Revista Latinoamericana de Microbiología

Volumen 47

Número Number 3-4 Julio-Diciembre 2005

Artículo:

Lipopolisacáridos de rhizobiaceae: estructura y biosíntesis

Derechos reservados, Copyright © 2005: Asociación Mexicana de Microbiología, AC

Otras secciones de este sitio:

- 🔹 Índice de este número
- 😰 Más revistas
- 🔊 Búsqueda

Others sections in this web site:

Contents of this number
More journals
Search



Revista Latinoamericana Algorotation Algor

Vol. 47, Nos. 3-4 Julio - Septiembre. 2005 Octubre - Diciembre. 2005 pp. 165 - 175

Lipopolisacáridos de Rhizobiaceae: estructura y biosíntesis

Ernesto Ormeño-Orrillo*

ARTÍCULO DE REVISIÓN

RESUMEN. Los lipopolisacáridos (LPS) son componentes mayoritarios de la membrana externa de las células Gram negativas y, por su ubicación, son importantes mediadores de las interacciones entre estas bacterias con su medio ambiente y otros organismos. La familia Rhizobiaceae de las α-Proteobacterias incluye a los rhizobia y agrobacterias, microorganismos que establecen relaciones simbióticas o parasíticas con plantas. Mutantes deficientes en la biosíntesis de LPS muestran interacciones anómalas con sus hospederos. La importancia agronómica de la interacción entre los rhizobia y agrobacterias con las plantas ha promovido un gran número de estudios sobre los LPS de estas bacterias. En los últimos años se han determinado las estructuras completas de uno o varios de los dominios de los LPS de Rhizobiaceae. Asimismo, se han realizado importantes avances en la determinación de pasos metabólicos para la biosíntesis de los LPS en estas bacterias. En esta revisión se proporciona un panorama general sobre la estructura y biosíntesis de los LPS en Rhizobium, Sinorhizobium y Agrobacterium, enfatizando los avances más recientes en el área.

Palabras clave: Lipopolisacáridos, Rhizobiaceae, biosíntesis, microorganismos.

INTRODUCCIÓN

Todas las células poseen una membrana citoplasmática compuesta de una bicapa de fosfolípidos que delimita el interior celular. Adicionalmente a esta "frontera", un grupo de bacterias, denominadas Gram negativas, evolucionaron desarrollando una segunda membrana exterior a la citoplasmática (Fig. 1). Esta membrana externa tiene una con-

ABREVIATURAS

Glc, glucosa Gal, galactosa Ram, ramnosa Fuc, fucosa Ara, arabinosa Man. manosa 6dTal, 6-desoxi-talosa GlcN, glucosamina GlcNAc, acetilglucosamina GlcNato, GlcNato QuiNAc, acetilquinovosamina ManNAc, acetilmanosamina GalA, ácido galacturónico GlcA, ácido glucurónico Kdo, ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosónico DHA, ácido 3-desoxi-2-heptulosárico LPS, lipopolisacárido SDS-PAGE, electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio ACP, proteína acarreadora de grupos acilos 27-0H C28:0, ácido 27 hidroxioctacosanoico ON, oligosacárido núcleo ORF, marco abierto de lectura

* Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

ABSTRACT. The lipopolysaccharides (LPS) are major components of the outer membrane of Gram negative bacteria and, because of their location, are important mediators in the interaction between these bacteria and their environment and other organisms. The α-Proteobacterial family Rhizobiaceae includes the rhizobia and agrobacteria, microorganisms which establish symbiotic or parasitic relationships with plants. Mutants deficient in LPS biosynthesis show anomalous interactions with their hosts. The agronomical relevance of the relationship between rhizobia and agrobacteria with plants has promoted a large number of studies on the LPS from these bacteria. The complete structures of one or several domains of LPS from Rhizobiaceae have been determined in the last years. Additionally, several metabolic steps in the biosynthesis of these molecules have been elucidated. This review aims at the description of the more recent findings on the structure and biosynthesis of LPS in Rhizobium, Sinorhizobium and Agrobacterium.

Key words: Lipopolysaccharides, Rhizobiaceae, biosynthesis, microorganisms.

figuración asimétrica: la cara interna está compuesta de fosfolípidos, mientras que la externa está compuesta mavoritariamente de unas moléculas únicas en la naturaleza denominadas lipopolisacáridos (LPS).

Los LPS son glucolípidos anfipáticos complejos. 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.^{31,37} Estructuralmente pueden dividirse en tres dominios: lípido A, oligosacárido núcleo (ON) y antígeno O (Fig. 2). El lípido A está constituido de un disacárido al que están unidos ácidos grasos, los cuales anclan las moléculas de LPS a la membrana externa. Una cadena corta de monosacáridos unida al lípido A constituye el ON. El antígeno O es un polisacárido constituido por unidades de monosacáridos u oligosacáridos repetidos muy variables, está unido al ON y es el dominio distal de la molécula de LPS.⁴⁶

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.46

Gracias a los LPS la membrana externa tiene la capacidad de excluir compuestos hidrofóbicos, siendo así una

Received August 1, 2005; received in revised form November 12, 2005; accepted December 13, 2005.

Ormeño-Orrillo





Figura 2. Esquema de una molécula de lipopolisacárido mostrando sus tres dominios estructurales. En el lípido A, las líneas zigzagueantes representan ácidos grasos y los hexágonos representan el disacárido. Los óvalos en gris oscuro representan los azúcares componentes del oligosacárido núcleo y los óvalos en gris claro, los azúcares del antígeno O. Los óvalos entre corchetes representan la unidad repetida del antígeno O.

núcleo

barrera de permeabilidad protectora contra muchos antibióticos y xenobióticos.^{18,31} Por este motivo no sorprende que los LPS sean esenciales para la viabilidad de la mayoría de bacterias Gram negativas, siendo la unidad mínima necesaria el lípido A y los Kdo del ON.³⁷

RHIZOBIA Y AGROBACTERIAS

La familia Rhizobiaceae de las α -Proteobacterias incluye a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Agrobacterium*.⁵³ Estas bacterias Gram negativas habitan el suelo y muchas especies son capaces de inducir la formación de hipertrofias en las raíces de ciertas plantas. En el caso de *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, estas hipertrofias son llamadas nódulos y se desarrollan sólo en plantas leguminosas. **Figura 1.** Representación esquemática de la envoltura celular de una bacteria Gram negativa.

Las bacterias colonizan estos nódulos y establecen una simbiosis mutualista fijando nitrógeno atmosférico para la planta.³³ Por el contrario, las especies de *Agrobacterium* que inducen hipertrofias son patógenas que modifican el metabolismo de las células de estos tumores para utilizar-las como fuentes de nutrientes.^{35,36}

Los polisacáridos de superficie, incluyendo los LPS, intervienen en la interacción entre las plantas y las bacterias simbiontes o patógenas.¹⁷ En *Rhizobium* los LPS son esenciales para que las bacterias colonicen las células del interior de los nódulos de tipo determinado.²⁷ La función de los LPS en *Sinorhizobium* no fue clara durante muchos años, sin embargo ahora se reconoce que son determinantes de la competitividad y efectividad simbióticas.^{7,8} En *Agrobacterium* los LPS son factores de virulencia que intervienen en la adhesión de las células a las raíces de la planta hospedera.³⁵

La mayor parte del conocimiento sobre los LPS se ha derivado de estudios sobre las especies patógenas de la familia Enterobacteriaceae.⁴⁶ Sin embargo, la importancia agronómica de la interacción entre los rhizobia y agrobacterias 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 Rhizobiaceae se ha enfocado no sólo en la descripción de la composición lipídica y de monosacáridos, 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. El objetivo de la presente revisión es proporcionar un panorama general sobre la estructura y biosíntesis de los LPS en los tres géneros mencionados de la familia Rhizobiaceae enfatizando los avances más recientes en el área. Se discutirán brevemente algunas de las relaciones entre estructura-biosíntesis y la función de estas moléculas cuando sea relevante. Al lector interesado se le sugiere consultar las excelentes revisiones publicadas recientemente sobre la función de los LPS en rhizobia.^{17,31}

ESTRUCTURA DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS EN RHIZOBIACEAE

Lípido A

Como se mencionó anteriormente, los LPS de enterobacterias han sido extensamente estudiados y por este motivo constituyen el arquetipo contra el que se comparan todos los demás. En estas bacterias, el lípido A es un disacárido compuesto de unidades de GlcN unidas por un enlace $\beta(1'-6)$, fosforilado en las posiciones 1 y 4', y acilado en las posiciones 2, 3, 2', 3' (Fig. 3A). Los grupos acilo en las posiciones 2' y 3' tienen una acilación secundaria formando derivados aciloxi-acil (Fig. 3A). Pueden presentarse variaciones en el largo de los grupos acilo y en las acilaciones secundarias entre cepas y especies.⁴⁶

El primer lípido A descrito con detalle en rhizobia fue el de la cepa CE3[§] de *R. etli.*⁴ A diferencia de la molécula sintetizada por enterobacterias, carece de grupos fosfato, está sustituido con un residuo de GalA en la posición 4' y un residuo de GlcNato reemplaza a la GlcN proximal (Fig. 3B). Además, posee un inusualmente largo ácido graso hidroxilado de 28 carbonos (27-OH C28:0) en la posición 2' formando un derivado aciloxi-acil. Este ácido graso a su vez esta acilado con un residuo de β -hidroxibutirato (Fig. 3B). Estudios más recientes utilizando mejores técnicas de purificación y de análisis han demostrado que el lípido A de R. etli CE3 es más heterogéneo de lo que se pensaba.^{41,42} Se han caracterizado cuatro moléculas diferentes pero relacionadas. Dos de ellas no presentan el residuo de GlcNato por lo que el disacárido es igual al de enterobacterias (Fig. 3C), y dos no están aciladas en la posición 3. En todas ellas el ácido graso de 28 carbonos está esterificado al grupo acilo en la posición 2' pero no siempre está acilado con el residuo de β -hidroxibutirato (Figs. 3B y 3C).

El lípido A de *R. leguminosarum* parece ser igual al de *R. etli* ya que en ambas especies se han identificado varias de las enzimas que modifican el precursor Kdo_2 -Lípido IV_{A} hasta el lípido A descrito en *R. etli* (ver más adelante).

Recientemente se ha caracterizado el lípido A de *Rhi*zobium sp. Sin-1, una cepa relacionada a *R. galegae* y por lo tanto filogenéticamente distante de *R. etli* y *R. leguminosarum.*²¹ A semejanza de *R. etli*, se aislaron varias moléculas relacionadas que difieren en el patrón de acilación (Fig. 3D). Todas carecen de grupos fosfato y poseen el mismo ácido graso de cadena extra larga que *R. etli* y *R. leguminosarum*, pero éste no presenta una sustitución con β hidroxibutirato. A diferencia del lípido A sintetizado en las otras especies de *Rhizobium*, todas las moléculas de *Rhizobium* sp. Sin-1 presentan el residuo de GlcNato reemplazando a la GlcN proximal, ninguna posee GalA y dos de las moléculas determinadas no presentan acilación en la posición 3'.

Urbanik-Sypniewska et al. (1989) caracterizaron el lípido A de *S. meliloti* como un disacárido de GlcN bifosforilado como en enterobacterias, y tetra-acilado. Uno de estos grupos acilo correspondió al ácido graso 27-OH C28:0 hallado también en *Rhizobium*, sin embargo éste fue asignado como grupo primario esterificado a la GlcN proximal. Estudios más recientes sugieren que esta estructura debe ser reevaluada (comparar con el párrafo siguiente).⁴⁹

La estructura del lípido A del LPS rugoso de *Sinorhizobium* sp. NGR234 ha sido recientemente determinada.²⁰ Como en *Rhizobium*, se detectaron diferentes moléculas relacionadas. El 94% de las moléculas presentaron un disacárido de GlcN bifosforilado y tetra- o penta-acilado (Fig. 3F). Si bien no fue caracterizado muy detalladamente, el lípido A del LPS liso presentó además moléculas triaciladas. El ácido graso extra largo fue asignado como grupo secundario en la misma posición que en las moléculas de lípido A de *Rhizobium*. Se determinó que 30% de estos ácidos grasos extra largos son de 30 carbonos (29-OH C30:0).

Completando el panorama dentro de la familia Rhizobiaceae, el año pasado se determinó la estructura del lípido A de *A. tumefaciencs* C58.⁵⁰ Como se esperaba, el análisis reveló una mezcla de moléculas que variaban en el patrón de acilación. Las moléculas más abundantes constan de un disacárido de GlcN, bifosfoforilado, penta-acilado, con el mismo ácido graso extra largo y en la misma posición que en los otros géneros de la familia (Fig. 3E).

Al comparar las estructuras descritas en Rhizobiaceae se observa una gran heterogeneidad en los patrones de acilación (Figs. 3B-3F). 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 arquetípico lípido A de enterobacterias. En Rhizobiaceae sólo hay un derivado aciloxi-acil, unido por un enlace amida a la GlcN distal. Este derivado contiene un ácido graso hidroxilado extra largo que es típico de toda la familia Rhizobiaceae y también está presente en otras bacterias simbióticas o patógenas, como *Mesorhizobium, Bradyrhizobium, Brucella y Legionella.*³ Todas estas bacterias pertenecen a la sub-

[§] La cepa CE3 es una derivada resistente a estreptomicina de la cepa tipo de R. etli CFN42.

168 Ormeño-Orrillo

Rev Latinoam Microbiol 2005; 47 (3-4): 165-175



Figura 3. Estructura del lípido A en E. coli K12 (A) y de las más abundantes moléculas de lípido A producidas por algunos miembros de la familia Rhizobiaceae (B-F). Los números dentro de los círculos indican la longitud de los grupos acilo. En la estructura de E. coli se indica la numeración de los carbonos del disacárido y se señalan en gris los grupos acilos secundarios que dan lugar a derivados aciloxi-acil. En las estructuras de Rhizobiaceae se señalan en gris las sustituciones que diferencian las moléculas de lípido A producidas por cada cepa.

169

división α -2 de las Proteobacterias y tienen la capacidad de vivir intracelularmente en hospederos eucariontes. Se ha especulado sobre el papel de este ácido graso en la interacción entre estas bacterias y sus hospederos proponiendo que podría estabilizar la membrana externa, y así proteger ante las respuestas de defensa del hospedero o durante el estrés ácido u osmótico que probablemente enfrenten en los compartimientos intracelulares.^{49,52}

Oligosacárido núcleo

Este dominio de los LPS es el que ha sido estudiado con menos detalle a nivel estructural. Hasta la fecha sólo se han determinado las estructuras completas de dos ON en Rhizobiaceae.

La primera estructura resuelta completamente correspondió a la cepa CE3 de *R. etli* (Fig. 4A).¹⁴ La molécula consta de tres residuos de Kdo, tres de GalA, uno de Man y uno de Gal. Está unido al lípido A mediante uno de los Kdo y otro de estos residuos ocupa la posición terminal en donde se une el antígeno O (Fig. 4A). Los ON descritos en Enterobacteriaceae poseen grupos fosfato. Se ha propuesto que las cargas negativas de los grupos fosfato permiten unir las moléculas de LPS mediante cationes divalentes, y así estabilizar la membrana externa.¹⁸ El ON de *R. etli* no posee grupos fosfato, sin embargo la función de éstos la asumirían los grupos carboxilo de los residuos de GalA. Asimismo, la ausencia de grupos fosfato en el ON sería una estrategia para economizar fósforo en ambientes como el suelo donde este elemento puede ser escaso.

Cuando los LPS de *R. etli* se someten a una lisis ácida suave, se liberan un trisacárido y un tetrasacárido que corresponden al ON.²⁷ Se han identificado productos de lisis idénticos en varias cepas de *R. leguminosarum* biovar *viciae* y *trifolii*, por lo que se presume que el ON está conservado entre ambas especies.¹⁴ Apoyando esta asunción, se ha demostrado que anticuerpos dirigidos contra el ON de *R. leguminosarum* reconocen los LPS de *R. etli*. Los LPS de *R. tropici*, *A. tumefaciens*, y *Sinorhizobium* spp. no fueron reconocidos por estos anticuerpos por lo que sus ON deben ser diferentes.³⁴

Si bien no se ha determinado la estructura del ON de alguna cepa de *Sinorhizobium*, sí se ha determinado la composición de azúcares en cepas de *S. meliloti* y *S. fredii* (Tabla 1). Todas poseen Kdo, Glc, Gal, GlcA y GalA. La mayoría tienen Man y algunas tienen DHA. A diferencia de *Rhizobium*, el LPS rugoso es la forma más abundante producida por *Sinorhizobium* spp., y por este motivo el



Figura 4. Estructuras de los ON de R. etli y R. leguminosarum (A) y A. larrymoorei (B). En la estructura de R. etli se indican las enzimas que catalizan las adiciones de Man, Gal y del Kdo terminal. GalAN, amida de GalA; GlcAN, amida de GlcA; QuiNAcil, quinovosomanina sustituida por un derivado de ácido piroglutámico.

principal determinante antigénico de sus LPS corresponde al ON.^{7,47} Se han identificado cuatro serogrupos entre los LPS de *Sinorhizobium* spp. que parecen corresponder a diferentes estructuras de ON que se diferencian por el contenido de ácidos urónicos.⁴⁷

Recientemente se ha determinado la estructura del ON de una cepa de *Agrobacterium larrymoorei* que sólo produce LPS rugoso.³⁶ Esta especie está relacionada con *A. tumefaciens* y causa tumores aéreos en *Ficus benjamina*. La estructura determinada contiene azúcares encontrados en otros ON de Rhizobiaceae como Kdo, Gal y Glc (Fig. 4B). Por otro lado presenta algunas diferencias: contiene Ram, los ácidos urónicos están presentes como uronamidas, por lo que no proveen cargas negativas, y el residuo distal es una quinovosamina sustituida con un derivado de ácido piroglutámico que sólo se había descrito antes en el ON de *Campylobacter coli*.³⁶

Antígeno O

Esta es la parte 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. También pueden presentarse sustituciones, como metilaciones y acetilaciones, que añaden complejidad a la molécula.²⁷ Hasta hace muy poco sólo se conocían las estructuras de la unidad repetida del antígeno O en cepas de *Rhizobium*, sin embargo recientemente se han descrito las estructuras de

Сера	Glc	Gal	Kdo	DHA	Man	GlcA	GalA	Xil	Referencia
S. meliloti 102F51	+	+	+	+	-	+	+	-	Russa <i>et al.</i> , 1996
S. meliloti 1021*	+	+	+	-	+	+	+	-	Reuhs et al., 1998
S. meliloti 1021*	+	+	+	+	+	+	+	+	Campbell et al., 2002
S. fredii USDA205	+	+	+	-	+	+	+	-	Reuhs et al., 1998
S. fredii USDA257	+	+	+	-	+	+	+	-	Reuhs et al., 1998
Sinorhizobium sp. NGR234	+	+	+	-	+	+	+	-	Reuhs et al., 1998

* Se utilizaron diferentes métodos de extracción y purificación del ON.

Especie/Cepa	Estructura	Referencia
R. leguminarum bv. viciae 128C53	3)-α-L-Ram-(1→3)-α-L-Fuc-(1→3)-α-L-Fuc-(1→	Kannenberg <i>et al.</i> , 1998
	∠) ↑ α-D- Man -(1	
bv. <i>trifolii</i> 4S	3)- α -L-Ram-(1→3)- α -L-Ram-(1→4)- β -D-GlcNAc-(1→3)- α -L-Ram-(1→ 2)	Wang & Hollingsworth, 1994
	α -D-ManNAc-(1	
R. etli		
CE3	4)-β-D-6-O-Me- GIcA -(1→4)-α-L- Fuc -(1→ 2) ↑	Forsberg <i>et al.</i> , 2000
	α-3-Ο-Μe 6dTal -(1	
R. tropici		
CIAT899	4)-β-D- Gic -(1→3)-α-D-2-O-Ac-D-6dTal-(1→3)-α-L-Fuc-(1→	Gil Serrano et al., 1995
A. tumefaciens		
F/1	3)- <i>α</i> -L-Ram-(1→3)-β-D-GIcNAc-(1→	
	4)- <i>α</i> -L-Ram-(1→3)- <i>β</i> -D-GIcNAc-(1→	De Castro et al., 2004
DSM 30205	3)-α-D-Ara-(1→3)-α-L-Fuc-(1→	De Castro et al., 2002
C58	3)-α-L- 6dTal -(1→ (acetilado al azar en C-4)	De Castro et al., 2003

171

varias cepas de *A. tumefaciens* (Tabla 2). La unidad repetida 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. Como se mencionó anteriormente, pocas cepas de *Sinorhizobium* producen moléculas de LPS con antígeno O, lo que explica que se haya prestado poca atención a su estudio.

Adicionalmente a la unidad repetida, el antígeno O de *R. etli* CE3 contiene el trisacárido no repetido \rightarrow 3)- α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Man-(1 \rightarrow 3)- β -QuiNAc.¹⁵ Este trisacárido une el antígeno O al ON y, algunas veces, se le denomina ON externo. Asimismo, el antígeno O de esta cepa termina en un residuo de fucosa trimetilada (TOMFuc).¹⁵ Se presume que los antígenos O de otros Rhizobiaceae pueden tener estas estructuras adicionales a la unidad repetida, sin embargo hasta la fecha no se han descrito.

BIOSÍNTESIS

Lípido A

En vista de que el lípido A es esencial para casi todas las bacterias Gram negativas, no es sorprendente que el proceso de su biosíntesis esté muy conservado.^{45,46} En un elegante trabajo de bioquímica, Price et al. (1994) demostraron que R. leguminosarum y R. etli poseen las actividades enzimáticas que en E. coli se requieren para sintetizar el precursor Kdo₂-Lípido IV₄. Si bien no se han descrito estas actividades en otras Rhizobiaceae, los genomas de S. meliloti 1021 y A. tumefaciens C58 contienen los posibles ortólogos que codifican para estas enzimas (http://www.genome.jp/kegg/ pathway.html). Los pasos metabólicos posteriores presentes en Rhizobiaceae modifican el Kdo₂-Lípido IV_A hasta el lípido A maduro típico de estas bacterias. Varios de estos pasos han sido descritos recientemente en R. leguminosarum y R. etli.

Como se mencionó anteriormente, una gran parte de la heterogeneidad en las acilaciones del lípido A en Rhizobiaceae se centra en la unidad proximal del disacárido. En todas las especies analizadas, una proporción de las moléculas carecen del grupo acilo en la posición 3 (Figs. 3B-F). Se ha identificado la actividad enzimática responsable de esta deacilacion en *R. leguminosarum.*¹ Esta actividad está asociada a membrana y al parecer actúa sobre el lípido A antes de que se forme el derivado aciloxi-acil. No se detectó esta actividad en extractos de *S. meliloti*, sin embargo esta especie debe poseer una actividad similar.

El segundo paso específico de Rhizobiaceae parece ser 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 donador de grupo acilo a una ACP específica codificada por el gen *acpXL*.^{2,6} Las dos proteínas están codificadas por genes cercanos pero no contiguos. Entre ambos genes se encuentran 4 ORFs, tres de los cuales codifican para proteínas que probablemente están involucradas en la biosíntesis del ácido graso de cadena extra larga. Los genomas de *S. meliloti* y *A. tumefaciens* poseen ortólogos a todos estos genes, lo que concuerda con la presencia en estas especies del ácido graso extra largo.

Recientemente se han obtenido mutantes de S. meliloti en los genes acpXL^{49,13} y lpxXL.¹³ Estas mutantes no incorporan el ácido graso extra largo en el lípido A, son más sensibles in vitro a estrés osmótico, ácido y a detergentes, presentan una menor competitividad y un retardo en la inducción de la nodulación en comparación a las cepas silvestres. Sin embargo, los nódulos tienen una morfología normal y fijan nitrógeno. Estos resultados sugerirían que si bien el ácido graso extra largo es importante, no es indispensable para establecer una simbiosis efectiva. Resultados similares se han obtenido en R. leguminosarum con el gen acpXL,⁵² sin embargo en este caso se determinó que un pequeño porcentaje de moléculas de lípido A portaban el ácido graso extra largo. En R. leguminosarum bv. viciae se ha demostrado que la concentración del ácido graso extra largo aumenta durante la simbiosis.^{26,52} Estos resultados podrían indicar que existe otra u otras ACP que no se expresan considerablemente en vida libre pero sí durante la simbiosis y que podrían sustituir la función de la ACP mutada. Por este motivo sería interesante determinar el porcentaje de moléculas de lípido A que porta el ácido graso extra largo en los bacteroides de R. leguminosarum. Otro punto a analizar en estas mutantes es si el ON y el antígeno O están alterados, ya que podría suceder que las enzimas que sintetizan estos componentes no reconozcan de la misma forma a moléculas que no porten el ácido graso extra largo.

Una característica típica del lípido A en *Rhizobium* es que no está fosforilado. En los extractos celulares de *R. leguminosarum* y *R. etli* se han identificado actividades enzimáticas que desfosforilan los extremos 1 y 4' del precursor Kdo₂-Lípido IV_A.^{5,39} El gen de *R. leguminosarum* que codifica para la fosfatasa que actúa sobre la posición 1 ha sido clonado y caracterizado.²⁸ La enzima, denominada LpxE, actúa normalmente luego de que se ha añadido el ácido graso extra largo. En base a la secuencia de aminoácidos se predice que LpxE posee seis hélices transmembranales y que su probable sitio activo se orienta hacia el lado periplasmático de la membrana interna. Los homólogos más similares a LpxE se encuentran en los genomas de *S. meliloti* y *A. tumefaciens*.²⁸ En

Lipopolisacáridos de Rhizobiaceae

estas especies sólo una proporción de las moléculas de lípido A no poseen grupos fosfatos en el extremo 1 por lo que será interesante determinar en qué etapa biosintética actúan estas fosfatasas, y si su expresión o actividad es inducida bajo alguna condición especial.

Otra característica del lípido A en *Rhizobium* es la presencia de un residuo de GlcNato en lugar de la GlcN proximal (Figs. 3B y 3D). Recientemente se ha clonado y caracterizado el gen de *R. leguminosarum* que codifica para una oxidasa que da origen a este residuo.^{43,44} La proteína, denominada LpxQ, se localiza 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. Por el contrario, el genoma de *A. tumefaciens* C58 codifica para una proteína 59% idéntica y 77% similar a LpxQ que puede oxidar el lípido A *in vitro*. Este ortólogo podría estar activo sólo bajo ciertas condiciones ya que no se ha detectado GlcNato en *A. tumefaciens* cultivado en condiciones de laboratorio.

Oligosacárido núcleo

Los dos primeros residuos del ON, que casi siempre son dos moléculas de Kdo, se añaden durante la biosíntesis del precursor Kdo_2 -Lípido IV_A .⁴⁶ La presencia de estos residuos es necesaria para completar las acilaciones del lípido A y también uno de ellos actúa como el aceptor sobre el que se añaden secuencialmente el resto de azúcares del ON. Las enzimas que sintetizan los nucleótido azúcares precursores y las glucosiltransferasas que los ensamblan son proteínas membranales o asociadas a la membrana interna.¹⁸ Cuando se ha completado el ensamblaje del lípido A - ON, el transportador de tipo ABC MsbA, transloca la molécula al lado periplasmático de la membrana interna.⁴⁶ En varias cepas de Enterobacteriaceae se han identificado todas las enzimas necesarias para la biosíntesis del ON, mientras que en Rhizobiaceae se han descrito todos los pasos metabólicos sólo en R. leguminosarum.

El primer paso específico en la biosíntesis del ON en *R. leguminosarum* es catalizado por LpcC. Esta proteína es una manosiltransferasa que utiliza GDP-manosa como donador del azúcar y el Kdo interno del Kdo₂-Lípido A como aceptor (Fig. 4A).²³ Posteriormente actúan las enzimas LpcA y LpcB que presentan actividad de galactosil- y Kdo-transferasa, respectivamente (Fig. 4A).²² Los genes *lpcA* y *lpcB* están contiguos en el genoma de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 mientras que el gen *lpcC* está separado por aproximadamente 10 kb.

Recientemente se ha descrito la identificación de una región del genoma de *R. leguminosarum* que dirige la síntesis de tres actividades enzimáticas capaces de añadir residuos hidrofílicos a las moléculas Kdo₂-Lípido IV_A y manosa- Kdo₂-Lípido IV_A.²⁵ La secuencia de dicha región reveló tres ORFs similares al gen *arnT* de *E. coli*, que codifica para una enzima involucrada en la transferencia de aminoarabinosa al lípido A. El análisis de los productos obtenidos indica que estos ORFs codifican las glucosiltransferasas requeridas para añadir los tres residuos de GalA presentes en el ON de *R. leguminosarum* (Fig. 4A).

En S. meliloti se ha identificado un gen homólogo a lpcC de R. leguminosarum.²⁹ Este gen, denominado lpsB, codifica para una proteína que puede manosilar moléculas de Kdo₂-Lípido IV_A. Sin embargo, a diferencia de lpcCtambién puede añadir otros azúcares. Es interesante notar que *lpsB* puede complementar a mutantes en *lpcC* pero no ocurre lo contrario.²⁴ Estos datos sugieren que en S. meliloti, LpsB no añade Man al Kdo del lípido A sino otro azúcar. Será interesante determinar la estructura del ON en S. meliloti para determinar qué residuo es añadido in vivo por LpsB. Otros tres genes (lpsCDE) que codifican para posibles glucosiltransferasas están contiguos a lpsB pero se transcriben divergentemente.²⁹ No se han determinado las especificidades de estas probables glucosiltransferasas. Sin embargo, parece ser que están involucradas en la biosíntesis del ON, ya que el LPS rugoso de mutantes en estos genes migra más rápido que el de la cepa silvestre. Esto se ha interpretado como la producción de un ON truncado.

No existen reportes sobre genes involucrados en la biosíntesis del ON en agrobacterias. Sin embargo, *A. tumefaciens* C58 posee un homólogo muy similar a *lpcC* y *lpsB* que está anotado como una posible manosiltransferasa del ON. Este gen está precedido de *greA* y está cercano a *lrp*. Esta misma organización genética está conservada en *R. leguminosarum* y *S. meliloti*, lo que podría sugerir que se trata de un ortólogo con función similar.²⁹

Antígeno O

La biosíntesis del antígeno O ocurre en el lado citoplasmático de la membrana interna.⁴⁶ Como sucede durante la biosíntesis del ON, se requieren enzimas que sinteticen los nucleótidos azúcares precursores y glucosiltransferasas que los ensamblen. La cadena del antígeno O crece unida al acarreador undecaprenil fosfato que está unido a la membrana. Al finalizar la síntesis de una unidad de antígeno O o del antígeno O completo, un transportador transloca esta molécula al lado periplasmático de la membrana interna. Si se han transportado unidades, éstas son polimerizadas por la enzima Wzy. Finalmente, una ligasa se encarga de unir el antígeno O al lípido A - ON para completar una molécula de LPS.⁴⁶

Se han identificado varios genes o grupos de genes que están involucrados en la biosíntesis del antígeno O en varias cepas de *Rhizobium*. La mayoría de estos genes sólo están anotados como probables enzimas que sintetizan nucleótido azúcares o probables glucosiltransferasas ya que es difícil inferir funciones específicas en base a sus secuencias. Tomando ventaja de que se conoce la estructura completa del LPS de *R. etli* CE3, recientemente se han caracterizado algunas proteínas cuyas funciones están directamente relacionadas con la biosíntesis de su antígeno O.^{12,16,30,32}

Como se mencionó anteriormente, un trisacárido no repetido es parte del antígeno O de R. etli CE3.15 El residuo de QuiNAc proximal de este trisacárido une el antígeno O al ON. En la mutante CE166 sólo una parte de las moléculas de LPS poseen antígeno O.16 Estas moléculas completas de LPS se diferencian de las producidas por la cepa silvestre en que el residuo de QuiNAc está reemplazado por 2-acetomida-2,6-dideoxihexosil-4-ulosa. Este residuo es un intermediario en la biosíntesis de QuiNAc. El gen mutado en CE166 fue denominado lpsQ y las evidencias indican que codifica para la reductasa que transforma el intermediario en QuiNAc. Se presume que la glucosiltransferasa que añade QuiNAc también puede reconocer y añadir el intermediario pero con menos eficiencia. Esto explicaría porqué sólo una porción de los LPS en la mutante tienen antígeno O.

En Enterobacteriaceae se han descrito dos mecanismos para el transporte del antígeno O al lazo periplasmático de la membrana interna.⁴⁶ Uno de ellos involucra a la flipasa Wzx y el otro a un transportador de tipo ABC codificado por los genes wzm y wzt. Lerouge et al. (2001) identificaron en R. etli CE3 genes homólogos a los que codifican el transportador ABC. Los LPS de una mutante en el gen homólogo a wzm mostraron sólo la banda de LPS rugoso, no reaccionaron con anticuerpos que reconocen el antígeno O de la cepa silvestre y sólo presentaron los azúcares componentes del ON. Recientemente hemos identificado en nuestro laboratorio genes homólogos a wzm y wzt en R. tropici CIAT899.40 Una mutante en wzt produce sólo LPS rugoso y es sensible a varios antibióticos, xenobióticos y estreses abióticos como se ha descrito en mutantes deficientes en antígeno O. No hemos podido identificar homólogos claros de wzm-wzt en los genomas de R. leguminosarum (http:// www.sanger.ac.uk/Projects/R_leguminosarum/) y de A. tumefaciens C58 lo que podría indicar que el mecanismo del transportador ABC no es común a todas las Rhizobiaceae.

El antígeno O de *R. etli* CE3 presenta metilaciones en los residuos de GlcA y 6dTal (Tabla 1) y en el residuo terminal TOMFuc.¹⁵ Recientemente se ha descrito una probable metiltransferasa que parece estar involucrada en la modificación de alguno de los residuos de la unidad repetida.³² El gen está ubicado corriente arriba de los genes *wzm-wzt*. La mutante deficiente en este gen sólo produce LPS rugoso con un ON intacto. Esto sugiere que la metilación se produce a nivel del nucleótido azúcar precursor y que ésta es necesaria para el ensamblaje del antígeno O. Duelli et al. (2001) han descrito el gen *lpeA* que codifica para una probable metiltransferasa que afecta al residuo terminal TOMFuc. Corriente abajo de *lpeA* se identificaron otros dos ORFs con similitudes a metiltransferasas. Las evidencias indican que las proteínas codificadas por estos genes participan en las metilaciones del residuo de Fuc terminal y que estas modificaciones son necesarias para su incorporación al antígeno O, ya que mutantes en estos genes producen LPS sin este residuo terminal.

CONCLUSIONES

Varios estudios han identificado genes que probablemente estén involucrados en la biosíntesis de LPS en Rhizobiaceae. Sin embargo, no se han asignado funciones específicas a la mayoría de estos genes. Idealmente, se requieren ensayos bioquímicos para determinar la función de muchas de las enzimas involucradas. No obstante, también se pueden realizar inferencias sólidas sobre la función en base a los defectos estructurales presentados por las mutantes en estos genes. Los avances recientes en la determinación de las estructuras completas de varios dominios de los LPS en varias cepas de Rhizobiaceae abren muchas posibilidades para determinar las funciones de los genes identificados hasta la fecha y los que se identificarán en el futuro. Asimismo, pronto se liberarán las secuencias de los genomas de R. etli CFN42 y R. leguminosarum 3841, cuyos LPS han sido extensamente estudiados. Indudablemente, las comparaciones entre estos genomas y los ya secuenciados de Rhizobiaceae y de otras bacterias, contribuirán al avance en esta interesante área.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a la Dra. Esperanza Martínez-Romero por su invalorable apoyo y aliento en la realización de los trabajos experimentales que motivaron la realización de esta revisión, y a la Dra. Isabel López Lara por leer el manuscrito y por sus acertadas sugerencias.

REFERENCIAS

- Basu, S. S., K. A White, N. L. Que & C. R. Raetz. 1999. A deacylase in *Rhizobium leguminosarum* membranes that cleaves the 3-O-linked beta-hydroxymyristoyl moiety of lipid A precursors. J. Biol. Chem. 274:11150-8.
- Basu, S. S., M. J. Karbarz & C. R. H. Raetz. 2002. Expression cloning and characterization of the C28 acyltransferase of lipid A biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*. J. Biol. Chem. 277:28959-71.
- Bhat, U. R., H. Mayer, A. Yokota, R. I. Hollingsworth & R. W. Carlson. 1991. Occurrence of lipid A variants with 27-hydroxyoctacosanoic acid in lipopolysaccharides from members of the family *Rhizobiaceae*. J. Bacteriol. 173:2155-9.

Rev Latinoam Microbiol 2005; 47 (3-4): 165-175

174

- Bhat, U. R., L. S. Forsberg & R. W. Carlson. 1994. Structure of lipid A component of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* lipopolysaccharide. Unique nonphosphorylated lipid A containing 2-amino-2-deoxygluconate, galacturonate, and glucosamine. J. Biol. Chem. 269:14402-10.
- Brozek, K. A., J. L. Kadrmas & C. R. Raetz. 1996a. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*. Novel enzymes that process precursors containing 3-deoxy-D-mannooctulosonic acid. J. Biol. Chem. 271:32112-8.
- Brozek K. A., Carlson R. W. & C. R. Raetz. 1996b. A special acyl carrier protein for transferring long hydroxylated fatty acids to lipid A in *Rhizobium*. J. Biol. Chem. 271:32126-36.
- Campbell, G. R., B. L. Reuhs & G. C. Walker. 2002. Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 99:3938-43.
- Campbell, G. R., L. A. Sharypova, H. Scheidle, K. M. Jones, K. Niehaus, A. Becker & G. C. Walker. 2003. Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. J. Bacteriol. 185:3853-62.
- De Castro, C., O. De Castro, A. Molinaro & M. Parrilli. 2002. Structural determination of the O-chain polysaccharide from *Agrobacterium tumefaciens*, strain DSM 30205. Eur. J. Biochem. 269:2885-8.
- De Castro, C., E. Bedini, R. Nunziata, R. Rinaldi, L. Mangoni & M. Parrilli. 2003. Elucidation of the O-chain structure from the lipopolysaccharide of *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. Carbohydr. Res. 338:1891-4.
- De Castro, C., A. Carannante, R. Lanzetta, R. Nunziata, V. Piscopo & M. Parrilli. 2004. Elucidation of two O-chain structures from the lipopolysaccharide fraction of *Agrobacterium tumefaciens* F/1. Carbohydr. Res. 339:2451-5.
- Duelli, D. M., A. Tobin, J. M. Box, V. S. Kolli, R. W. Carlson & K. D. Noel. 2001. Genetic locus required for antigenic maturation of *Rhizobium etli* CE3 lipopolysaccharide. J Bacteriol. 183:6054-64.
- Ferguson, G. P., A. Datta, R. W. Carlson & G. C. Walker. 2005. Importance of unusually modified lipid A in *Sinorhizobium* stress resistance and legume symbiosis. Mol. Microbiol. 56:68-80.
- Forsberg, L. S. & R. W. Carlson. 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.
- Forsberg, L. S., U. R. Bhat & R. W. Carlson. 2000. Structural characterization of the O-antigenic polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Rhizobium etli* strain CE3. A unique Oacetylated glycan of discrete size, containing 3-O-methyl-6deoxy-L-talose and 2,3,4-tri-O-methyl-L-fucose. J. Biol. Chem. 275:18851-18863.
- 16. Forsberg, L. S., K. D. Noel, J. Box & R. W. Carlson. 2003. Genetic locus and structural characterization of the biochemical defect in the O-antigenic polysaccharide of the symbiotically deficient *Rhizobium etli* mutant, CE166. Replacement of N-acetylquinovosamine with its hexosyl-4-ulose precursor. J Biol Chem. 278:51347-59.
- Fraysse, N., F. Couderc & V. Poinsot. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. Eur. J. Biochem. 270:1365-1380.
- Frirdich, E. & C. Whitfield. 2005. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae. J. Endotoxin Res. 11:133-144.
- Gil-Serrano, A. M., I. Gonzalez-Jimenez, P. Tejero Mateo, M. Bernabe, J. Jimenez-Barbero, M. Megias & M. J. Romero-Vaz-

quez. 1995. Structural analysis of the O-antigen of the lipopolysaccharide of *Rhizobium tropici* CIAT899. Carbohydr. Res. 275:285-94.

- 20. Gudlavalleti, S. K. & L. S. Forsberg. 2003. Structural characterization of the lipid A component of *Sinorhizobium* sp. NGR234 rough and smooth form lipopolysaccharide. Demonstration that the distal amide-linked acyloxyacyl residue containing the long chain fatty acid is conserved in *Rhizobium* and *Sinorhizobium* sp. J. Biol. Chem. 278:3957-68.
- 21. Jeyaretnam, B., J. Glushka, V. S. Kumar Kolli & W. Carlson. 2002. Characterization of a novel lipid A from *Rhizobium* species Sin-1. A unique lipid A structure that is devoid of phosphate and has a glycosyl backbone consisting of glucosamine and 2-aminogluconic acid. J. Biol. Chem. 277:41802-41810.
- Kadrmas, J. L., D. Allaway, R. E. Studholme, J. T. Sullivan, C. W. Ronson, P. S. Poole & C. R. Raetz. 1998. Cloning and overexpression of glycosyltransferases that generate the lipopolysaccharide core of *Rhizobium leguminosarum*. J. Biol. Chem. 273:26432-40.
- 23. Kanipes, M. I., A. A. Ribeiro, S. Lin, R. J. Cotter & C. R. Raetz. 2003. 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.
- 24. Kanipes, M. I., S. R. Kalb, R. J. Cotter, D. F. Hozbor, A. Lagares & C. R. Raetz. 2003. Relaxed sugar donor selectivity of a *Sinorhizobium meliloti* ortholog of the *Rhizobium leguminosarum* mannosyl transferase LpcC. Role of the lipopolysaccharide core in symbiosis of Rhizobiaceae with plants. J. Biol. Chem. 278:16365-71.
- 25. Kanjilal, S., Basu, S. S., Kanipes, M. I. & Raetz C. R. H. 2005. Origin of the galacturonic acid modifications to the inner core of *Rhizobium leguminosarum* lipopolysaccharides. En: Memorias del XII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. p. 185. Mérida, Mexico.
- Kannenberg, E. L. & R. W. Carlson. 2001. Lipid A and Ochain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development. Mol. Microbiol. 39:379-91.
- 27. Kannenberg, E. L., B. L. Reuhs, L. S. S. Forsberg & R. W. Carlson. 1998. Lipopolysaccharides and K-antigens: their structures, biosynthesis, and functions. En: The Rhizobiaceae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Karbarz, M. J., S. R. Kalb, R. J. Cotter, C. R. H. Raetz. 2003. Expression cloning and biochemical characterization of a *Rhi-zobium leguminosarum* lipid A 1-phosphatase. J. Biol. Chem. 278:39269-39279.
- Lagares, A., D. F. Hozbor, K. Niehaus, A. J. Otero, J. Lorenzen, W. Arnold & A. Puhler. 2001. Genetic characterization of a *Sinorhizobium meliloti* chromosomal region in lipopolysaccharide biosynthesis. J. Bacteriol. 183:1248-58.
- 30. Lerouge, I., T. Laeremans, C. Verreth, J. Vanderleyden, C. Van Soom, A. Tobin & R. W. Carlson. 2001. Identification of an ATP-binding cassette transporter for export of the O-antigen across the inner membrane in *Rhizobium etli* based on the genetic, functional, and structural analysis of an *lps* mutant deficient in O-antigen. J. Biol. Chem. 276:17190-8.
- 31. Lerouge, I. & J. Vanderleyden. 2002. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. FEMS Microbiol. Rev. 26:17-47.
- 32. Lerouge, I., C. Verreth, J. Michiels, R. W. Carlson, A. Datta, M. Y. Gao & J. Vanderleyden. 2003. Three genes encoding for putative methyl- and acetyltransferases map adjacent to the *wzm* and *wzt* genes and are essential for O-antigen biosynthesis in *Rhizobium etli* CE3. Mol. Plant Microbe Interact. 16:1085-93.

175

- Lloret, L. & E. Martinez-Romero. 2005. Evolución y filogenia de rhizobia. Rev. Latinoam. Microbiol. 47: 43-60.
- 34. Lucas, M. M., J. L. Peart, N. J. Brewin & E. L. Kannenberg. 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.
- 35. Metts, J., J. West, S. H. Doares & A. G. Matthysse. 1991. Characterization of three *Agrobacterium tumefaciens* avirulent mutants with chromosomal mutations that affect induction of vir genes. J. Bacteriol. 173:1080-1087.
- Molinaro, A., C. De Castro, R. Lanzetta, M. Parrilli, A. Raio & A. Zoina. 2003. Structural elucidation of a novel core oligosaccharide backbone of the lipopolysaccharide from the new bacterial species *Agrobacterium larrymoorei*. Carbohydr. Res. 338:2721-2730.
- Neihardt, F.C., J.L. Ingraham & M. Schaechter. 1990. Physiology of the Bacterial Cell. A Molecular Approach, Sinauer Associates, Sunderland.
- Price, N. P. J., T. M. Kelly, C. R. H. Raetz & R. W. Carlson. 1994. Biosynthesis of a structurally novel lipid A in *Rhizobium leguminosarum*: identification and characterization of six metabolic steps leading from UDP-GlcNAc to 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid₂-lipid IV_A. J. Bacteriol. 176:4646-4655.
- 39. Price N. P., B. Jeyaretnam, R. W. Carlson, J. L. Kadrmas, C. R. Raetz, K. A. Brozek. 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.
- 40. Ormeño-Orrillo, E. & E. Martinez-Romero. 2004. Effect of mutations in LPS biosynthetic genes on the resistance of *Rhizobium tropici* to the fungicide captan. En: Memorias del 10th International Congress on Microbial Ecology. p. 90. Cancun, Mexico.
- 41. Que, N. L. S., S. Lin, R. J. Cotter & C. R. H. Raetz. 2000. Purification and mass spectrometry of six lipid A species from the bacterial endosymbiont *Rhizobium etli*. Demonstration of a conserved distal unit and a variable proximal portion. J. Biol. Chem. 275:28006-28016.
- 42. Que, N. L. S., A. A. Ribeiro & C. R. H. Raetz. 2000. Two dimensional NMR spectroscopy and structures of six lipid A species from *Rhizobium etli* CE3. Detection of an acyloxyacyl residue in each component and origin of the aminogluconate moiety. J. Biol. Chem. 275:28017-28027.
- 43. Que-Gewirth, N. L., S. Lin, R. J. Cotter & C. R. H. Raetz. 2003. An outer membrane enzyme that generates the 2-amino-2-deoxy-gluconate moiety of *Rhizobium leguminosarum* lipid A. J. Biol. Chem. 278:12109-19.
- 44. Que-Gewirth N. L., M. J. Karbarz, S. R. Kalb, R. J. Cotter, C. R. Raetz. 2003. Origin of the 2-amino-2-deoxy-gluconate unit in *R. leguminosarum* lipid A. Expression cloning of the outer membrane oxidase LpxQ. J. Biol. Chem. 278:12120-9

- Raetz, C. R. H. 1990. Biochemistry of endotoxins. Annu. Rev. Biochem. 59:129-170.
- Raetz, C. R. H. & C. Whitfield. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. Annu. Rev. Biochem. 71:635-700.
- 47. Reuhs, B. L., D. P. Geller, J. S. Kim, J. E. Fox, V. S. Kolli & S. G. Pueppke. 1998. *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. Appl. Environ. Microbiol. 64:4930-4938.
- Russa, R., M. Bruneteau, A. S. Shashkov, T. Urbanik-Sypniewska & H. Mayer. 1996. Characterization of the lipopolysaccharides from *Rhizobium meliloti* strain 102F51 and its nonnodulating mutant WL113. Arch. Microbiol. 165:26-33.
- 49. Sharypova, L. A., K. Niehaus, H. Scheidle, O. Holst & A. Becker. 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. 278:12946-54.
- Silipo, A., C. De Castro, R. Lanzetta, A. Molinaro & M. Parrilli. 2004. Full structural characterization of the lipid A components from the *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 lipopolysaccharide fraction. Glycobiology. 14:805-15.
- Urbanik-Sypniewska, T., U. Seydel, M. Greck, J. Weckesser & H. Mayer. 1989. Chemical studies on the lipopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* 10406 and its lipid A region. Arch. Microbiol. 152:527-532.
- 52. Vedam, V., E. L. Kannenberg, J. G. Haynes, D. J. Sherrier, A. Datta & R. W. Carlson. 2003. A *Rhizobium leguminosarum* AcpXL mutant produces lipopolysaccharide lacking 27-hydroxyoctacosanoic acid. J. Bacteriol. 185:1841-50.
- 53. Young, J. M., L. D. Kuykendall, E. Martinez-Romero, A. Kerr & H. Sawada. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:89-103.
- Wang, Y. & R. I. Hollingsworth. 1994. The structure of the Oantigenic chain of the lipopolysaccharide of *Rhizobium trifolii* 4s. Carbohydr. Res. 260:305-17.

Correspondencia:

Ernesto Ormeño-Orrillo Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Tel.: +52 777 3131697 Fax.: +52 777 3175581 E-mail: eormeno@ccg.unam.mx

