M., Obita, T., Maenaka, K., Kohda, D.** (2008). Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase. *EMBO J.* 27(1):234-43.
- Kadrmaz, J.L., Raetz, C. R.** (1998). Enzymatic synthesis of lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. Purification and properties of heptosyltransferase I. *J Biol Chem.* 273(5):2799-807.
- Kadrmaz, J. L., Brozek, K. A., Raetz, C. R.** (1996). Lipopolysaccharide core glycosylation in *Rhizobium leguminosarum*. An unusual mannosyl transferase resembling the heptosyl transferase I of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 271(50):32119-25
- Kanipes, M., Kalb, S., Cotter, R., Hozbor, D., Lagares, A., Raetz, C.** (2003). Relaxed sugar donor selectivity of a *Sinorhizobium meliloti* ortolog of the *Rhizobium leguminosarum* mannosyl transferase LpcC. *The Journal of Biological Chemistry.* 278:16365-16371.
- Kapitonov, D., Yu, R.K.** (1999). Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiology.* 9(10):961-78.
- Kostova, Z., Yan, B.C., Vainauskas, S., Schwartz, R., Menon, A.K., Orlean, P.** (2003). Comparative importance in vivo of conserved glutamate residues in the EX7E motif retaining glycosyltransferase Gpi3p, the UDP-GlcNAc-binding subunit of the first enzyme in glycosylphosphatidylinositol assembly. *Eur J Biochem.* 270(22):4507-14.
- Lairson, L., Henrissat, B., Davies, G.J., Withers, S.G.** (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem.* 77:521-55.

- Leipold, M., Kaniuk, N., Whitfield, C.** (2006). The C-terminal Domain of the *Escherichia coli* WaaJ glycosyltransferase is important for catalytic activity and membrane association. *The Journal of biological chemistry*. 282 (2): 1257-1264.
- Liu, J., Mushegian, A.** (2003). Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein Sci.* 12(7):1418-31.
- Lupyan, D., Leo-Macias, A., Ortiz, A.** (2005). A new progressive-iterative algorithm for multiple structure alignment. *Bioinformatics*. 21(15):3255-63.
- Mamat, U., Skurnik, M., Bengoechea, J.A.** (2011). Lipopolysaccharide Core Oligosaccharide Biosynthesis and Assembly. En Knirel, Y., Valvano, M. *Bacterial Lipopolysaccharides Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells*. Springer Wien New York.
- Margaret, I., Lucas, M.M., Acosta-Jurado, S., Buendía-Clavería, A. M., Fedorova, E., Hidalgo, A., Rodríguez-Carvajal, M. A., Rodríguez-Navarro, D., Ruiz-Sainz, J. E., Vinardell, J. M.** (2013). The *Sinorhizobium fredii* HH103 Lipopolysaccharide Is Not Only Relevant at Early Soybean Nodulation Stages but Also for Symbiosome Stability in Mature Nodules. *PLoS One*. 8(10): e74717.
- Martinez-Fleites, C., Proctor, M., Roberts, S., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J.** (2006). Insights into the synthesis of lipopolysaccharide and antibiotics through the structures of two retaining glycosyltransferases from family GT4. *Chem Biol*. 13(11):1143-52.
- Mulichak, A.M., Losey, H.C., Lu, W., Wawrzak, Z., Walsh, C.T., Garavito, R.M.** (2003). Structure of the TDP-epi-vancosaminyltransferase GtfA from the chloroeremomycin biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(16):9238-43.
- Mulichak, A.M., Lu, W., Losey, H.C., Walsh, C.T., Garavito, R.M.** (2004). Crystal structure of vancosaminyltransferase GtfD from the vancomycin biosynthetic pathway: interactions with acceptor and nucleotide ligands. *Biochemistry*. 43(18):5170-80.
- Pettersen, E., Goddard, T., Huang, C., Couch, G., Greenblatt, D., Meng, E., Ferrin, T.** (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput Chem*. 25(13):1605-12.
- Raetz, C., Whitfield, C.** (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *An. Rev. Biochem.* 71: 635-700.
- Rao, S., Rossmann, M.** (1973). Comparison of super-secondary structures in proteins. *J Mol Biol*. 15, 76 (2):241-256.
- Ruane, K., Davies, G., Martinez-Fleites, C.** (2008). Crystal structure of a family GT4 glycosyltransferase from *Bacillus anthracis* ORF BA1558. *Proteins*. 73(3):784-7.
- Sali, A., Blundell, T.** (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J.Mol.Biol.* 234(3):779-815.
- Sinnott, M., L.** (1990). Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.*, 1990, 90 (7), pp 1171-1202.

Söding, J., Biegert, A., Lupas, A. (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research* 33, 244-248.

Vetting, M., Frantom, P., Blanchard, J. (2008). Structure of the retaining glycosyltransferase MshA: The first step in mycothiol biosynthesis. Organism: *Corynebacterium glutamicum*- Complex with UDP. *J.Biol.Chem.* **283**: 15834-15844.

Yethon, J., Whitfield, C. (2001). Purification and characterization of WaaP from *Escherichia coli*, a lipopolysaccharide kinase essential for outer membrane stability. *The Journal of biological chemistry.* 276 (8): 5498-5504.

Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, vol 9, 40.

Conclusiones

CONCLUSIONES FINALES

En este trabajo de tesis se analizó la participación de las glicosiltransferasas LpsB de *S. meliloti* y LpcC de *A. tumefaciens*, *B. japonicum* y *R. leguminosarum* en la biosíntesis del LPS. Mutaciones en los genes que codifican para las mencionadas glicosiltransferasas resultaron en alteraciones drásticas en la estructura de los lipopolisacáridos. Los LPS de las cepas mutantes carecen de core externo y de antígeno O; y como consecuencia presentaron una mayor movilidad electroforética. Además, estas mutaciones resultaron en un fenotipo pleiotrópico caracterizado por cambios en la hidrofobicidad superficial de los rizobios y alteraciones en la capacidad de formar biofilm.

En el caso de la mutación *lpcC* de *B. japonicum*, además de los fenotipos citados anteriormente, se observó una marcada disminución en la velocidad de crecimiento en comparación a su cepa parental. A su vez la alteración producida en la superficie bacteriana (producto de la mutación) originó una reducción en la motilidad bacteriana sobre placas de medio semisólido posiblemente como consecuencia del incremento en la autoagregación celular. Asimismo, el mutante *lpcC* de *B. japonicum* no fue capaz de inducir la formación de nódulos funcionales en raíces de *Glycine max*, solamente indujo la formación de pseudonódulos no fijadores de nitrógeno y con marcados síntomas de defensa por parte de la planta. Este fenotipo simbiótico demuestra claramente el requerimiento de un LPS intacto por parte de *B. japonicum* para promover una simbiosis efectiva con *Glycine max*.

En contraste a lo observado en *B. japonicum*, la misma alteración en el LPS de *A. tumefaciens*, resultante de una mutación en el gen ortólogo, no afectó la capacidad bacteriana de infectar e inducir tumores en plantas de *Kalanchoe daigremontiana*.

Complementaciones heterólogas de mutantes *lpsB/lpcC* con ortólogos de *S. meliloti*, *R. leguminosarum*, *A. tumefaciens*, *B. japonicum*, *B. melitensis* y *B. henselae* han demostrado que LpsB de *S. meliloti* presenta actividad *in vivo* tanto glucosil-, como manosiltransferasa. En cambio LpcC de *R. leguminosarum*, *A. tumefaciens*, *B. japonicum* y *B. melitensis* poseen estrictamente actividad manosiltransferasa. Es llamativo el caso de

RfaC de *M. loti*, ya que al tratarse de una heptosiltransferasa, pueda complementar al mutante *lpcC* de *B. japonicum*; lo cual indica que RfaC posee actividad bifuncional.

En cuanto a la distribución de hexosil/heptosiltransferasas implicadas en la síntesis del core del LPS en bacterias perteneciente al filum Proteobacterias, se encontró que solamente un pequeño grupo de α -Proteobacterias comprendidas por *S. meliloti*, *R. leguminosarum*, *B. japonicum*, *A. tumefaciens* y *B. melitensis*, posee una hexosiltransferasa responsable de glicosilar el precursor biosintético del LPS. El resto de las Proteobacterias conserva heptosiltransferasas encargadas de depositar el primer residuo de hidrato de carbono sobre el mencionado precursor.

LpsB, LpcC y RfaC de *S. meliloti*, *R. leguminosarum* y *M. loti* respectivamente adoptan una estructura conocida como Glicosiltransferasas B (GT-B). Se logró predecir los posibles residuos de aminoácidos que estarían formando parte del sitio catalítico de estas glicosiltransferasas, los cuales serían: Gly 20, Lys 180, Glu 257, Gly 258, Phe 259, Gly 260, Leu 261 y Glu 265 en LpsB de *S. meliloti*; Gly 20, Lys 179, Glu 256, Gly 257, Phe 258, Gly 259, Leu 260 y Glu 264 en LpcC de *R. leguminosarum*; y Thr 185, Glu 220, Leu 242, Ile 245, Asp 259, Thr 260, Gly 261, Leu 262, His 264 en RfaC de *M. loti*.

Se establecieron las condiciones óptimas para la sobreexpresión y purificación para LpsB de *S. meliloti* y RfaC de *M. loti*. La proteína de fusión LpsB purificada no mostró ser enzimáticamente activa.

Se determinó la actividad glucosiltransferasa de LpsB utilizando membranas de *E. coli* que sobreexpresan *lpsB* y precursor biosintético de *S. meliloti*. Asimismo, se observó que LpsB posee poca actividad manosiltransferasa (*in vitro*) tanto con el precursor de *S. meliloti* como con el de *R. leguminosarum*. Por su parte, LpcC presenta actividad manosiltransferasa utilizando con mayor afinidad al precursor de *S. meliloti*.