

123314

+
733



**ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LOS POLISACÁRIDOS
CAPSULARES DE *Sinorhizobium fredii***

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL**

Queda registrada esta Tesis Doctoral
folio 461 número 97 del libro
correspondiente.
Sevilla, 23 SET. 1999

El Jefe del Negociado de Teoría,

Memoria presentada por el Licenciado
Miguel Ángel Rodríguez Carvajal para
optar al grado de Doctor en Química.

Sevilla, Septiembre de 1999





**ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LOS POLISACÁRIDOS
CAPSULARES DE *Sinorhizobium fredii***

Vº Bº

Los directores de la Tesis

Fdo.:

Dr. Antonio M. Gil Serrano.

**Profesor Titular del Departamento
de Química Orgánica de la Facultad
de Química de la Universidad de
Sevilla**

Fdo.:

Dra. Pilar Tejero Mateo.

**Profesora Titular del Departamento
de Química Orgánica de la Facultad
de Química de la Universidad de
Sevilla**

1. Introducción	1
INTRODUCCIÓN.	3
1.1.1. Simbiosis <i>Rhizobiaceae</i> -leguminosa.	3
1.1.2. Proceso de infección.	4
1.1.2.1. Factores de nodulación.	6
1.1.2.2. Cicloglucanas.	6
1.1.2.3. Exopolisacárido (EPS).	7
1.1.2.4. Lipopolisacárido (LPS).	7
1.1.2.5. Polisacárido capsular (CPS).	8
1.1.3. La simbiosis <i>Sinorhizobium fredii</i> -soja.	10
1.1.4. Objetivo de la tesis.	11
2. Métodos generales	13
2.1. AISLAMIENTO DEL POLISACÁRIDO.	15
2.1.1. Extracción del polisacárido.	15
2.1.1.1. Eliminación de ácidos nucleicos y proteínas.	16
2.1.2. Cromatografía de filtración sobre gel.	16
2.1.2.1. Instrumentación y condiciones cromatográficas.	17
Cromatografía de capa fina (c.c.f.).	18
2.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE).	19
2.3. ESTUDIO ESTRUCTURAL DE POLISACÁRIDOS.	21
2.3.1. Análisis de azúcares.	21
2.3.1.1. Formación de O-trimetilsilil derivados de los metil glicósidos.	21
Cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM).	23
Instrumentación y condiciones cromatográficas.	28
2.3.2. Determinación de la configuración absoluta de los azúcares.	28
2.3.2.1. Formación de los 2-butilglicósidos.	30
Metanólisis seguida de butanólisis.	30
Instrumentación y condiciones cromatográficas (CG-EM).	30
2.3.3. Determinación del tipo de sustitución. Análisis por metilación.	32
2.3.3.1. Metilación del azúcar.	33
2.3.3.2. Purificación del azúcar permetilado.	34
2.3.3.3. Preparación de los acetatos de alditol parcialmente metilados.	35
Hidrólisis y reducción del azúcar permetilado.	35

Acetilación.	35
2.3.3.4. <i>Cromatografía de gases y espectrometría de masas de los monosacáridos parcialmente metilados.</i>	36
Instrumentación y condiciones cromatográficas.	39
2.3.4. Sustituyentes presentes en el azúcar.	39
2.3.4.1. <i>Localización de sustituyentes O-metilo.</i>	39
Instrumentación y condiciones cromatográficas.	40
2.3.5. Determinación de la secuencia de azúcares.	40
2.3.5.1. <i>Despolimerización parcial y aislamiento de los oligosacáridos resultantes.</i>	41
2.3.5.2. <i>Estudio estructural de los oligosacáridos.</i>	41
Prerreducción de los oligosacáridos.	41
2.3.6. Determinación del peso molecular.	42
2.3.6.1. <i>Espectrometría de masas. Bombardeo con átomos rápidos (FAB-EM).</i>	42
Materiales y métodos.	43
Aplicación de las muestras e instrumentación.	44
2.3.6.2. <i>Espectrometría de masas. MALDI-TOF.</i>	45
Instrumentación.	46
2.3.6.3. <i>Cromatografía de filtración sobre gel.</i>	46
Instrumentación y condiciones cromatográficas.	47
Calibrado de las columnas.	47
2.3.7. Resonancia Magnética Nuclear.	49
2.3.7.1. <i>Espectro monodimensional de ¹H-RMN.</i>	49
2.3.7.2. <i>Experimentos COSY (Correlated spectroscopy).</i>	49
2.3.7.3. <i>Experimento TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) u HOHAHA (Homonuclear Hartman-Hann Effect).</i>	50
2.3.7.4. <i>NOE y 2D-NOESY.</i>	51
2.3.7.5. <i>Espectro monodimensional de ¹³C.</i>	51
2.3.7.6. <i>Correlación heteronuclear ¹H-¹³C.</i>	51
2.3.7.7. <i>HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).</i>	52
2.3.7.8. <i>2D-HSQC-TOCSY.</i>	52
2.3.7.9. <i>Instrumentación.</i>	52
2.4. ESTUDIO CONFORMACIONAL.	54
2.4.1. Características generales.	54
2.4.1.1. <i>Efecto exo-anomérico.</i>	54
2.4.1.2. <i>Hidroxilos secundarios.</i>	55

2.4.1.3.	<i>Hidroximetilos.</i>	56
2.4.2.	Información obtenida por RMN.	57
2.4.2.1.	<i>Efecto NOE.</i>	57
2.4.2.2.	<i>Constantes de acoplamiento.</i>	57
2.4.2.3.	<i>Desplazamiento químico.</i>	58
2.4.3.	Modelado molecular.	58
2.4.3.1.	<i>Mecánica molecular.</i>	58
2.4.3.2.	<i>Dinámica molecular.</i>	60
2.4.3.3.	<i>Instrumentación.</i>	60
3.	Polisacárido aislado de <i>S. fredii</i> HH103	61
3.1.	DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR AISLADO DE <i>SINORHIZOBIUM FREDII</i> HH103.	63
3.1.1.	Cultivo de bacterias, aislamiento y purificación de los polisacáridos.	63
3.1.1.1.	<i>Separación de los polisacáridos presentes en la fase acuosa (AqHH).</i>	64
3.1.2.	Determinación del peso molecular.	65
3.1.2.1.	<i>Fracción AqHH-A.</i>	65
3.1.2.2.	<i>Fracción AqHH-B.</i>	66
3.1.2.3.	<i>Fracción AqHH-C.</i>	66
3.1.3.	Análisis por electroforesis en poliacrilamida.	66
3.1.4.	Estudio por RMN del polisacárido CPS-HH.	69
3.1.5.	Análisis de azúcares.	80
3.1.6.	Análisis por FAB y MALDI-TOF.	80
3.1.7.	Estudio por RMN del monosacárido de repetición.	82
3.1.8.	Análisis por impacto electrónico del monosacárido de repetición.	88
3.1.9.	Determinación de las posiciones de enlace en el polisacárido CPS-HH.	90
3.1.10.	Determinación de la configuración absoluta del grupo 3-hidroxitiramido.	92
3.2.	ESTUDIO CONFORMACIONAL EN DISOLUCIÓN DEL POLISACÁRIDO AISLADO DE <i>SINORHIZOBIUM FREDII</i> HH103 Y DE SU UNIDAD DE REPETICIÓN.	95
3.2.1.	Estudio conformacional del monosacárido de repetición.	95
3.2.1.1.	<i>Estudio de modelado molecular.</i>	96

3.2.1.2.	<i>Información obtenida por RMN.</i>	101
3.2.2.	Estudio conformacional del polisacárido.	103
3.2.2.1.	<i>Información obtenida por RMN.</i>	103
3.2.2.2.	<i>Estudio de modelado molecular.</i>	104
4.	Polisacárido aislado de <i>S. fredii</i> SVQ293	113
4.1.	DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR AISLADO DE <i>SINORHIZOBIUM FREDII</i> SVQ293.	115
4.1.1.	Cultivo de bacterias, aislamiento y purificación de los polisacáridos.	115
4.1.2.	Electroforesis de las fracciones AqSV-A y AqSV-B.	117
4.1.3.	Determinación del peso molecular.	118
4.1.4.	Análisis de azúcares de las fracciones AqSV-A y AqSV-B.	119
4.1.5.	Análisis de la configuración absoluta de los azúcares de CPS-SVQ.	122
4.1.6.	Análisis por metilación del polisacárido CPS-SVQ.	123
4.1.7.	Estudio por RMN del polisacárido CPS-SVQ.	126
4.1.8.	Estudio del oligosacárido de repetición.	133
4.1.9.	Análisis por metilación del oligosacárido de repetición.	134
4.1.10.	Estudio por RMN del trisacárido de repetición.	138
4.2.	ESTUDIO CONFORMACIONAL EN DISOLUCIÓN DE LA UNIDAD DE REPETICIÓN DEL CPS DE <i>S. FREDII</i> SVQ293.	144
4.2.1.	Análisis conformacional. Estudios de dinámica molecular.	144
4.2.2.	Información obtenida por RMN.	153
5.	Relación estructura-características simbióticas	159
5.1.	RELACIÓN ESTRUCTURA-CARACTERÍSTICAS SIMBIÓTICAS.	161
6.	CONCLUSIONES	163
6.1.	CONCLUSIONES	165
7.	Bibliografía	169
	BIBLIOGRAFÍA.	171

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN.

El estudio de la simbiosis entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y las plantas leguminosas es un tema de enorme interés: por un lado, se intenta reducir el uso de fertilizantes nitrogenados, que plantean una serie de problemas como son su elevado coste de producción y la contaminación debida a su uso indiscriminado; por otro lado, la simbiosis *Rhizobiaceae*-leguminosa permite el estudio de los procesos de reconocimiento celular entre la bacteria y la planta hospedadora y, por tanto, proporciona un sistema atractivo para elucidar las bases moleculares de las interacciones que los microorganismos (patógenos o simbióticos) establecen con las plantas.

1.1.1. Simbiosis *Rhizobiaceae*-leguminosa.

La primera explicación sobre la fijación biológica de nitrógeno fue dada en 1888 por Hellriegel y Wilfarth.¹ A partir de entonces, este proceso adquirió gran importancia por sus aplicaciones prácticas, así como por las perspectivas futuras que presentaba para la investigación. De hecho, ya en la primera década del aislamiento de *Rhizobium* se constituyó en Inglaterra la primera empresa productora de inoculantes (Nitragin).

La fijación de nitrógeno es un proceso natural exclusivo de los microorganismos procariotes que consiste en la reducción de nitrógeno atmosférico (N_2) a ion amonio (NH_4^+) que es la forma asimilable por las plantas. La inmensa mayoría de los microorganismos fijadores de nitrógeno pertenecen al grupo de las proteobacterias, dentro del cual se encuentran la familia *Rhizobiaceae*, donde existen tres géneros capaces de establecer simbiosis con plantas leguminosas: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. Todas ellas son bacterias Gram-negativas presentes en el suelo, capaces de establecer una relación simbiótica con leguminosas, formando un órgano especializado llamado nódulo en donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. El amonio producido durante este proceso es asimilado por la planta. Por su parte, la bacteria recibe fuentes de carbono, producto de la fotosíntesis vegetal, en un nicho ecológico (el nódulo) que no es accesible para otras bacterias y, por tanto, favorable para su multiplicación y supervivencia.

La especificidad en la relación simbiótica varía considerablemente entre los distintos rizobios. Así, por ejemplo, *Rhizobium* sp. NGR234 es capaz de nodular en más de setenta especies distintas de leguminosas y en la no leguminosa *Parasponia*, mientras que otros rizobios tienen un rango de hospedador mucho más reducido, discriminando incluso entre genotipos dentro de una misma especie de leguminosa.

1.1.2. Proceso de infección.

El proceso de infección es complejo y tiene varias etapas en las que intervienen un gran número de genes, tanto de la planta como de la bacteria (Figura 1.1). Se inicia con la multiplicación de los rizobios en la rizosfera y en la superficie de las raíces de la planta y la emisión por parte de la leguminosa de ciertos flavonoides. Dichos flavonoides, si son reconocidos por la bacteria, activan en ésta la transcripción de los llamados genes de nodulación (genes *nod*, *nol* y *noe*): Estos genes de nodulación, entre otras funciones, actúan en la síntesis, regulación y excreción de los factores de nodulación.

Una de las primeras fases del reconocimiento entre la bacteria y la leguminosa es la unión del microorganismo a los pelos radicales de la planta. (Figura 1.1, 1 y 2). El proceso de adhesión ocurre en dos fases: inicialmente, los rizobios se unen débilmente a la raíz, produciéndose a continuación una adherencia firme y la acumulación de células bacterianas en la superficie del pelo radical. Se postula que las interacciones entre las lectinas de la planta y los polisacáridos (EPS, LPS o CPS) de la superficie de la bacteria, son los responsables de las uniones de tipo débil. Las uniones posteriores, de tipo fuerte, parecen estar mediadas por microfibrillas de celulosa. A continuación, se produce la curvatura del pelo radical, donde la bacteria queda atrapada, iniciándose la formación del tubo de infección por invaginación de la pared del mismo (Figura 1.1, 3-5).

Paralelamente al desarrollo del tubo de infección, se induce la división y diferenciación de las células internas del córtex, formándose el llamado primordio nodular, a partir del cual se va a originar el nódulo maduro para la fijación de N₂. Mediante el crecimiento del tubo de infección, la invasión bacteriana puede atravesar las células de la corteza de la raíz y llegar al nódulo incipiente. En él, las bacterias son liberadas mediante extrusión de la pared del tubo de infección, quedando rodeadas de la membrana peribacterioride (6). El conjunto formado por

la membrana peribacteroide y la bacteria se denomina simbiosoma. A medida que la bacteria se divide en el simbiosoma, también lo hace la membrana (7). Por último, se produce la diferenciación de las bacterias, alcanzándose la “forma simbiótica” denominada bacteroide, y que es en la que se desarrolla fijación de nitrógeno atmosférico. Esta diferenciación suele estar acompañada de un aumento del volumen de la bacteria, así como de un cambio de su morfología de bacilo corto a formas más o menos distorsionadas (8). Con la formación del nódulo concluye el proceso de infección.

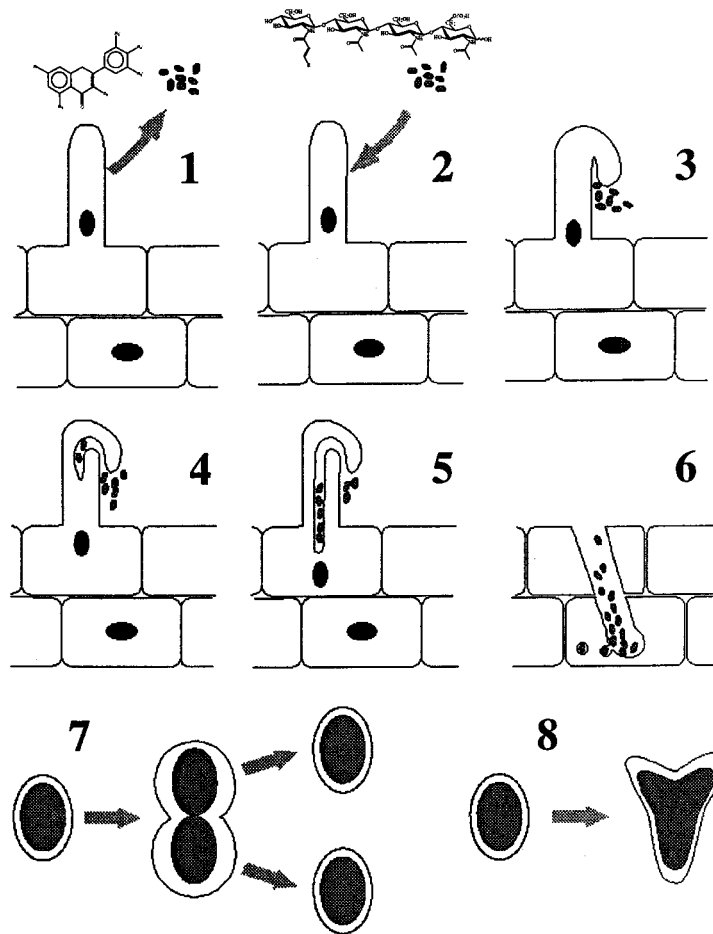


Figura 1.1. Esquema del proceso de infección.

En el proceso de simbiosis bacteria-planta juegan un papel importante un conjunto de carbohidratos, tanto polisacáridos como oligosacáridos. Todos ellos están implicados de una u otra forma en el mecanismo molecular de la interacción simbiótica. Éstos son:

- Factores de nodulación.
- Cicloglucanas periplasmáticas.
- Polisacáridos superficiales: Exopolisacáridos (EPS), polisacáridos capsulares (CPS) y lipopolisacáridos (LPS).

1.1.2.1. Factores de nodulación.

También llamados moléculas señal o de reconocimiento, disparan la organogénesis del nódulo al ser reconocidos por la planta. En algunos casos se ha podido inducir la formación de un nódulo completo en plantas de alfalfa crecidas en ausencia de microorganismos con sólo añadir estos compuestos a muy bajas concentraciones.² Asimismo, pueden inducir la deformación, ramificación y curvatura de los pelos radicales a concentraciones pico o nanomolares.^{2,3,4}

Son lipooligosacáridos de quitina (LCOs), es decir, oligosacáridos de *N*-acetil-D-glucosamina (3 a 5 unidades) enlazadas por uniones β -(1→4) y *N*-aciladas por un ácido graso de naturaleza variable en el terminal no reductor. Pueden presentar diversos tipos de sustituyentes tanto en el terminal reductor como en el terminal no reductor.

1.1.2.2. Cicloglucanas.

Las cicloglucanas son moléculas producidas por bacterias Gram-negativas que se encuentran en el espacio periplasmático existente entre la pared celular y la membrana citoplasmática. Sus funciones son variadas: anclaje de la bacteria a la planta hospedadora, mantenimiento del potencial osmótico del periplasma bacteriano o agente encapsulador de moléculas hidrofóbicas.

Están formadas por oligosacáridos cíclicos de glucosa, en los que el enlace glicosídico es β -(1→2) (en *Rhizobium* y *Agrobacterium*) o β -(1→3) y β -(1→6) en *Bradyrhizobium*.

1.1.2.3. Exopolisacárido (EPS).

Las bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, al igual que otras muchas bacterias, son capaces de excretar polisacáridos. Aquellos que forman una capa adherida a la superficie celular se denominan polisacáridos capsulares (CPS), mientras que se denominan exopolisacáridos (EPS) a aquellos que mantienen una asociación muy débil con la célula y que, por tanto, una cantidad sustancial de estos polisacáridos se separa de la bacteria y aparece en el líquido metabólico del cultivo. El hecho de que los EPS constituyan la capa más externa de la superficie celular contribuye a la protección de la bacteria frente a influencias medioambientales, ayuda a la adhesión a superficies, y a la acción antigénica. La diversidad estructural de los oligosacáridos derivados de los EPS permite que actúen además como moléculas portadoras de información en la comunicación célula-célula.

Los EPS pueden ser tanto homo- como heteropolisacáridos, lineales o ramificados. Los azúcares componentes de estos polisacáridos son principalmente monosacáridos comunes como D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico. Entre los sustituyentes se encuentran frecuentemente grupos *O*-acetilo, piruvato y succinato. Además de los ácidos urónicos, estos sustituyentes son los responsables del carácter ácido de la mayoría de los EPS de rhizobium.

1.1.2.4. Lipopolisacárido (LPS).

Los lipopolisacáridos son componentes característicos de las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas, así como de algunas cianobacterias. Se encuentran en la capa más externa de la membrana exterior de la célula, tienen capacidad antigénica y contribuyen a la integridad de dicha membrana y protegiendo a la célula frente a la fagocitosis y la lisis.

Estructuralmente, están formados por tres regiones (Figura 1.2):

- La cadena *O*-específica (*O*-antígeno), en la mayoría de los casos formada por oligosacáridos de naturaleza muy variable tanto en composición, como en la secuencia o la anomería del enlace. Entre los azúcares que la componen, según las diferentes cepas, se encuentra glucosa, fucosa, galactosa, aminoazúcares, heptosas y ácidos urónicos.
 - Oligosacáridos internos (*core*). Esta región está compuesta por tri y tetrasacáridos que se unen a la cadena *O*-específica y al lípido A a través
-

de residuos de Kdo (ácido 3-desoxi-D-*mano*-2-octulosónico). La diversidad estructural de esta región es pequeña.

- **Lípido A.** Es la región estructuralmente más constante, formada por aminoazúcares y ácidos urónicos, por un lado, y ácidos grasos, por otro. Es la parte hidrofóbica del LPS y es la que se une a la membrana exterior, mientras que la parte polisacáridica se proyecta hacia el exterior de la célula.

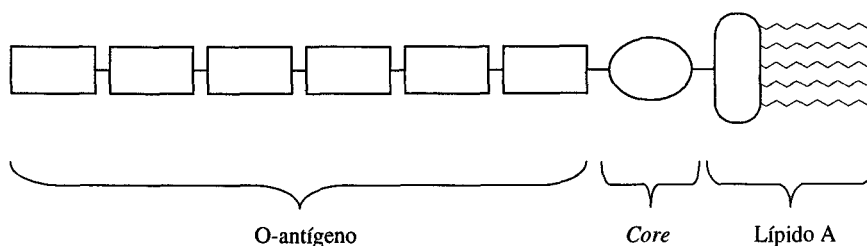


Figura 1.2. Esquema de la estructura del lipopolisacárido.

1.1.2.5. Polisacárido capsular (CPS).

En contraste con los EPS, que son excretados al medio de cultivo, los CPS están fuertemente asociados a las células bacterianas, aunque no hay ninguna evidencia hasta ahora de que los polisacáridos capsulares de los rizobios se encuentren unidos a la membrana a través de un grupo análogo al lípido A, como en el LPS, o al ácido fosfatídico, como en otros CPS. Además, estructuralmente son también diferentes a los LPS, ya que contienen una mayor proporción de Kdo o algún derivado de éste, y tienen una mayor densidad de carga, con cargas negativas en cada unidad de repetición o incluso en cada azúcar.

La producción de CPS en los rizobios fue demostrada por primera vez en *S. fredii* USDA205.⁵ Se aisló un nuevo tipo de polisacárido que contenía como unidad de repetición un disacárido de Kdo y galactosa: $[\rightarrow)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{5)-}\beta\text{-D-Kdop(2}\rightarrow\text{)]}_n$, que es estructuralmente análogo a los polisacáridos capsulares del grupo II encontrados en *E. coli*. Esta cepa también produce un segundo polisacárido, compuesto por Kdo y 2-*O*-metilmanosa. Posteriormente, el estudio estructural de *S. fredii* USDA257 mostró que dicha cepa también produce dos polisacáridos distintos:⁶ un CPS principal, formado por Kdo y manosa: $[\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-$

Manp-(1→5)-β-D-Kdop-(2→], y un CPS secundario formado por Kdo y 2-O-metilmanosa: [→3)-β-D-2-O-Me-Manp-(1→5)-β-D-Kdop-(2→]. Finalmente, el estudio de más de 20 cepas de *S. fredii*, *S. meliloti* y *Rhizobium* sp. NGR234 ha mostrado que cada cepa produce CPS y se ha postulado un motivo estructural general que se conserva entre especies:⁷ las unidades de repetición consisten en disacáridos en los que una molécula de Kdo o un derivado de éste (Kdx) se une a otro azúcar, generalmente neutro (Sug): Sug-Kdx. A pesar de este hecho, la estructura de estos CPS sigue siendo muy variable en composición, enlace, sustituyentes y rango de tamaños.

Las funciones tanto del LPS como del CPS en los procesos de infección y nodulación no están bien definidas debido, en parte, a la falta de datos estructurales que permitan establecer correlaciones significativas. A pesar de estas deficiencias, sí se conoce que los polisacáridos superficiales de la bacteria juegan un papel muy importante en el proceso de reconocimiento planta-microorganismo y en los pasos sucesivos que llevan a la formación de un nódulo fijador de nitrógeno. El proceso es muy complejo ya que, además, los polisacáridos superficiales se ven alterados en presencia de compuestos producidos por la leguminosa hospedadora⁸, y, a su vez, estos polisacáridos pueden desencadenar respuestas de la planta. En general, se cree que una de las funciones principales de los polisacáridos de *Rhizobium* es atenuar la respuesta de defensa de la planta ante la infección de la bacteria.

En la siguiente figura se esquematiza la organización molecular de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas:

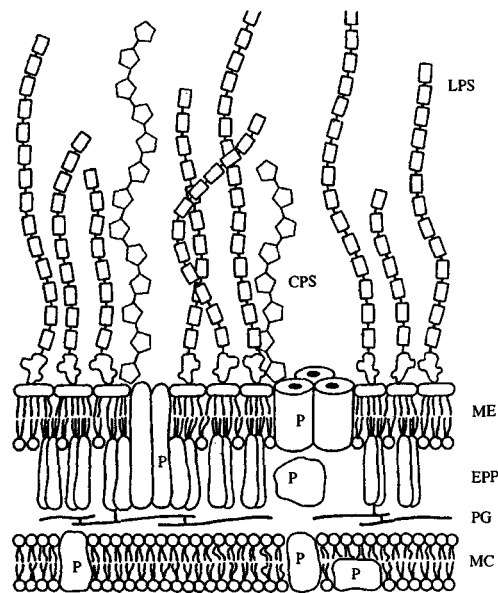


Figura 1.3. Arquitectura molecular de la pared de las células Gram-negativas. La membrana citoplasmática (MC) está compuesta por una bicapa de fosfolípidos en las que se hayan incluidas diversas proteínas (P). La membrana externa (ME) está compuesta por una capa lipídica asimétrica; la capa interna la forman fosfolípidos y lipoproteínas, mientras que la externa está formada por el lípido A de los LPSs. El CPS se encuentra asociado a dicha membrana externa. La dos membranas están separadas por una capa de peptidoglicano (PG) y el espacio periplasmático (EPP), donde se encuentran las cicloglucanas.

1.1.3. La simbiosis *Sinorhizobium fredii*-soja.

Hasta 1982, se creyó que la soja sólo formaba simbiosis fijadoras de nitrógeno con las bacterias de la especie *Bradyrhizobium japonicum*. Sin embargo, en dicho año, Keyser y colaboradores⁹ aislaron a partir de nódulos de plantas de soja cultivadas en China cepas de *Rhizobium* que nodulaban de forma efectiva en las variedades asiáticas de soja. Estas cepas han sido agrupadas en la especie *Sinorhizobium fredii* y parecen estar muy relacionadas con las cepas que nodulan en la alfalfa (*Sinorhizobium meliloti*).¹⁰ La mayoría de las cepas de *S. fredii* se han aislado en el extremo oriente,^{9,11,12} lo que es lógico si consideramos que China es el

origen geográfico de la soja y sus microsimbiontes han debido coevolucionar con la planta.

El primer grupo de cepas de *S. fredii* aislado por Keyser sólo era efectivo con las variedades asiáticas de soja, siendo inefectivo (no nodulaba o no fijaba nitrógeno) con las variedades americanas de soja, que son las de mayor interés agrícola. Este hecho originó la creencia de que las cepas de *S. fredii* tenían un valor muy escaso como inoculantes comerciales de soja.^{10,13,14} Esta situación se ha modificado a partir de:

- i) El aislamiento de nuevas cepas de *S. fredii* (cepas con las siglas "HH") que, en condiciones de invernadero, formaban simbiosis efectivas con las variedades comerciales de soja, y
- ii) La obtención de mutantes de las cepas aisladas por Keyser y col. que, por efecto de la mutación, son ahora capaces de nodular efectivamente en todas las variedades comerciales de soja ensayadas.

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha demostrado por primera vez que algunas cepas de *S. fredii* aisladas de suelos chinos (como HH103 y HH102-2) y una cepa aislada de suelos de Vietnam (SMH12) son tan buenos inoculantes para la soja (en base a la producción de semillas y/o peso seco de las plantas) como las estirpes de *B. japonicum* que tradicionalmente se usan como inoculantes comerciales de soja.^{15,12}

1.1.4. Objetivo de la tesis.

En esta tesis se ha investigado la estructura de los polisacáridos capsulares aislados de la cepa HH103 de *Sinorhizobium fredii* y de un mutante (SVQ293) derivado de ésta, y se ha procedido a su estudio conformacional. Este trabajo se incluye dentro de un proyecto de investigación dedicado al estudio de los diversos carbohidratos producidos por estas cepas. Anteriormente han sido estudiados los factores de nodulación de HH103.¹⁶

La presente tesis está dividida en cuatro capítulos. En el primero se presenta la introducción. El segundo corresponde a los métodos generales utilizados. En el tercero se describe la determinación estructural del CPS aislado de *S. fredii* HH103 y su estudio conformacional. El cuarto describe también la determinación y el

estudio conformacional del CPS aislado del mutante SVQ293. Finalmente, se recogen las conclusiones y la bibliografía.

2. MÉTODOS GENERALES

2.1. AISLAMIENTO DEL POLISACÁRIDO.

El aislamiento de los polisacáridos superficiales de las células bacterianas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de extracción de lipopolisacáridos (LPS). Para ello existen diversos métodos, entre los que podemos destacar:

- Extracción con ácido tricloroacético en frío.¹⁷ Es el método más simple y el primero que se empleó.
- Extracción con etilenglicol anhidro.¹⁸ Este método se realiza en condiciones muy suaves y el grado de degradación o modificación del material extraído es bajo.
- Extracción con dimetilsulfóxido.¹⁹ Se realiza en caliente y extrae el LPS cuantitativamente, aunque junto con una gran cantidad de proteína.
- Extracción con fenol-agua.²⁰ Este método es el más utilizado y el que se emplea en esta tesis. A pesar de que el LPS se extrae contaminado con proteínas,²¹ es un método eficiente para la extracción de (lipo)polisacáridos de bacterias Gram-negativas, incluidos los LPS de cepas rugosas, donde los dos primeros métodos mencionados no son eficaces.

2.1.1. Extracción del polisacárido.

El lipopolisacárido y el polisacárido capsular se extraen de las células liofilizadas, que previamente han sido separadas del medio de cultivo por centrifugación. Dicha extracción se hace con una mezcla de fenol-agua 1:1.²⁰ El residuo de células (5 g) se suspende en una disolución de fenol-agua (1:1) (100 ml) a 65 °C y se agita durante 15 min; posteriormente, se enfría con hielo durante 15 min y se centrifuga a 13.000 g durante 20 min a 5 °C, separándose dos fases: una fase fenólica y una fase acuosa, junto con un residuo sólido. A la fase fenólica se le añade 50 ml de agua y se repite la extracción, uniéndose la nueva fase acuosa a la anterior.

En la mayoría de los casos, el lipopolisacárido se aísla en la fase acuosa. Las dos fases, fenólica y acuosa, se dializan exhaustivamente frente a agua.

2.1.1.1. Eliminación de ácidos nucleicos y proteínas.

En el proceso de aislamiento del lipopolisacárido mediante el método del fenol-agua se extraen también ácidos nucleicos procedentes de las bacterias. que se eliminan mediante el siguiente tratamiento:²²

La disolución procedente de la diálisis se concentra hasta unos 10-20 ml y se pasa a través de una columna de resina aniónica Amberlite IRA 400 (AcO⁻) (30 x 1,6 cm), eluyendo con agua. Los eluatos (500 ml) se concentran y liofilizan. El residuo seco se disuelve en una disolución tampón compuesta por MgSO₄ 10 mM y Tris · HCl 50 mM (100 ml), a pH 7,0. Se añade ribonucleasa (RNasa A, 1 mg) y desoxirribonucleasa (DNasa I, 1 mg), y se mantiene en agitación durante toda la noche a 5 °C. Posteriormente se añade Proteinasa K (10 mg) y la solución se agita durante 24 h a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, la disolución se dializa exhaustivamente y se liofiliza, obteniéndose los polisacáridos libres de ácidos nucleicos y proteínas. Este tratamiento se lleva a cabo sobre las dos fracciones procedentes de la extracción una vez dializadas.

2.1.2. Cromatografía de filtración sobre gel.

En el proceso de aislamiento se extraen tanto el lipopolisacárido como el polisacárido capsular, pero, además, éstos suelen ir acompañados de otros polisacáridos celulares, como por ejemplo glucanas y cicloglucanas. La separación de estos polisacáridos se realiza mediante cromatografía de filtración sobre gel²³ (c.f.g.). En esta técnica, las moléculas en disolución son separadas de acuerdo a sus diferentes tamaños a medida que pasan a través de una columna empaquetada con un gel: los poros en el gel, que están llenos de la fase líquida, son de un tamaño comparable al de las moléculas que se quieren separar, de modo que las moléculas relativamente pequeñas entran en ellos y son retenidas, y las de mayor tamaño lo hacen en menor grado y se eluyen antes.

Dependiendo del rango de tamaño de las moléculas a separar se han utilizado varios geles: Sephacryl (S-500 y S-400), para moléculas de gran tamaño, y Sephadex (G-50 y G-15), para la separación de moléculas pequeñas o la eliminación de sales.

2.1.2.1. Instrumentación y condiciones cromatográficas.

En todos los casos se han utilizado indistintamente los siguientes dispositivos:

- Bomba peristáltica: los modelos de Pharmacia LKB P-1 y P-3.
- Detectores de índice de refracción: los modelos LKB Bromma 2142 (Pharmacia) y RefractoMonitor IV (Thermo Separation Products).
- Registradores: Pharmacia LKB REC 101 y LKB REC 1.
- Colectores: Pharmacia LKB FRAC 100 y LKB Redifrac.

Dependiendo del tamaño de las moléculas a separar, se utilizaron distintas columnas:

- Columna rellena de Sephacryl S-500 (Pharmacia): Rango de fraccionamiento para dextranos de 40.000 a 20.000.000 Daltons. Se utiliza una columna de la firma Pharmacia (2,6 × 100 cm). El flujo del eluyente se controla con una bomba peristáltica. El eluyente utilizado es una disolución de NaCl 0,2 M / NaN₃ 0,02 %. El flujo empleado es de 10 a 12 ml/h según los casos. Las muestras se disuelven en el mismo eluyente y se recogen fracciones de 2-4 ml con el colector automático. La detección se realiza mediante el detector de índice de refracción conectado a un registrador.
 - Columna rellena de Sephadex G-50 (Pharmacia): Rango de fraccionamiento para dextranos de 500 a 10.000 Daltons. Se usa una columna de la firma Pharmacia (1,6 × 60 cm). El eluyente utilizado es H₂O. La muestra se prepara en el mismo eluyente y se eluye a un flujo de 6-10 ml/h.
 - Columna rellena de Sephadex G-15 (Pharmacia): Rango de fraccionamiento para dextranos de hasta 1.500 Daltons. Se usa una columna de la firma Pharmacia (1,6 × 60 cm). El eluyente utilizado es H₂O. La muestra se prepara en el mismo eluyente. El flujo empleado es de 10 a 14 ml/h.
-

Cromatografía de capa fina (c.c.f.).

Esta técnica cromatográfica se utiliza en esta tesis para el control de las separaciones realizadas previamente por c.f.g.

La separación de los polisacáridos se realiza en función de la polaridad y el grado de polimerización (peso molecular) de los componentes de la mezcla. Dicha separación depende igualmente de la polaridad del eluyente y de la fase estacionaria que se utilice.²⁴ Se utilizan fases estacionarias polares, como el gel de sílice u óxido de magnesio hidratado, para la separación de azúcares con sustituyentes de baja polaridad.

Se han empleado placas de gel de sílice 60. La placa se introduce en un recipiente cromatográfico y se eluye con *n*-BuOH:AcOH:H₂O (2:1:1) utilizando la técnica ascendente. Se deja secar y se pulveriza con una disolución de orcinol-sulfúrico²⁵ y se calienta a 100°C. Las disoluciones de referencia se preparan con azúcares comerciales a una concentración del 2% para los monosacáridos y del 5% para los oligosacáridos. El proceso de elución no se realiza si la muestra es de alto peso molecular, sirviendo la placa en este caso sólo como soporte para detectar la presencia de azúcares.

El reactivo revelador se prepara disolviendo orcinol (3,5-dihidroxitolueno) (200 mg) en H₂SO₄ al 20% (100 ml). El azúcar aparece con una coloración violeta.

2.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE).

Las fracciones obtenidas en el proceso de purificación se analizan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. La electroforesis se basa en el movimiento de partículas cargadas cuando se someten a un campo eléctrico. De este modo, la muestra se introduce en un gel impregnado con un electrolito y se aplican electrodos en los extremos. La movilidad de los iones depende del peso molecular, el campo eléctrico aplicado y la viscosidad del medio. Por último, la carga eléctrica de la especie a separar se puede modificar cambiando el pH del electrolito.

La distinción entre aquellas fracciones que contienen LPS y las que contienen CPS radica en la capacidad de agregación de los lipopolisacáridos. Así, estos últimos sólo pueden penetrar en el gel en presencia de un tensioactivo, en este caso dodecilsulfato sódico (SDS), mientras que los polisacáridos capsulares sufren electroforesis independientemente de la presencia o no de SDS.²⁶ Sin embargo, en el proceso del revelado del CPS es necesario un tratamiento previo con azul alciano, un colorante catiónico, para evitar la pérdida del polisacárido en los sucesivos lavados.

En general, las células de las cepas que se estudian en esta tesis se cultivaron en medio TY y se separaron de éste por centrifugación. El residuo obtenido fue degradado calentándolo durante 5 min a 100 °C en 125 µl de tampón Tris · HCl 60 mM, pH 6,8 / SDS al 1 % (p/v) y posteriormente se diluyó hasta 1 ml con el mismo tampón pero sin SDS. El extracto crudo se trató con Rnasa, Dnasa y proteinasa K, tal como describen Köplin et al.²⁷ Las electroforesis de los extractos y de las fracciones purificadas se realizaron en un gel de poliacrilamida al 16,5 % (p/v), con el sistema de tampón de tricina descrito por Lesse et al.²⁸

A la hora de visualizar los lipopolisacáridos, los geles se revelaron con plata de acuerdo al método de Kittelberger y Hilbink.²⁹ Para el revelado de lipopolisacáridos y polisacáridos capsulares, los geles se fijaron con azul alciano³⁰ y posteriormente revelados con plata con el método descrito por Tsai y Frasch.³¹

La electroforesis en un gel sin SDS se realizó, al igual que las anteriores, en un sistema de electroforesis vertical (Hofer-Pharmacia Biotech), con geles continuos de 0,75 mm de grosor. En este caso, la concentración de acrilamida fue del 17 %, y la relación acrilamida : *N,N'*-metilenbisacrilamida 30:0,8. El tampón empleado fue Tris 50 mM, AEDT 13 mM y ácido bórico 15 mM (pH 8,5). Las muestras se disolvieron en el mismo tampón y se diluyeron en dos volúmenes de

sacarosa 1 M. En el revelado, los geles se fijaron con azul alciano en ácido acético y posteriormente revelados con plata.³¹

Por último, los geles se secaron y analizaron usando un densitómetro láser Pharmacia-LKB Ultrascan XL.

2.3. ESTUDIO ESTRUCTURAL DE POLISACÁRIDOS.

El estudio estructural de un polisacárido incluye:

- El análisis de los monosacáridos que constituyen la unidad de repetición (identificación y determinación de la configuración absoluta –serie D o L).
- Los tipos de enlace glicosídico entre estos monosacáridos (posiciones de enlace y anomería).
- La secuencia de dichos enlaces: el orden de las unidades identificadas.
- Identificación de posibles sustituyentes y determinación de las posiciones que ocupan.
- La determinación del peso molecular.

2.3.1. Análisis de azúcares.

El conocimiento de los monosacáridos que componen el polisacárido requiere previamente una despolimerización total del mismo. Ésta se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante hidrólisis, metanólisis o acetólisis. La posterior determinación cuantitativa de los monosacáridos se realiza principalmente mediante cromatografía gas-líquido seguida de espectrometría de masas (CG-EM) de dichos monosacáridos derivatizados.

La aplicación de la CG-EM en el análisis de azúcares está ampliamente extendida ya que se necesita poca cantidad de muestra. Esta técnica requiere transformar los monosacáridos procedentes de la despolimerización total, en derivados volátiles tales como *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos, acetatos de alditoles, trifluoroacetatos, etc. En esta tesis, se utilizan los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos.³²

2.3.1.1. Formación de *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos.

La preparación de los *O*-trimetilsilil derivados de los metil glicósidos, tiene la ventaja de que permite la identificación simultánea de azúcares neutros, aminoazúcares y ácidos urónicos. El proceso se esquematiza en la Figura 2.1.

Inicialmente se lleva a cabo una metanólisis para despolimerizar la muestra, obteniéndose los metil glicósidos.

Para ello, la muestra (30-80 μg) y *meso*-inositol (patrón interno, 3-6 μg) se liofilizan en un tubo, se añade HCl/MeOH 0,625 M (0,5 ml) y se calienta a 80°C durante 16 h. A continuación se añade isobutanol (100 μl) y se seca bajo corriente de N_2 .

A continuación, se forman los *O*-trimetilsilil derivados de los grupos hidroxilos de los metil glicósidos. Los procedimientos que se siguen son, bien el descrito por Chaplin,³² o bien una modificación de éste. Según el método de Chaplin, al residuo seco se le añade bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA, 400 μl) y piridina (400 μl) y se mantiene 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. De acuerdo con el procedimiento modificado, se añade a la muestra procedente de la metanólisis, 320 μl de una mezcla de piridina, bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA, Supelco, Inc.) y clorotrimetilsilano (TMSC, Supelco, Inc.), en las proporciones 10:5:1 (v/v/v); la mezcla se deja al menos una hora en la oscuridad. Este segundo método tiene la ventaja de que el tiempo de reacción es más corto.

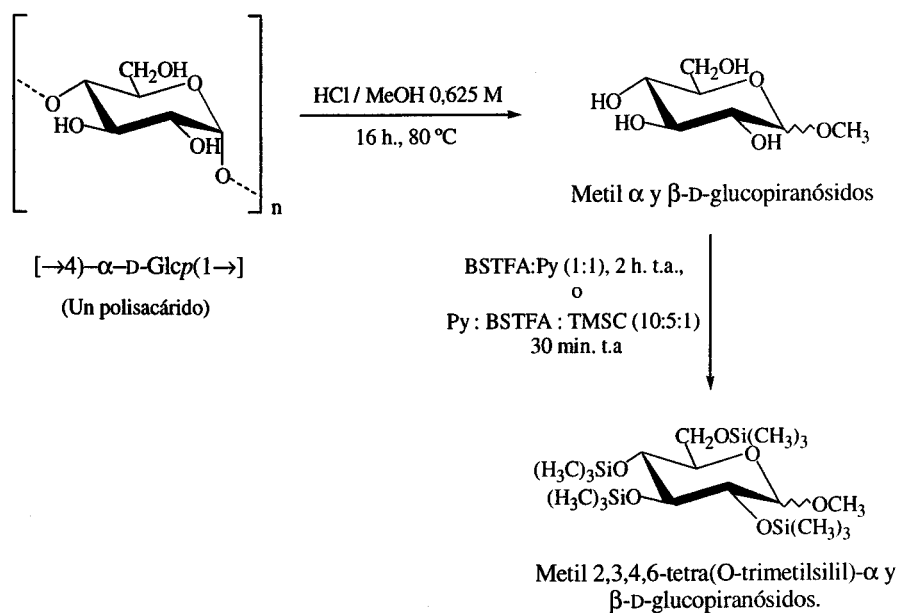


Figura 2.1 Formación de los *O*-trimetilsilil derivados de los metil glicósidos de un polisacárido.

A continuación, se seca bajo corriente de N_2 y se inyecta en el cromatógrafo de gases disuelto en hexano.

Cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM).

Los derivados sililados se analizan por CG-EM.^{33,34} El esquema de fragmentación se muestra en la Figura 2.2. Los espectros de masas de estos compuestos son muy característicos, dando fundamentalmente los iones de m/z 204 y m/z 217 para los azúcares neutros. Para el caso de aminoazúcares, los fragmentos más característicos son los m/z 131, y m/z 173 si se ha reacetilado.³⁵

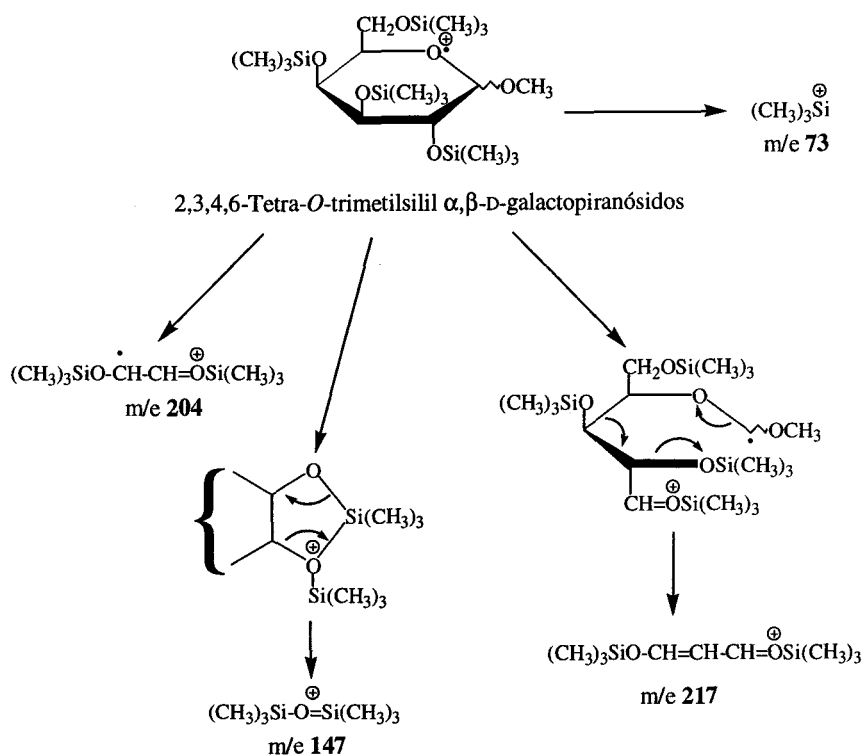


Figura 2.2 Fragmentaciones características de los *O*-trimetilsilil derivados de los metil glicósidos de D-galactosa.

La identificación se realiza por comparación con los cromatogramas obtenidos para muestras patrones. Los patrones utilizados y sus tiempos de retención se detallan en la Tabla 2.1. En las figuras siguientes se muestran los cromatogramas obtenidos para la D-glucosa y el Kdo, y los espectros de masas de los picos cromatográficos mayoritarios.

Azúcar	Nº de Scan	t _R	t _{RR} ^a	Areas relat.
D-Ribosa	53	3:57	0,145	0,86
	60	4:05	0,164	0,12
	107	4:56	0,293	0,02
D-Manosa	181	6:15	0,496	–
	237	7:16	0,649	0,72
D-Glucosa	250	7:30	0,685	0,28
	155	5:47	0,425	0,25
	178	6:12	0,488	0,06
Ácido galacturónico	215	6:52	0,589	0,53
	220	6:58	0,603	0,16
	58	4:03	0,159	–
L-Ramnosa	61	4:06	0,167	0,06
	74	4:20	0,203	0,61
	86	4:33	0,236	0,33
D-Galactosa	184	6:19	0,504	0,07
	204	6:40	0,559	0,73
	223	7:01	0,611	0,20
Ácido glucurónico	147	5:39	0,403	0,23
	241	7:20	0,660	0,13
	245	7:25	0,671	0,64
D-Arabinosa	43	3:46	0,118	0,72
	46	3:50	0,126	0,28
	295	8:19	0,808	0,17
Kdo	322	8:48	0,882	0,09
	337	9:04	0,923	0,62
	343	9:10	0,940	0,07
	382	9:53	1,047	0,05
Kdn	467	11:24	1,279	–

^a Tiempo de retención relativo (t_R/t_R⁰) al 1,2,3,4,5,6-hexa-*O*-trimetilsilil *meso*-inositol (t_R⁰ = 9:34 min)

Tabla 2.1 Datos de CG-EM de los *O*-trimetilsilil derivados de los metil glicósidos de varios monosacáridos.

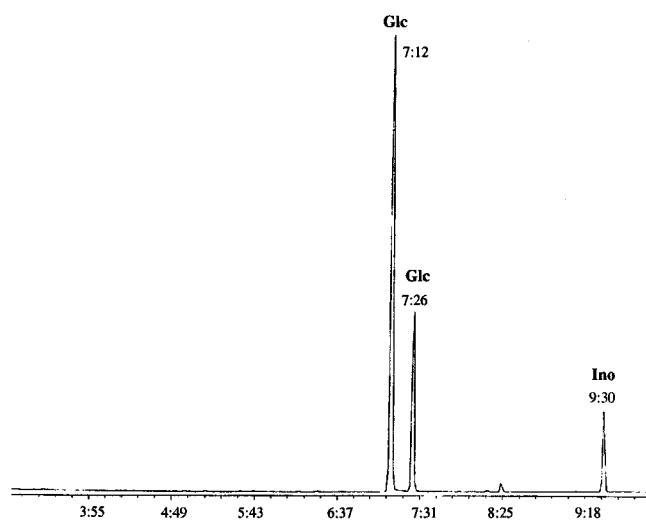


Figura 2.3. CG-EM de los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos de D-glucosa. (**Glc:** Glucosa, **Ino:** Inositol)

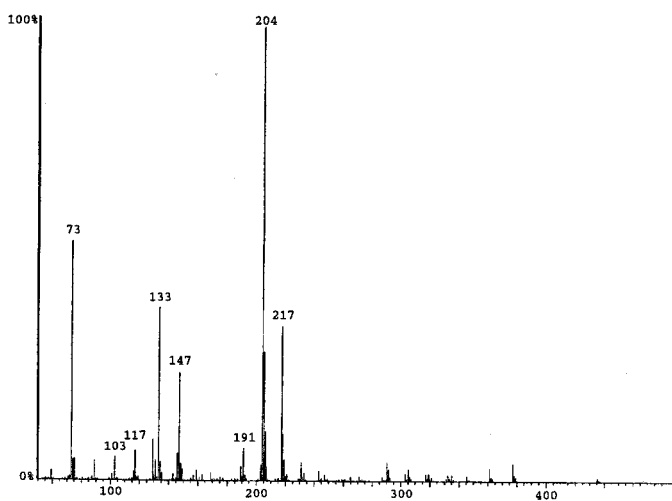


Figura 2.4. Espectro de masas del pico de t_R 7:12 min del cromatograma anterior.

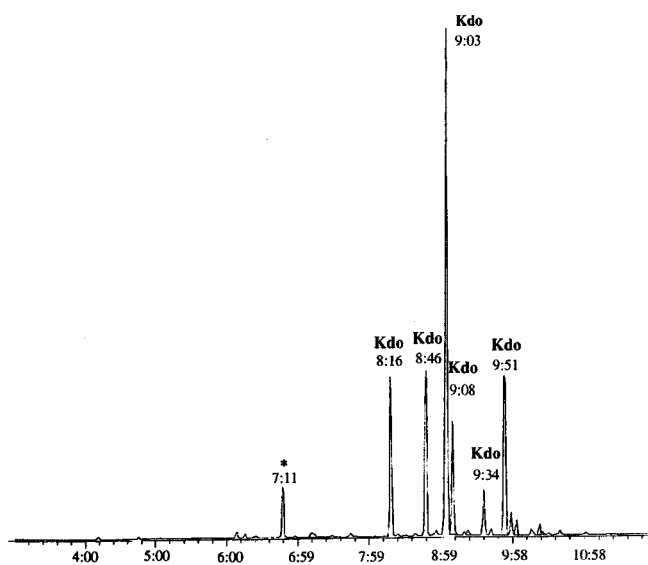


Figura 2.5. CG-EM de los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos del ácido 3-desoxi-*D*-mano-2-octulosónico (Kdo).

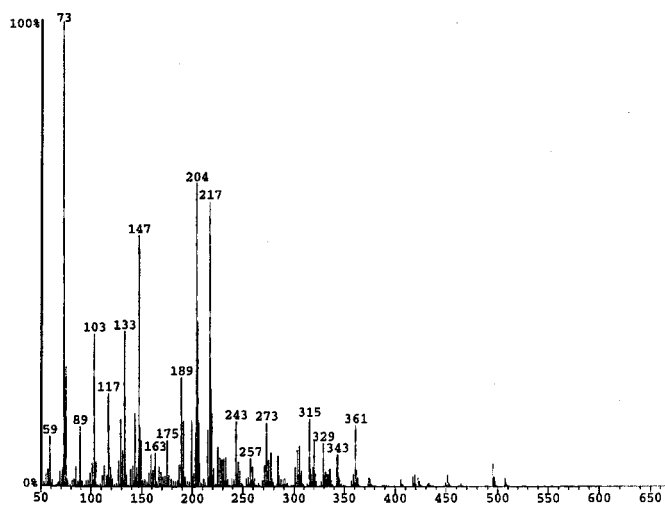


Figura 2.6. Espectro de masas del pico mayoritario del cromatograma anterior (t_R 9:03).

Instrumentación y condiciones cromatográficas.

Se utiliza un cromatógrafo de gases equipado con una columna OV-1 (25 m × 0,25 mm), y como detector un espectrómetro de masas Micromass AutoSpec-Q. Se utiliza un gradiente de temperatura de 10 °C/min desde una temperatura inicial de 150 °C (2 min) hasta una temperatura final de 250°C (30 min). El potencial de ionización en todos los casos es de 70 eV.

2.3.2. Determinación de la configuración absoluta de los azúcares.

En el estudio estructural de polisacáridos, las configuraciones absolutas de los monosacáridos constituyentes son determinadas normalmente por la medida del poder rotatorio o mediante la aplicación de enzimas específicas.

El primer método requiere el aislamiento de monosacáridos altamente purificados y en una cantidad mínima que oscila entre 10-20 mg. El segundo método tiene el inconveniente de que las enzimas específicas necesarias no siempre son asequibles.

Actualmente se utiliza la cromatografía de gases en la determinación de la configuración absoluta de azúcares, llevándose a cabo mediante el uso de dos métodos alternativos:

- Cromatografía de gases empleando una fase estacionaria quiral.
 - Conversión de los enantiómeros en derivados diastereoisómeros mediante un reactivo quiral y posterior separación en CG utilizando una fase estacionaria aquiral.^{36,37}
-

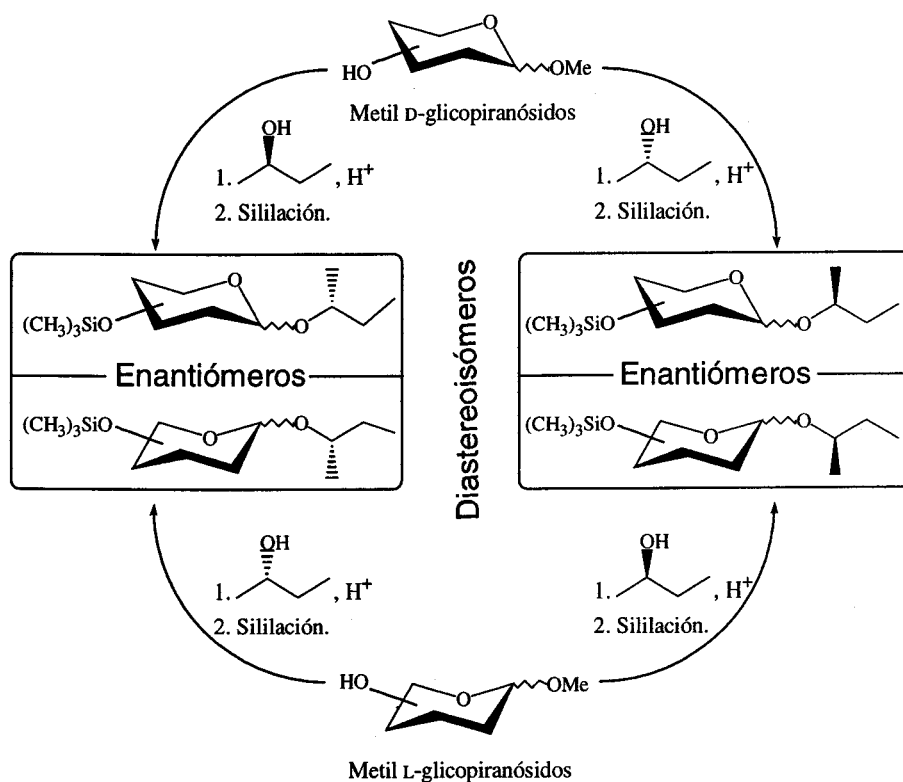


Figura 2.7. Formación de los distintos diastereoisómeros utilizados en la determinación de la configuración absoluta de los monosacáridos.

Este último método es el que se utiliza en esta tesis. Se basa en la formación de *O*-trimetilsilil derivados de los (+)-2-butil glicósidos correspondientes a los enantiómeros D y L de los monosacáridos. La formación de estos derivados se muestra en la Figura 2.7. Los glicósidos se forman por reacción de monosacáridos patrones (D o L) con un alcohol ópticamente activo, en este caso (+)-2-butanol. Cuando no se dispone de ambos enantiómeros patrones y en el caso de la muestra problema, la reacción se hace con el (+)-2-butanol y el (±)-2-butanol. En el caso del alcohol racémico se forman los diastereoisómeros (+)-2-butil D-glicósidos y (-)-2-butil D-glicósidos; este último es el enantiómero del (+)-2-butil L-glicósido y, por tanto, posee sus mismas propiedades cromatográficas.

La identificación se realiza por comparación de los tiempos de retención de los derivados diastereoisómeros procedentes de los monosacáridos patrones con los que se obtienen para la muestra problema.

2.3.2.1. Formación de los 2-butilglicósidos.

Metanólisis seguida de butanólisis.

La muestra liofilizada (30-60 μg para monosacáridos patrones, 60-100 μg para muestras a analizar) se somete a metanólisis y evapora de acuerdo con el método descrito en el apartado 2.3.1.1. El residuo seco se disuelve en HCl/ (+)-2-butanol 0,625M (500 μl) o HCl/(\pm)-2-butanol (1 ml) y se calienta 16 h a 80 °C. Transcurrido este tiempo el alcohol se evapora bajo corriente de N_2 y se procede a la sililación del residuo seco de acuerdo con alguno de los métodos descritos en el apartado 2.3.1.1. Por último, se evapora, se disuelve en hexano y se inyecta en el cromatógrafo de gases.

Instrumentación y condiciones cromatográficas (CG-EM).

Se utiliza el cromatógrafo descrito en el apartado 2.3.1.1. Las condiciones cromatográficas son: 130 °C durante 3 min seguido de un gradiente de temperatura de 3 °C por minuto hasta 150 °C y un nuevo gradiente de temperatura de 10 °C por minuto hasta 250 °C, temperatura que se mantiene durante 30 min. Para determinar el orden de elución de cada par de diastereoisómeros en el caso de la ribosa, se utilizó un programa de temperatura ligeramente modificado: 30 °C durante 2 min seguido de un gradiente de temperatura de 3 °C por minuto hasta 150 °C; esta temperatura se mantiene durante 1 min y se aplica un nuevo gradiente de temperatura de 10 °C por minuto hasta 250 °C, temperatura que se mantiene durante 30 min. El potencial de ionización es de 70 eV.

Los resultados obtenidos para los monosacáridos patrones estudiados se detallan en la Tabla 2.2. Como ejemplo, se muestran los cromatogramas registrados para D-ribosa en la Figura 2.8.

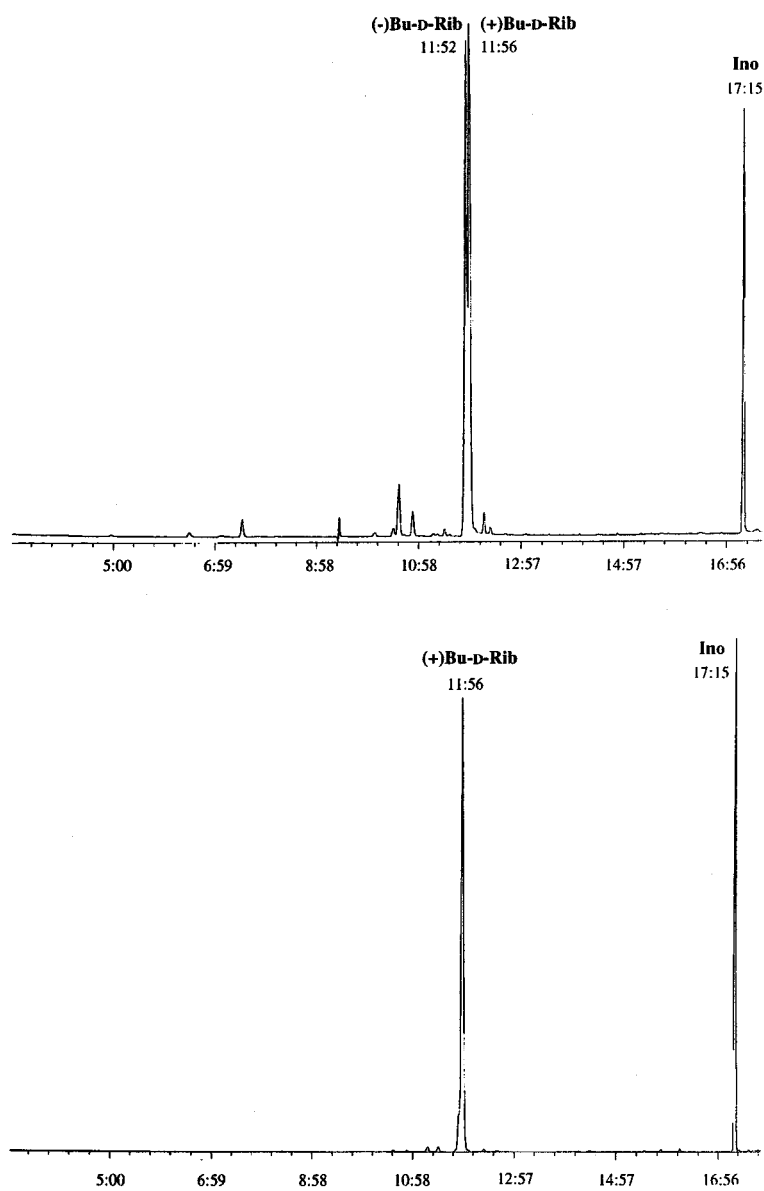


Figura 2.8. CG-EM de los 2,3,4,6 tetra-*O*-trimetilsilil derivados de los (+) y (-)-2-butil glicósidos de D-ribosa.

AZUCAR	t _R (min.)	t _{RR} ^a
L-Rib	11:52	0.688
D-Rib	11:57	0.693
D-Gal ^b	15:29	0.898
L-Gal ^b	15:39	0.907

^a Tiempo de retención relativo al 1,2,3,4,5,6-hexa-O-trimetilsilil *meso*-inositol (17:15 min)

^b Tiempo de retención del pico mayoritario.

Tabla 2.2. Formación de los distintos diastereoisómeros utilizados en la determinación de la configuración absoluta de los monosacáridos.

2.3.3. Determinación del tipo de sustitución. Análisis por metilación.

El análisis por metilación es uno de los métodos más antiguos utilizados en la determinación estructural de polisacáridos. Consiste en la eterificación completa de los grupos hidroxilos libres de los azúcares del polisacárido, es decir, aquellos que no están implicados en la formación del anillo, no llevan sustituyentes estables en el medio de reacción y no participan en los enlaces glicosídicos.^{38,39} Dichos enlaces glicosídicos son estables en las condiciones fuertemente básicas requeridas durante el proceso de metilación.

El polisacárido permetilado se despolimeriza obteniéndose azúcares parcialmente metilados que se analizan por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM). La identificación de los azúcares parcialmente metilados proporciona información detallada de las unidades estructurales del polisacárido pero no identifica ni la secuencia ni la naturaleza anomérica (α o β) de los enlaces.

2.3.3.1. Metilación del azúcar.

La metilación efectiva del polisacárido depende del grado de ionización de los hidroxilos libres, por lo tanto, es fundamental efectuar la reacción en un medio suficientemente básico con el fin de conseguir que dichos grupos hidroxilos se transformen completamente en alcóxidos. La adición del agente alquilante conduce a la eterificación total. El polisacárido debe estar completamente disuelto en el medio de reacción por lo que el disolvente ha de ser cuidadosamente elegido.

El proceso completo del análisis por metilación se esquematiza en la Figura 2.9. Para ilustrarlo se ha tomado como ejemplo un polisacárido formado por unidades de $\rightarrow 4$ - β -D-Glcp-(1 \rightarrow).

Existe un gran número de métodos de metilación de oligosacáridos y polisacáridos. Los más utilizados son:

- Haworth:⁴⁰ Emplea sulfato de dimetilo en hidróxido sódico acuoso.
- Purdie e Irvine:⁴¹ Utiliza yoduro de metilo y óxido de plata.
- Kuhn y col.:⁴² Emplea *N,N*-dimetilformamida o dimetilsulfóxido y yoduro de metilo.
- Hakomori:⁴³ Utiliza yoduro de metilo y metilsulfinilmetanuro sódico y dimetilsulfóxido como disolvente.
- Ciucanu y Kerek:⁴⁴ Emplea yoduro de metilo e hidróxido sódico en dimetilsulfóxido.

Este dos últimos métodos son los más utilizados actualmente. En esta tesis se emplea una modificación del método de Ciucanu y Kerek:

El azúcar (100-200 μ g) se disuelve en DMSO seco (300-500 μ l) y se añade NaOH pulverizada (50-70 μ g). A continuación se añade CH₃I (5-10 gotas) y se agita durante 10 min. Transcurrido este tiempo se repite la adición de CH₃I y se agita de nuevo durante 10 min. Por último se añade doble cantidad de CH₃I y se agita durante 30 min. La reacción se detiene mediante la adición de 1 ml de disolución de tiosulfato sódico en agua (100 mg/ml).

2.3.3.2. Purificación del azúcar permetilado.

La purificación de la muestra procedente del paso anterior se puede llevar a cabo de varias formas, dependiendo de la naturaleza de dicha muestra:

- En el caso de polisacáridos, uno de los métodos de purificación consiste en dializar exhaustivamente la muestra frente a agua destilada. Se utilizan sacos de diálisis Sigma, de 27 mm de diámetro, que permiten retener moléculas de peso molecular superior a aproximadamente 12.000 Daltons. Previamente se ha eliminado la glicerina, incluida para evitar su deterioro, lavándolos con agua destilada a 100 °C, al menos tres veces. Una vez dializada, la muestra se concentra a sequedad.
- En el caso de monosacáridos y oligosacáridos, aunque también está descrito para polisacáridos, el procedimiento es distinto.^{45,46} La mezcla de reacción se extrae con CH₂Cl₂ (0,2-1 ml, 4 veces), las fases orgánicas se lavan con agua (3 ml, 4 veces) y se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en DMSO:H₂O (1:1) (200 µl). Con ayuda de una jeringa de 5 ml se pasa a través de una microcolumna Sep-Pak C₁₈ (900 mg, Sep-Cartridge C-18, Lida Manufacturing Corp.) previamente lavada con etanol absoluto (40-50 ml), acetonitrilo (2 ml) y agua (4 ml). La disolución se inyecta a un flujo de 1-2 gotas por segundo. Las sustancias más polares de la mezcla de reacción, como el DMSO y el NaI, son eluidos de la columna con agua (2 ml, 4 inyecciones). Los compuestos menos polares son eluidos utilizando dos tipos de mezcla:
 - *Eluyente a*: acetonitrilo : agua (3:17) (v/v), y
 - *Eluyente b*: acetonitrilo : agua (1:4) (v/v).

En la purificación de disacáridos, se utiliza el eluyente *a* (4 lavados de 2 ml). En los oligosacáridos de grado de polimerización entre 3 y 10 se emplean el eluyente *a* (3 lavados de 2 ml) y el *b* (2 ml), y para polisacáridos el *a* (2 ml, 2 lavados) y el *b* (2 ml, 2 lavados).

El azúcar permetilado purificado se eluye del Sep-Pak con acetonitrilo (2 ml), y en el caso de polisacáridos se añaden, además, 4 ml de etanol absoluto. Los eluatos se concentran a sequedad.

2.3.3.3. Preparación de los acetatos de alditol parcialmente metilados.

El polisacárido permetilado se hidroliza para obtener azúcares parcialmente metilados, que se convierten en sus correspondientes acetatos de alditol parcialmente metilados⁴⁷ para su análisis por CG-EM.

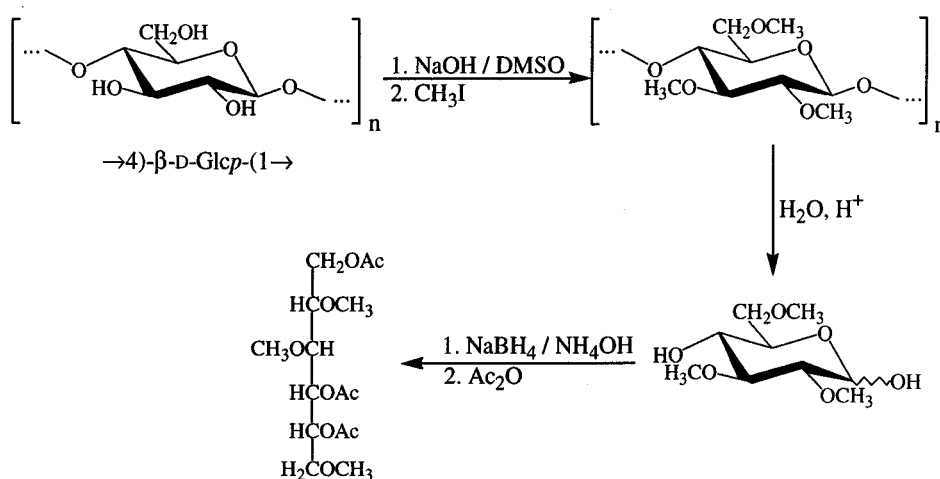
La despolimerización puede efectuarse por hidrólisis ácida o metanólisis. Los polisacáridos permetilados no son solubles en disolventes acuosos, por ello la hidrólisis conviene realizarla en primer lugar con un ácido orgánico y luego completarla con un ácido acuoso.

Hidrólisis y reducción del azúcar permetilado.

El azúcar (0,2-3 mg) una vez purificado se disuelve en ácido fórmico al 88% (0,2-1 ml) y se calienta 60 min a 100 °C.⁴⁸ El ácido se evapora a presión reducida y se añade ácido trifluoroacético (TFA) 2 M (0,2-1 ml) al residuo seco, que se calienta a 121 °C durante 1 h y 30 min. El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación con metanol (1 ml, 3 veces), el residuo se disuelve en NH₄OH 1M (10-100 µl), se añade NaBH₄ 0,3 M en DMSO (0,1-1 ml) y se calienta durante 1 h y 30 min a 40 °C.⁴⁹ Al cabo de este tiempo, la reacción se detiene por adición de ácido acético glacial (10-100 µl).

Acetilación.

Al azúcar reducido se le añade 1-metil-imidazol (20-200 µl) y Ac₂O (0,2-2 ml), se agita fuertemente y se mantiene 10 min a temperatura ambiente. A continuación se añaden 2 ml de agua fría y se extrae con CH₂Cl₂ (0,2-1 ml, 4 veces). Las fases orgánicas se lavan con agua (3 ml, 4 veces), se seca con Na₂SO₄ y se evapora a sequedad. Se disuelve en diclorometano y se inyecta en el cromatógrafo para su estudio por CG-EM.



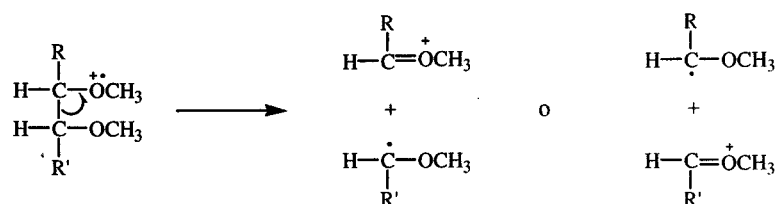
1,4,5-Tri-*O*-acetil-2,3,6-tri-*O*-metil-D-glucitol

Figura 2.9. Ejemplo de análisis por metilación de un polisacárido.

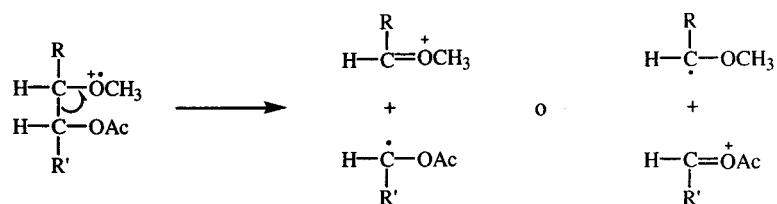
2.3.3.4. Cromatografía de gases y espectrometría de masas de los monosacáridos parcialmente metilados.

Los espectros de masas de estos compuestos son ampliamente conocidos.^{47,50,51} Están realizados por el método del impacto electrónico y raramente aparecen los iones moleculares. Se propone que la fragmentación tiene lugar siguiendo una serie de pautas:

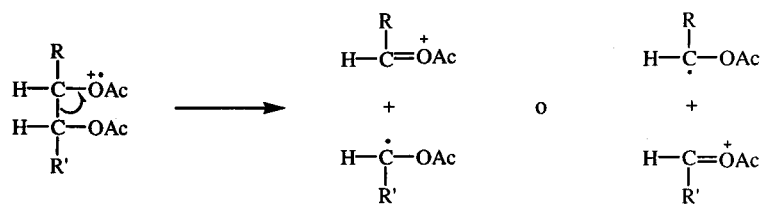
- Los fragmentos primarios se originan por rotura de enlaces C–C de la cadena del alditol, tal como se formula en el esquema de fragmentación de la Figura 2.10.
- La rotura entre dos carbonos que portan un grupo metoxilo (tipo A) está más favorecida que la que se da entre un carbono con un grupo metoxilo y otro con un grupo acetilo (tipo B). Ésta, a su vez, está más favorecida que la rotura entre dos carbonos con grupos acetilos (tipo C).



Tipo A



Tipo B



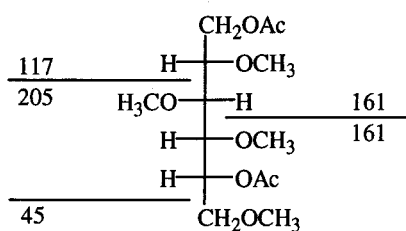
Tipo C

Figura 2.10. Esquemas de las posibles fragmentaciones primarias de los acetatos de alditol parcialmente metilados

- Los fragmentos resultantes de la rotura de tipo A proporcionan ambos señales intensas. En el caso de los resultantes de una rotura de tipo B, sólo aquellos fragmentos con carga en el grupo metoxilo producen señales intensas. Los del tipo C dan lugar a señales de poca intensidad.
- Los fragmentos secundarios que se detectan proceden de los primarios por pérdidas de ácido acético, cetena, metanol o formaldehído.

Todas estas fragmentaciones están recogidas por Lindberg y col.⁵¹ En el esquema de fragmentación presentado en la Figura 2.11 se recogen las que tienen lugar en el caso del 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-metil-D-glucitol.

Fragmentos Primarios



Fragmentos Secundarios

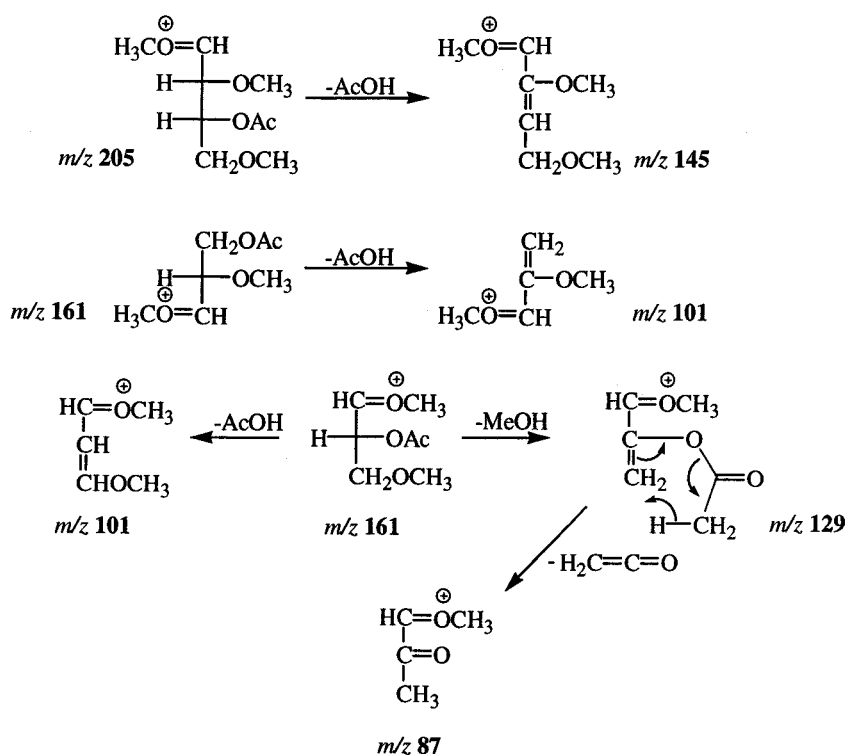


Figura 2.11. Esquema de fragmentación del 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-metil-D-glucitol.

Instrumentación y condiciones cromatográficas.

Se utiliza el cromatógrafo de gases y espectrómetro de masas descritos anteriormente. El programa de temperatura es isoterma a 120 °C durante un minuto seguido de un gradiente de temperatura de 8 °C/min hasta una temperatura final de 250°C (30 min). El potencial de ionización es de 70 eV.

La identificación se lleva a cabo por comparación de los espectros de masas obtenidos con los descritos en la bibliografía.⁵¹ La relación molar se calcula basándose en los factores molares de respuesta según la teoría de e.c.r. (effective carbon response⁵²).

2.3.4. Sustituyentes presentes en el azúcar.

Los datos de RMN y/o de espectrometría de masas pueden revelar la presencia de sustituyentes en el azúcar. Para la determinación estructural completa del polisacárido es necesario determinar la localización de dichos sustituyentes.

2.3.4.1. Localización de sustituyentes O-metilo.

Los sustituyentes O-metilo se localizan por comparación de los resultados del análisis por metilación realizados según dos procedimientos:

1. Metilación con NaOH/DMSO y MeI. Se realiza la metilación en las condiciones ya descritas en el apartado 2.3.3.1.
2. Metilación con NaOH/DMSO y CD₃I. La metilación se realiza en las mismas condiciones ya descritas en el apartado 2.3.3.1. La única diferencia reside en que el agente metilante es yoduro de trideuterometilo. El azúcar se transforma en los correspondientes acetatos de alditol parcialmente trideuterometilados que son analizados por CG-EM (apartados 2.3.3.3 y 2.3.3.4).

En la Figura 2.12 se muestra la localización de O-metilo sobre una unidad de 3-O-metilglucosa.

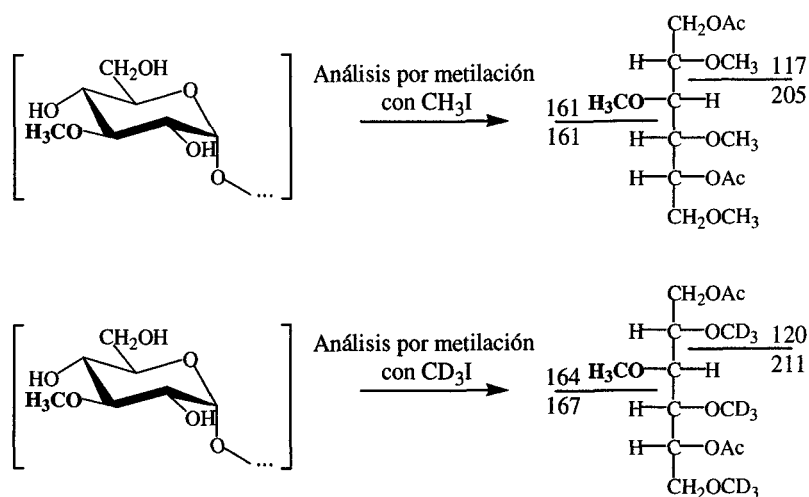


Figura 2.12. Esquema de la determinación de la posición del grupo metilo en un 3-O-metil- α -D-glucopiranosido mediante análisis por metilación.

Instrumentación y condiciones cromatográficas.

La instrumentación y las condiciones cromatográficas son las mismas que las descritas para los acetatos de alditol parcialmente metilados, indicadas en el apartado 2.3.3.4.

La identificación se realiza por comparación de los espectros de masas obtenidos con los descritos en la bibliografía.

2.3.5. Determinación de la secuencia de azúcares.

Una vez conocida la naturaleza de los azúcares y los puntos de unión, es necesario determinar la secuencia de éstos. Para ello se procede a la despolimerización parcial del mismo. La determinación estructural de los oligosacáridos obtenidos, una vez aislados y purificados, permite obtener información acerca de la secuencia en la que se hallan enlazados los restos de azúcares y la configuración anomérica de dichos enlaces.

En el caso de polisacáridos lineales, que presentan un único tipo de enlace glicosídico, la rotura hidrolítica conduce a la formación de series homólogas de oligosacáridos. Por otra parte, los polisacáridos heterogéneos que presentan una gran variedad de enlaces glicosídicos, pueden dar lugar a una selección representativa de todos los oligosacáridos posibles.

2.3.5.1. Despolimerización parcial y aislamiento de los oligosacáridos resultantes.

Los métodos de despolimerización parcial de polisacáridos son muy variados. Algunos de los más representativos son: hidrólisis parcial ácida en medio acuoso, acetólisis, trifluoroacetólisis, mercaptólisis y metanólisis. También existen métodos degradativos y enzimáticos. En esta tesis se utilizan la hidrólisis parcial ácida y la autohidrólisis. Ésta última utiliza la acidez del propio polisacárido, en el caso de que éste posea grupos ácidos, para catalizar la hidrólisis; la muestra, por tanto, se disuelve en agua destilada y se calienta.

La extensión de la hidrólisis, así como el grado de separación de los oligosacáridos, se sigue mediante cromatografía en capa fina (apartado 2.1.2.1).

En la separación de los oligosacáridos se emplea fundamentalmente la cromatografía de filtración sobre gel, tal como se describe en el apartado 2.1.2.

2.3.5.2. Estudio estructural de los oligosacáridos.

La caracterización completa de los oligosacáridos supone establecer la secuencia de azúcares que los componen y la asignación de las configuraciones anoméricas de los enlaces glicosídicos individuales.

Esta caracterización se lleva a cabo mediante el análisis por metilación, que se realiza de forma análoga a la descrita para el polisacárido nativo, y el estudio por RMN.

Prerreducción de los oligosacáridos.

En los oligosacáridos en los que existe duda sobre la identificación del azúcar reductor, se realiza una reducción previa del oligosacárido con borohidruro sódico antes de proceder a su metilación.⁴⁶ Por comparación del análisis por metilación del oligosacárido nativo y el del oligosacárido prerreducido, se determina qué azúcar de la secuencia está como terminal reductor.

El procedimiento es el siguiente: Al oligosacárido (0,5-1 mg) se le añade una disolución de borohidruro sódico (10 µg/µl) en NH₄OH 1 M (1 ml). La disolución se agita y se mantiene 12 h a temperatura ambiente. El exceso de borohidruro se destruye por adición de ácido acético concentrado (100 µl) y el borato formado se elimina por evaporaciones sucesivas con MeOH:AcOH (9:1) (3 veces, 0,5 ml) y posteriormente con MeOH (4 veces, 0,5 ml). El residuo se disuelve en agua (200 µl) y se pasa a través de una columna de resina Dowex 50W-X8 (H⁺) (2 ml), eluyéndose con agua (10 ml). Los eluatos se reúnen y liofilizan.

2.3.6. Determinación del peso molecular.

En la determinación del peso molecular de una sustancia, la elección de la técnica más adecuada está en función de dicho peso. Así, para moléculas pequeñas y de tamaño medio es posible utilizar la espectrometría de masas (FAB, MALDI-TOF, Electrospray...) y obtener resultados muy precisos, mientras que para sustancias de alto peso molecular, como por ejemplo polisacáridos, hay que recurrir a técnicas menos precisas (cromatografía de filtración sobre gel, electroforesis...).

En esta tesis se han empleado tres técnicas: FAB, MALDI-TOF y cromatografía de filtración sobre gel.

2.3.6.1. Espectrometría de masas. Bombardeo con átomos rápidos (FAB-EM).

Esta técnica, introducida por primera vez en 1980, fue desarrollada como un nuevo procedimiento de ionización para el análisis de sustancias no volátiles. En el transcurso de un año, la nueva técnica,⁵³ que se llamó FAB (fast atom bombardment) revolucionó los estudios de espectrometría de masas de biopolímeros.^{54,55}

El siguiente paso fue acoplar la fuente de FAB a los espectrómetros de masas de campo alto que ya se habían desarrollado. Se consiguió analizar moléculas con mayor peso molecular que las que hasta entonces se habían estudiado siguiendo las técnicas normales de ionización. La superioridad de esta técnica con respecto a otras quedó demostrada a través de los datos obtenidos para un polisacárido bacteriano compuesto por unidades de *O*-metil-D-glucosa⁵⁶ en los

que se ponía de manifiesto la utilidad del FAB en el cálculo del peso molecular del mismo.

Materiales y métodos.

Al bombardear la superficie de un líquido colocado sobre la punta de una sonda con un haz de átomos rápidos se produce la desorción de iones característicos del líquido. Si disolvemos la muestra problema en un disolvente o matriz, el bombardeo produce iones moleculares o pseudomoleculares positivos y negativos de la muestra(Figura 2.13).

El bombardeo con átomos rápidos suele hacerse con un gas inerte para evitar cualquier reactividad no deseada con la muestra. Se utilizan He, Ar o Xe. Para la generación de estos átomos, el gas inerte se introduce en una cavidad donde es parcialmente ionizado por bombardeo electrónico, formando iones positivos que son inmediatamente acelerados por campos eléctricos con potenciales de 2 a 10 kV. Se forma así un plasma confinado, con un movimiento resonante que favorece las colisiones entre iones acelerados y átomos neutros lentos, produciéndose intercambios de carga que originan átomos neutros rápidos. Los iones residuales, que puedan salir del cañón acompañando a los átomos rápidos, son eliminados por medio de placas deflectoras convenientemente situadas.

El disolvente que se emplea como matriz debe tener un alto punto de ebullición para que su tensión de vapor, en las condiciones de alto vacío, sea muy baja. Los disolventes más usados son, entre otros, glicerol, 1-tioglicerol y alcohol 3-nitrobencílico. El glicerol es el más utilizado y es ideal para compuestos polares como hidratos de carbono y glicopéptidos sin derivar. El 1-tioglicerol es el que más se ha usado en el caso de compuestos peracetilados o permetilados.

Para modificar la fuerza iónica de la matriz se utilizan aditivos iónicos. En el caso de carbohidratos se emplean:

- HCl diluido.
 - Acetato o yoduro sódico. En el espectro se obtiene el ion pseudomolecular $[M+Na]^+$ cuando se detectan los fragmentos cargados positivamente.
 - Tiocianato amónico. Aparece el ion $[M+NH_4]^+$ cuando se registra en modo positivo.
-

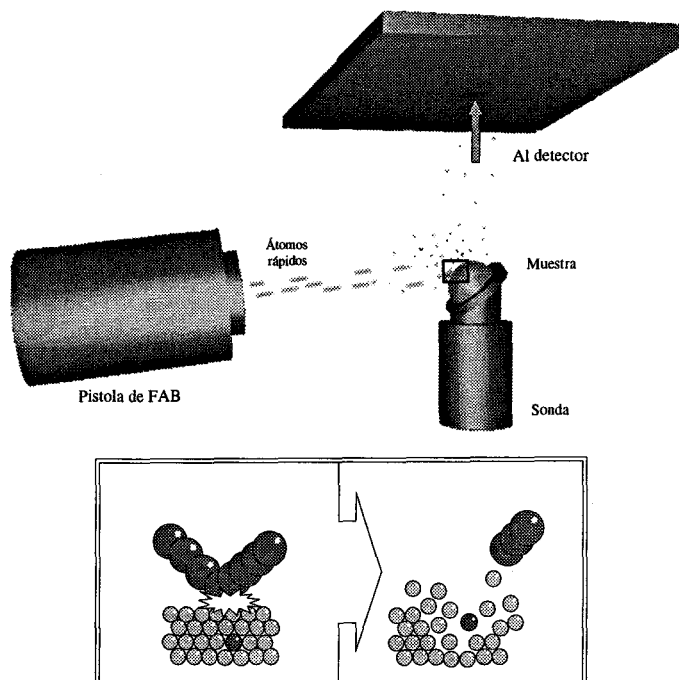


Figura 2.13. Representación esquemática de la fuente FAB.

Esta técnica es adecuada para el análisis de un gran número de compuestos biológicos tales como péptidos, oligosacáridos, lípidos o metabolitos endógenos.

En el campo de los polisacáridos bacterianos, la técnica de FAB-EM ha sido aplicada fundamentalmente tanto para la determinación del peso molecular de oligosacáridos, naturales o procedentes de hidrólisis parciales de polisacáridos, como para la identificación de sustituyentes en los mismos.

Aplicación de las muestras e instrumentación.

La muestra (0,5-2 mg) se disuelve en agua hasta una concentración de 100-200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se inyecta 1 μl de la disolución en glicerol (matriz) y se añade NaI (aditivo). Se homogeneiza y se introduce en la fuente de FAB. Se registra el espectro de iones positivos. Se utiliza un espectrómetro de masas Kratos MS80-RFA. El bombardeo se realiza con xenón a un voltaje acelerador de 4 kV.

2.3.6.2. Espectrometría de masas. MALDI-TOF.

La “desorción láser asistida por matriz” (MALDI) es una técnica de ionización suave que puede utilizarse con moléculas orgánicas complejas de peso molecular entre unos miles y varios cientos de miles de Daltons.⁵⁷

En la Figura 2.14 se muestra el esquema del proceso de ionización. Se emplea un láser a una longitud de onda adecuada para conseguir la excitación electrónica o vibracional de la molécula que se analiza (ultravioleta lejano o infrarrojo cercano, respectivamente). La matriz elegida debe absorber a esa longitud de onda, y la muestra debe previamente dispersarse de forma homogénea en dicha matriz, que puede ser sólida o líquida; de este modo, cada molécula de muestra quedará rodeada de un gran número de moléculas de la matriz evitándose, por un lado, la asociación de moléculas de analito, que darían lugar a la formación de complejos de muy alto peso molecular, difíciles de desorber y analizar; por otro, la matriz absorbe el exceso de energía, consiguiéndose un proceso de ionización extremadamente suave. Por último, el pulso láser debe ser de muy corta duración (1 a 100 ns) para evitar la descomposición térmica.

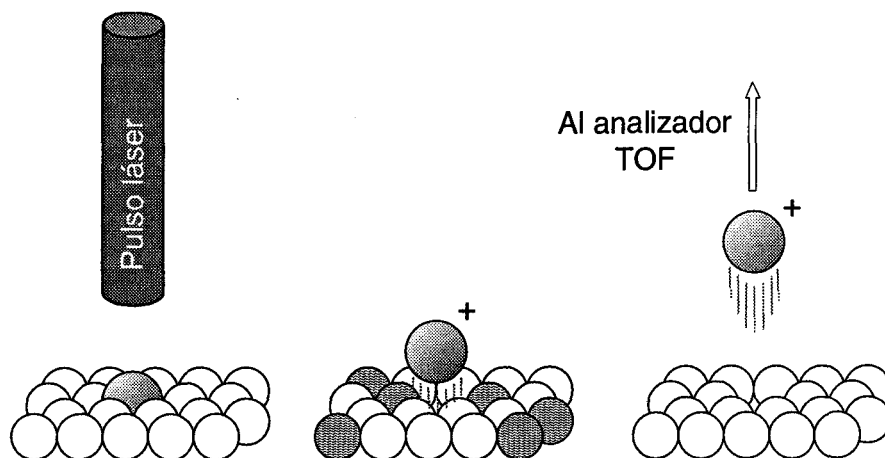


Figura 2.14. Esquema de la ionización MALDI. El pulso láser ioniza la muestra y el exceso de energía se disipa entre las moléculas de la matriz. La molécula cargada sale de la matriz y se dirige al sistema TOF.

Al ser una técnica basada en pulsos, el analizador más apropiado es el de tiempo de vuelo (TOF), con lo que la técnica instrumental se denomina MALDI-TOF.

Instrumentación.

Se utilizó un espectrómetro de masas Micromass TofSpec equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm, y como matriz, ácido 2,5-dihidroxibenzóico. Como patrón externo para la calibración se utilizó una mezcla de maltooligosacáridos. La muestra se introduce a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en agua.

2.3.6.3. Cromatografía de filtración sobre gel.

El fundamento de este tipo de cromatografía se ha presentado en el apartado 2.1.2. La determinación del peso molecular según esta técnica se basa en la relación lineal entre el volumen de elución de una sustancia y el logaritmo de su peso molecular.⁵⁸

En lugar del volumen de elución (V_e), se puede definir el coeficiente de reparto, K_D , como la relación entre el volumen de elución de la muestra menos el volumen vacío (V_0 , el V_e de una sustancia cuyo tamaño molecular es superior al

límite de exclusión del gel y, por tanto, no es retenida en absoluto por éste) y el volumen de la fase estacionaria (V_i):

$$K_D = \frac{V_e - V_0}{V_i}$$

De esta forma, K_D se hace independiente de la longitud de la columna, y equivale a la fracción de fase estacionaria accesible a una determinada molécula de soluto.

$V_i = V_T - V_0$, siendo V_T (volumen total) el volumen de elución de una sustancia de muy bajo peso molecular, de modo que sus moléculas pueden entrar en cualquier poro del gel y su retención es máxima.

Instrumentación y condiciones cromatográficas.

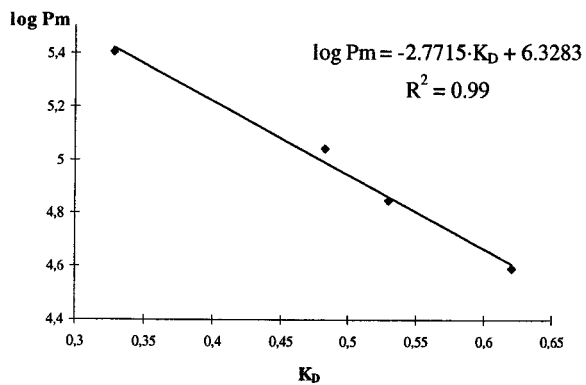
Se han empleado dos sistemas:

- Columna de Pharmacia Fine Chemicals de 2 cm de diámetro y 50 cm de longitud rellenas de Sephacryl S-400. Este gel tiene un rango de fraccionamiento para dextranos de 2.000.000-10.000 Daltons. Se emplea como eluyente una disolución de NaCl 0,2 M, con NaN_3 al 0,02 % como agente antibacteriano. La bomba peristáltica y el detector son los descritos en el apartado 2.1.2.1. El flujo es de 9,8 ml/h y se recogen fracciones de 1,4 ml. Los volúmenes vacío y total se calculan con dextrano azul y fructosa, respectivamente. Los resultados obtenidos son: $V_0=52$ ml, $V_T=110$ ml.
- Sistema de HPLC Sugar Analyzer I (Waters), equipado con una bomba modelo 515 y un detector de índice de refracción. La columna utilizada fue una μ Bondagel E-linear (Waters), con un rango de fraccionamiento para dextranos de 2.000.000 a 2.000 Daltons. Se utilizó agua como eluyente a un flujo de 0,5 ml/min, y la concentración de los patrones fue de 20 mg/ml. No se determinó el volumen vacío de la columna, por lo que el calibrado se hizo considerando sólo los volúmenes de elución.

Calibrado de las columnas.

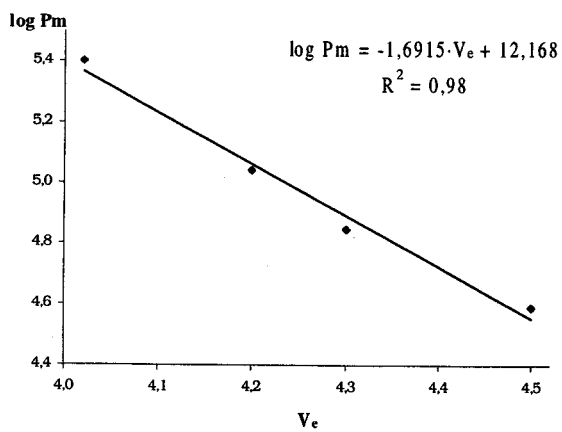
Se calibran usando dextranos de pesos moleculares conocidos e incluidos en los respectivos límites de exclusión, en las mismas condiciones cromatográficas

que las muestras. Los resultados obtenidos, junto con las ecuaciones de las rectas de calibrado, se muestran en las tablas siguientes:



Sephacryl S-400

Peso Molecular	V_e (ml)
252.000	71,0
110.000	80,0
70.000	82,7
39.100	88,0



μBondagel E-linear

Peso Molecular	V_e (ml)
252.000	4,02
110.000	4,2
70.000	4,3
39.100	4,5

2.3.7. Resonancia Magnética Nuclear.

La resonancia magnética nuclear posee una serie de características que hacen a esta técnica especialmente importante en el estudio estructural de oligo- y polisacáridos.

La aplicación de la resonancia magnética nuclear (RMN) permite, en determinados casos, obtener la secuencia completa de la cadena de oligo- o polisacárido, siendo otra importante herramienta además de la espectrometría de masas en la determinación de estructuras. Existe un gran número de técnicas, algunas de las cuales han sido aplicadas en esta tesis:

2.3.7.1. Espectro monodimensional de ^1H -RMN.

El espectro monodimensional proporciona los datos de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de los monosacáridos que componen el polisacárido. Los protones anoméricos tienen una zona de resonancia característica normalmente separada de la del resto de los protones de la molécula, por lo que se puede determinar el número de monosacáridos diferentes (o iguales, pero con entornos distintos) que posee el oligosacárido y la estereoquímica de los enlaces glicosídicos (α o β). Asimismo, puede revelar la presencia de sustituyentes o grupos adicionales, como acetatos, metilos o desoxiazúcares.

2.3.7.2. Experimentos COSY (Correlated spectroscopy).

La secuencia de pulsos COSY genera un espectro bidimensional en el que cada señal de protón se correlaciona con las señales de los protones acoplados escalarmente al primero. Existen distintas variaciones de la técnica fundamental de COSY. Entre ellas:

- COSY convencional: Las señales de cruce que proporciona esta técnica relacionan dos resonancias de protón directamente acoplados (acoplamiento activo).
 - COSY sensible a la fase: Discrimina entre acoplamiento activo, que son los que generan las señales de cruce, y acoplamiento pasivo. Estos últimos se muestran en las señales de cruce pero no son responsables de la aparición de éstas (por ejemplo, en la señal de cruce para dos protones A y M, los acoplamiento pasivo serían los acoplamiento con otros
-

protones distintos de A y M). Gracias a esto, es posible medir directamente constantes de acoplamiento en los picos de cruce, aunque existen otros experimentos especialmente diseñados con este fin, por ejemplo el experimento E-COSY.

- DQF-COSY (*double-quantum filtered correlation spectroscopy*)⁵⁹: Afina las señales en general y reduce o elimina las de los singuletes, mucho más intensos que las señales de protones acoplados; de este modo se pueden apreciar mejor las señales de cruce próximas a la diagonal principal.
- COSY 45. El segundo pulso en el experimento COSY es de 45° en lugar de 90°, con lo que se consigue que las intensidades de las señales de autocorrelación (las señales de cruce dentro de un multiplete) disminuyan. También se afina la diagonal principal, lo que permite observar más fácilmente las señales próximas a ésta.
- DBF-COSY (*2D homonuclear proton double-band filtered selective correlation experiment*)⁶⁰: En este experimento, se obtiene el espectro COSY de parte del espectro ¹H-RMN, sin que interfieran las señales no seleccionadas. De este modo, en la adquisición de este COSY parcial se utiliza la misma cantidad de memoria que la empleada en la adquisición de todo el espectro, obteniéndose espectros COSY de alta resolución. La selección de las zonas en el espectro de ¹H-RMN se realiza mediante pulsos BURP.⁶¹

2.3.7.3. Experimento TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) u HOHAHA (*Homonuclear Hartman-Hann Effect*).

En el experimento COSY, se obtienen señales de cruce sólo entre espines directamente acoplados unos con otros. Sin embargo, en esta técnica la magnetización se transfiere a lo largo del sistema de acoplamiento, produciendo en el espectro señales de cruce procedentes de un sistema de espín completo.⁶² Este experimento es muy útil en el estudio de oligosacáridos o péptidos, ya que permite obtener las señales de cada residuo en su conjunto. La versión monodimensional de este experimento permite editar los espectros monodimensionales de los diferentes sistemas de espín.

La interpretación del espectro debe realizarse con la ayuda de un COSY convencional, que facilita las asignaciones.

2.3.7.4. NOE y 2D-NOESY.

El efecto NOE se define como una variación en la intensidad de una señal como consecuencia de la relajación de espines próximos espacialmente, generalmente protones.⁶³ Depende del tamaño y la movilidad de la molécula, además de la temperatura. En el caso de moléculas pequeñas (monosacáridos) el NOE (cambio en la intensidad) suele ser positivo. Al aumentar el tamaño molecular, el NOE disminuye (menos positivo) y pasa a ser negativo para moléculas mayores como es el caso de los polisacáridos. Para moléculas de tamaño medio, como pueden ser tri- o tetrasacáridos, puede llegar a ser nulo.

El experimento 2D-NOESY es bidimensional y de las señales de cruce se obtiene la misma información que en el NOE: indican la proximidad espacial de los núcleos implicados.

2.3.7.5. Espectro monodimensional de ^{13}C .

El espectro de ^{13}C -RMN proporciona información sobre los desplazamientos químicos de los carbonos de un oligo- o polisacárido. Dichos desplazamientos químicos tienen un valor que se mantiene aproximadamente constante comparando monosacáridos aislados y monosacáridos constituyentes de oligo- y polisacáridos. Sin embargo, los desplazamientos químicos de las señales de los carbonos involucrados en los enlaces glicosídicos sí se modifican, aumentando entre 5 y 10 ppm en la mayoría de los casos.^{64,65} Las señales de los carbonos adyacentes a los implicados en el enlace también sufren un desplazamiento, aunque en menor extensión y en sentido contrario, es decir, hacia campo alto.

2.3.7.6. Correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C .

La correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C relaciona señales del espectro de protón con las de ^{13}C entre núcleos directamente unidos a través de la constante de acoplamiento $^1J_{\text{H,C}}$. Si la detección es en ^{13}C se requiere una gran cantidad de muestra, por lo que se suele recurrir a técnicas de detección inversa (detección de ^1H), mucho más sensibles. En esta tesis se ha utilizado la técnica HSQC (*^1H -detection mode hetero single-quantum correlation*⁶⁶) ligeramente modificada de modo que la fase sea dependiente de la multiplicidad.⁶⁷

2.3.7.7. HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

El experimento anterior permite correlacionar ^1H y ^{13}C a través de la constante de acoplamiento $^1J_{\text{H,C}}$. Para obtener correlaciones a mayor distancia, como $^2J_{\text{H,C}}$ y $^3J_{\text{H,C}}$, se emplea una secuencia de pulsos llamada HMBC.⁶⁸

2.3.7.8. 2D-HSQC-TOCSY.

Es posible asociar dos experimentos bidimensionales de forma secuencial (experimentos híbridos), de modo que el espectro resultante sea una combinación de los que se obtendrían por separado. Este nuevo espectro sería el correspondiente a un plano perpendicular al eje F_1 en un experimento tridimensional.

En esta tesis se ha utilizado una secuencia HSQC-TOCSY con detección de fase. Las señales positivas muestran las conectividades entre los ^1H y los ^{13}C a los que están unidos (HSQC), mientras que las negativas dan cuenta de los sistemas de espín a los que pertenecen tanto protones como carbonos (TOCSY).

2.3.7.9. Instrumentación.

Se eliminan las señales de los protones intercambiables (generalmente OH y NH) disolviendo la muestra en D_2O y liofilizándola varias veces. Los espectros se registran en D_2O al 99,98 % (3-5 mg/ml), y usando un espectrómetro Bruker AMX500 operado a 500,13 MHz (para ^1H) y 125,75 MHz (para ^{13}C). Los desplazamientos químicos se dan en ppm, usando la señal de DHO a 303 K (4,75 ppm) como referencia en el caso de ^1H , y DMSO (39,5 ppm) en el de los ^{13}C .

Los experimentos monodimensionales de excitación selectiva se llevaron a cabo mediante la aplicación del tren de pulsos DANTE- Z ⁶⁹ ($n = 300$, $\tau = 100 \mu\text{s}$, $\theta = 0,3^\circ$). A este tren de pulsos también se le agregó una secuencia TOCSY⁷⁰ (tiempo de mezcla 120 ms, pulsos de 90° de $49 \mu\text{s}$) para dar los correspondientes subespectros 1D-TOCSY. Se acumularon 512 barridos, lo que corresponde a un tiempo de adquisición de 30 min.

Los experimentos DQF-COSY se realizaron en el modo sensible a la fase usando la secuencia de pulsos estándar de Bruker. Se empleó una matriz de datos de $512 \times 1 \text{ K}$ puntos para digitalizar un ancho espectral de 4.500 Hz; se usaron 32 barridos por incremento con un tiempo de espera entre ellos de 1 s, y, antes de la transformación de Fourier, se empleó un llenado con ceros (*zero filling*) en F_1 para expandir los datos a $1 \text{ K} \times 1 \text{ K}$.

El experimento DBF-COSY se realizó mediante la aplicación de dos pulsos BURP⁶¹ basados en el tren de pulsos DANTE-Z ($n = 10$, $\tau = 50 \mu\text{s}$, $\theta = 10^\circ$). Se usó una matriz de datos de $512 \times 1 \text{ K}$ puntos para digitalizar un ancho espectral de 1.500 Hz, y 64 barridos por incremento. La señal de DHO generalmente se eliminó por presaturación con un pulso de baja potencia (atenuación del transmisor de 70 dB) de 1,2 s.

Los experimentos de absorción pura 2D-NOESY se realizaron con tiempos de mezcla de 200 ms. Las anchuras espectrales, barridos, tiempos de espera y tratamiento de datos fueron análogos a los utilizados en el caso del DQF-COSY.

Los experimentos de correlación heteronuclear a un enlace protón-carbono se efectuaron con detección en ^1H basada en las coherencias de un quantum. Se utilizó una matriz de datos de $256 \times 1 \text{ K}$ puntos para digitalizar un ancho espectral de 4.000 y 20.0000 Hz en F_2 y F_1 , respectivamente. Se emplearon 64 barridos por incremento con un tiempo de espera entre ellos de 1 s, y un valor en la demora en la secuencia de pulsos correspondiente a un valor de $J_{\text{H,C}}$ de 150 Hz. (En el caso del estudio del mutante SVQ295 se utilizaron anchos espectrales de 4.500 y 26.000 Hz, y 128 barridos en lugar de 64). El desacoplamiento de ^{13}C se consiguió con una secuencia GARP. Se aplicaron funciones $\cos^2 x$ en ambas dimensiones y un llenado de ceros para expandir los datos a $512 \times 1 \text{ K}$. Por último, este experimento fue ligeramente modificado, incorporando un bloque que permitió la detección de la multiplicidad.

Los espectros 2D-HSQC-TOCSY se registraron con la secuencia de pulsos HSQC convencional enlazada a un tren de pulsos WALTZ-16, consistiendo el periodo de bloqueo de espín ("*spin-lock*") en pulsos de 180° de 98 μs de duración. Se registraron dos espectros usando tiempos de mezcla de 20 y 140 ms, respectivamente.

2.4. ESTUDIO CONFORMACIONAL.

2.4.1. Características generales.

El estudio conformacional de moléculas flexibles como es el caso de los carbohidratos es un complemento importante a su determinación estructural. Por un lado, puede ser esencial a la hora de asignar completamente señales en RMN, resolver ambigüedades o incluso descartar posibles estructuras a través de datos de distancias interatómicas; por otro lado, y como aplicación más importante, permite predecir el comportamiento conformacional tanto en disolución como cuando se encuentra en interacción con otras moléculas, especialmente ácidos nucleicos y proteínas.

La flexibilidad de un oligo o polisacárido se basa principalmente en el intervalo de valores que pueden adoptar sus ángulos de torsión. Sin embargo, cada monosacárido no se puede considerar rígido, ya que también se dan ligeras variaciones en las longitudes y ángulos de enlace. Entre dichos ángulos de torsión destacan fundamentalmente los ángulos diedros de enlace, Φ y Ψ , aunque también se deben considerar las orientaciones de los grupos hidroxilo secundarios y el grupo hidroximetilo.

2.4.1.1. Efecto *exo-anomérico*.

El efecto *exo-anomérico* describe una característica estructural experimental que consiste en que el sustituyente de la posición anomérica generalmente se dispone de forma que los enlaces C-1-C-5 y O-1-R queden en orientación *gauche*. De esta forma, la densidad electrónica del par solitario sobre O-1 puede deslocalizarse empleando el orbital σ^* del enlace C-1-O-5. Además de esta estabilización por conjugación, también contribuyen los efectos estéricos y electrostáticos. El conjunto de estas interacciones hace que las tres conformaciones alternadas no sean equivalentes, sino que haya una preferencia por la orientación *+sin* del enlace O-1-R respecto al enlace O-5-C-1 en las estructuras α -D, y por la orientación *-sin* en las estructuras β -D⁷¹ (Figura 2.15). Esto se traduce en unos valores de Φ (definido como H-1-C-1-O-1-R) de -60° y $+60^\circ$, respectivamente.

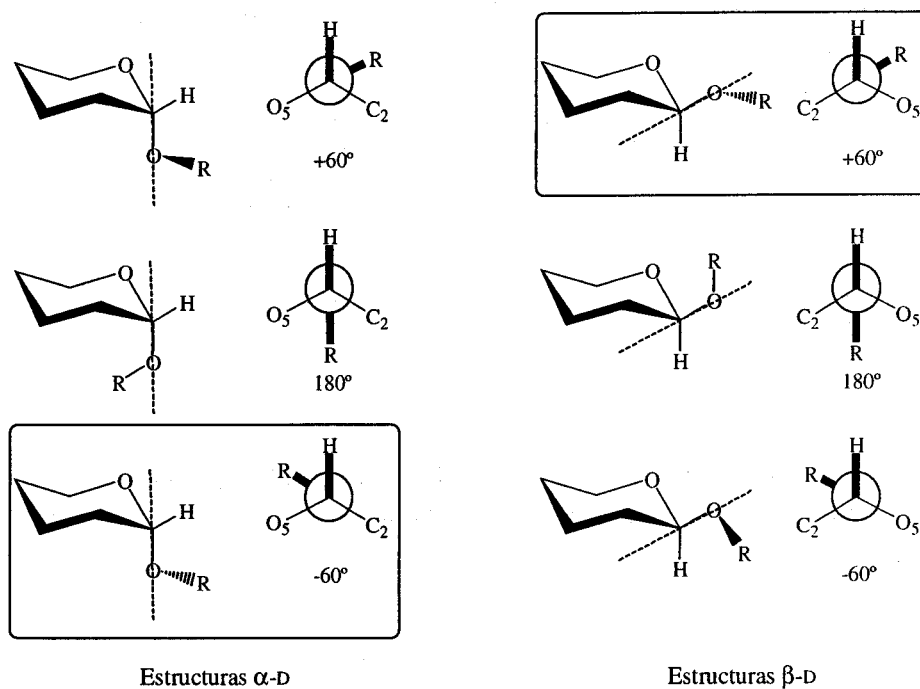


Figura 2.15. Cada una de las tres conformaciones alternadas posibles para las estructuras α -D y β -D. Se indica en cada caso la conformación favorecida por el efecto *exo*-anomérico.

2.4.1.2. Hidroxilos secundarios.

En el análisis conformacional de carbohidratos se debe tener en cuenta la orientación de los hidroxilos secundarios, ya que, aunque no son determinantes en cálculos con constantes dieléctricas elevadas, sí juegan un papel importante cuando se trabaja *in vacuo* o con constantes dieléctricas bajas. Puesto que para cada hidroxilo hay, en principio, tres conformaciones alternadas posibles, el número de combinaciones existente es muy alto. Sin embargo, es posible simplificar considerando únicamente aquellas combinaciones más representativas energéticamente, es decir, aquellas que dan lugar al mayor número de enlaces de hidrógeno cooperativos alrededor del anillo de piranosa. Así, se distinguen dos orientaciones, denominadas horaria (*c*) y anti-horaria (*r*), según la dirección a la

que apunten los vectores O-H de los hidroxilos secundarios con respecto al anillo de piranosa o furanosa.

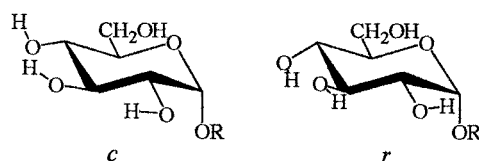


Figura 2.16. Orientaciones de los hidroxilos secundarios: Sentido *c* (horario) y sentido *r* (anti-horario).

2.4.1.3. Hidroximetilos.

Existen tres conformaciones alternadas en torno a la superficie rotacional del hidroximetilo exocíclico, que se designan como *gauche-gauche* (gg), *gauche-trans* (gt) y *trans-gauche* (tg).

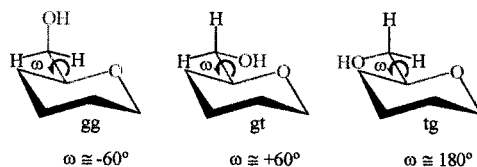


Figura 2.17. Conformaciones adoptadas por el grupo hidroximetilo.

De acuerdo con los resultados experimentales de rayos X y RMN,⁷² el efecto que gobierna la población relativa entre las tres conformaciones alternadas es la orientación del oxígeno O-6 con respecto al sustituyente en la posición C-4 (axial o ecuatorial). Así, por ejemplo, en los D-azúcares, en el caso de la glucosa la proporción de la conformación tg es prácticamente nula, mientras que en el de la galactosa la proporción relativa gg:gt:tg es aproximadamente 2:6:2.

Investigaciones teóricas han demostrado que los efectos que determinan cuáles son las conformaciones preferentes en los sistemas que implican oxígenos próximos son las interacciones 1,3 diaxiales y el efecto *gauche*. El primero de ellos, llamado también efecto Hassel-Ottar,⁷³ es un efecto desestabilizante que se produce por la repulsión electrónica entre dos sustituyentes electronegativos en disposición axial. El efecto *gauche* es un efecto estabilizante de las orientaciones

gauche entre dos sustituyentes electronegativos vecinales. Además, se pueden dar otros factores como la formación de enlaces de hidrógeno y la solvatación.

El estudio conformacional de un oligo o polisacárido requiere una serie de datos experimentales, principalmente de RMN, que sirven de base y complemento a un estudio de modelización computacional.

2.4.2. Información obtenida por RMN.

Las principales fuentes de información estructural en RMN son las medidas de efecto nuclear Overhauser (NOE), las de constantes de acoplamiento escalar (J), tanto homo- como heteronucleares, y los desplazamientos químicos. Todos estos parámetros están promediados entre todos los estados presentes en disolución.

2.4.2.1. Efecto NOE.

El efecto NOE, especialmente entre protones, es la principal fuente de información estructural en RMN.

La intensidad del NOE entre dos protones está relacionada con la distancia promedio que los separa. En general, los protones situados a más de 5 Å de distancia proporcionan una señal demasiado débil para ser observada. Sin embargo, la intensidad del NOE no depende únicamente de la distancia entre el par de protones considerado, sino también de otros factores como son el grado de movilidad y flexibilidad de la molécula, de las posibles fuentes de relajación con otros protones circundantes, y de las fuentes de relajación externas (relajación intermolecular, cuadrupolar, etc.).

2.4.2.2. Constantes de acoplamiento.

La segunda fuente de información estructural en RMN son las constantes de acoplamiento escalar, especialmente las constantes vecinales entre protones conectados por tres enlaces, 3J , ya que son las de más fácil acceso experimental. La información estructural que se obtiene viene dada por la relación de esta constante con el ángulo de torsión correspondiente, que está descrita por una ecuación de tipo Karplus:

$${}^3J(\theta) = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C$$

Las diversas constantes que aparecen en la última expresión se ajustan empíricamente a cada caso particular.

Las constantes de acoplamiento 3J en carbohidratos informan de la disposición relativa de los protones en cada unidad de azúcar, lo que permite determinar la conformación adoptada por el anillo de piranosa o incluso de furanosa, si bien en este último caso se espera que haya un equilibrio entre varias conformaciones. Igualmente, permiten obtener datos sobre la conformación adoptada por el grupo hidroximetilo. Para ello, se calculan los valores de las constantes $J_{5,6}$ en cada una de las conformaciones alternadas de acuerdo con la ecuación de Altona⁷⁴ y, suponiendo que en disolución existe una mezcla de esas tres conformaciones límite, se puede plantear y resolver un sistema de ecuaciones para calcular las poblaciones relativas de cada una de ellas.

2.4.2.3. Desplazamiento químico.

Finalmente, los desplazamientos químicos puede usarse como una fuente de información estructural. Sin embargo, su relación con la estructura tridimensional es compleja, ya que en ellos influyen numerosos efectos como son corrientes de anillo, efectos electrostáticos o anisotropía de enlace. Por tanto, su uso en estudios conformacionales es muy limitado.

2.4.3. Modelado molecular.

La simulación de moléculas usando cálculos *ab initio* no es aplicable a sistemas con un número elevado de átomos, como es el caso de los oligosacáridos, ya que el número de orbitales implicados sería enorme. Se utilizan en su lugar los cálculos de mecánica molecular.

2.4.3.1. Mecánica molecular.

La mecánica molecular (MM) considera la estructura objeto de estudio como un conjunto de masas puntuales sometidas a una función de potencial empírico que sólo depende de las coordenadas de dichas masas puntuales. El objetivo final del campo de fuerzas es reproducir los distintos tipos de moléculas con una precisión razonable.

El estudio pretende calcular las energías relativas de las diferentes conformaciones en función de las $3N-6$ coordenadas internas. La energía potencial que se calcula es la energía relativa entre la estudiada y la de una molécula que posea unos valores de longitudes, ángulos y torsiones de enlace, potencial electrostático, etc., ideales, obtenidos a partir de datos experimentales de moléculas del mismo tipo. Las expresiones usadas en el cálculo de la energía, junto con los parámetros obtenidos a partir de datos experimentales, forman lo que se denomina un campo de fuerzas. Se han desarrollado varios campos de fuerza para el estudio de carbohidratos, entre ellos MM2 y MM3, TRIPOS, CFF, o CHARMM, que permiten obtener en algunos casos resultados muy próximos a los obtenidos experimentalmente.⁷⁵

En cuanto al tratamiento del disolvente, existen diversas aproximaciones, que van desde no considerarlo en absoluto⁷⁶ o utilizar una constante dieléctrica para reescalar las interacciones electrostáticas,⁷⁷ a usar un modelo de disolvente continuo⁷⁸ o incluir explícitamente las moléculas de disolvente.

Una vez calculada la energía de una molécula, se procede a una minimización de dicha energía potencial. El proceso de minimización en mecánica molecular puede realizarse mediante diversos algoritmos: descenso pronunciado (“*steepest descent*”), gradientes conjugados (“*conjugated gradient*”), etc. Estos algoritmos modifican la geometría de partida en sucesivas iteraciones hasta llevarla a un mínimo local cercano. No hay, en principio, forma de saber si se ha llegado al mínimo de energía absoluto o si, por el contrario, la estructura final es un mínimo de alta energía. El resultado está determinado por la elección de la estructura inicial. Este problema se conoce habitualmente con el nombre de “problema de mínimos múltiples” y su solución pasa por utilizar algún método de búsqueda conformacional.

Los métodos utilizados para resolver este problema pueden dividirse en dos grandes grupos, que se diferencian en el modo en que se generan las geometrías de partida: las búsquedas deterministas (“*Systematic Grid Search*”) exploran de manera homogénea todo el espacio conformacional; los métodos estocásticos utilizan algún elemento aleatorio para realizar esta exploración. Sin embargo, aunque los métodos sistemáticos pueden garantizar que se cubre todo el espacio conformacional, el número extraordinariamente alto de estructuras de partida que se deben generar cuando el número de torsiones a analizar es elevado hacen que su eficacia en estas situaciones sea baja.

2.4.3.2. *Dinámica molecular.*

Una forma de realizar una búsqueda conformacional, además de una herramienta para el estudio teórico de las propiedades dinámicas de las moléculas, es la dinámica molecular (MD).

El método de MD consiste en resolver la ecuación de movimiento de Newton para un sistema de partículas sometido a un potencial (generado por el campo de fuerzas). Se toman las velocidades iniciales de los átomos a partir de una distribución Maxwell-Boltzmann a una temperatura dada. A dicha ecuación se puede añadir un término que tenga en cuenta el movimiento browniano y que permita controlar las fluctuaciones de temperatura (ecuación de Langevin).

El movimiento simulado de la molécula permite entonces superar las barreras de energía entre mínimos, especialmente aquellos de alta energía.

2.4.3.3. *Instrumentación.*

Los cálculos de mecánica y dinámica molecular se realizaron usando los campos de fuerza TRIPOS,⁷⁹ incluido en el paquete SYBYL, y MM3*⁸⁰ englobado en MACROMODEL 4.5.⁸¹

3. POLISACÁRIDO AISLADO DE S. FREDII HH103

3.1. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR AISLADO DE *SINORHIZOBIVM FREDII* HH103.

3.1.1. Cultivo de bacterias, aislamiento y purificación de los polisacáridos.

Las condiciones de cultivo de las bacterias son importantes a la hora de definir las características de los polisacáridos producidos por éstas. Así, por ejemplo, se han descrito cambios en la naturaleza de los lipopolisacáridos y polisacáridos capsulares de *Sinorhizobium* dependiendo del pH, la temperatura o la presencia de compuestos reguladores (p. ej. apigenina¹⁷).

Los cultivos de un derivado de *S. fredii* HH103 resistente a la estreptomicina se realizaron en el medio rico TY,⁸² cuya composición es:

Triptona.....	5 g.
Extracto de levadura.....	3 g.
CaCl ₂	0,84 g.
Agua destilada c.s.p.....	1.000 ml.

El pH se ajusta a 7,0 y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 20 min. Para la producción de los polisacáridos superficiales se prepara un cultivo inicial de *S. fredii* HH103 (resistente a la estreptomicina) en 300 ml de medio líquido TY, matenido en agitación (aprox. 180 rpm) a 28 °C. Una vez que este cultivo alcanza la fase estacionaria temprana, se empela como inoculante de 30 litros de medio TY líquido suplementado con el antibiótico estreptomicina. Después de la inoculación, este cultivo se incuba durante 3 días a 28 °C, pasándose aire estéril a un flujo de 50 l/min con el fin de airearlo. Pasado este tiempo, el cultivo se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 15 min. El sobrenadante se elimina y el sedimento de células se lava tres veces con NaCl 0,5 M con el fin de eliminar el posible exopolisacárido residual y otros restos del medio de cultivo. Posteriormente se liofiliza y almacena en botellas selladas a temperatura ambiente.

Se toman 5 g de este sedimento de células y se procede a la extracción de los polisacáridos superficiales tal como se describe en el apartado **¡Error!No se encuentra el origen de la referencia.**, obteniéndose un crudo procedente de la

fase acuosa (**AqHH**) y un crudo procedente de la fase fenólica (**FenHH**). Estos crudos se purifican mediante cromatografía de intercambio aniónico seguido de un tratamiento con enzimas para eliminar los ácidos nucleicos y las proteínas.

El crudo procedente de la fase fenólica (**FenHH**) fue sometido a un análisis de azúcares, se detecta glucosa como único componente de esta fracción. Debido a que no se encontraron azúcares característicos de LPS o CPS, como pueden ser ácidos urónicos o Kdo, no se utilizó esta fracción para un estudio más completo.

3.1.1.1. Separación de los polisacáridos presentes en la fase acuosa (**AqHH**).

En el proceso de aislamiento se extraen tanto el lipopolisacárido como el polisacárido capsular, que, además, suelen ir acompañados de otros polisacáridos celulares como, por ejemplo, glucanas y cicloglucanas. La separación de dichos polisacáridos se realiza mediante cromatografía de filtración sobre gel.

El crudo **AqHH** se cromatografía empleando una columna rellena de Sephacryl S-500 (60 × 2,6 cm) usando NaCl 0,2 M/NaN₃ 0,02 % como eluyente, a un flujo aproximado de 10-12 ml/h. El seguimiento de la columna se realiza mediante un detector de índice de refracción y revelando por el método del sulfúrico-orcinol.²⁵

En la cromatografía del crudo procedente de la fase acuosa (**AqHH**) se obtuvieron tres fracciones (Figura 3.1), que fueron dializadas y liofilizadas:

Fracción AqHH-A: Fracción de peso molecular muy alto, que no fue retenida por la fase estacionaria.

Fracción AqHH-B: Fracción de peso molecular alto, incluida parcialmente en el gel.

Fracción AqHH-C: Fracción de menor peso molecular, eluida en el volumen total de la columna. Ésta última fracción fue posteriormente cromatografiada usando una columna Sephacryl S-400 (rango de fraccionamiento 2.000.000-10.000 Daltons). En esta última separación, se obtuvieron dos picos pero sólo uno de ellos, incluido en el rango de fraccionamiento de la columna, contenía azúcares (Figura 3.1).

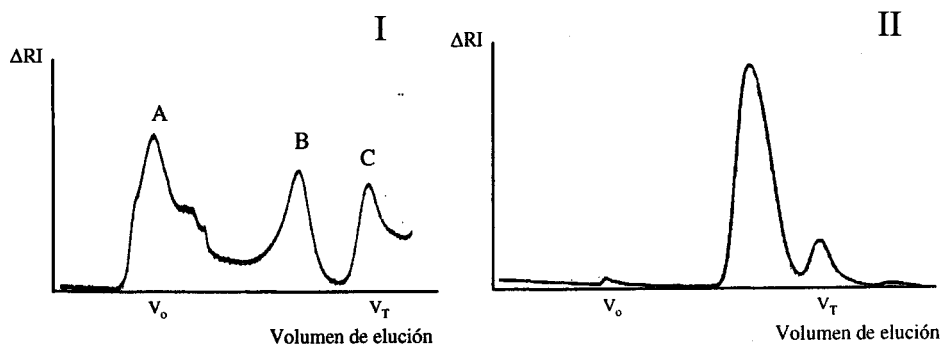


Figura 3.1. Cromatogramas de la elución del crudo de la fase acuosa (AqHH) a través de Sephacryl S-500 (I) y de la última fracción (AqHH-C) por Sephacryl S-400 (II). Los volúmenes de elución y las intensidades no son comparables.

3.1.2. Determinación del peso molecular.

El peso molecular de las distintas fracciones se determina mediante cromatografía de filtración sobre gel (apartado 2.3.6.3).

3.1.2.1. Fracción AqHH-A.

La fracción AqHH-A presenta un volumen de elución igual o muy próximo al volumen vacío de la columna empaquetada con Sephacryl S-500. Puesto que el rango de fraccionamiento de dicha columna es de entre $7 \cdot 10^7$ y $4 \cdot 10^4$ daltons, el peso molecular medio para esta fracción parece ser igual o superior a $7 \cdot 10^7$ daltons. En realidad, los lipopolisacáridos existen en una amplia variedad de estados de agregación dependiendo,²² entre otros factores, de la forma iónica de éstos y de la presencia o no de iones Mg^{2+} o Ca^{2+} . La existencia de estos iones puede ser la responsable, al menos en parte, de la formación de estructuras con un alto grado de agregación que explicarían el alto peso molecular de esta fracción.

3.1.2.2. Fracción AqHH-B.

Para la determinación del peso molecular de la fracción AqHH-B se utilizó la columna μ Bondagel E-linear en el sistema de HPLC descrito en el apartado 2.3.6.3. El rango de fraccionamiento de esta columna es de entre 2.000.000 y 10.000, y se utiliza como sistema de detección un detector ultravioleta-visible seguido de un detector de índice de refracción, aunque las medidas de tiempos de retención se tomaron de los datos de este último.

Se comprueba que la muestra procedente de la fracción AqHH-B es eluida a un volumen que está dentro del rango de fraccionamiento de la columna. Finalmente, se construye la recta de calibrado con patrones de peso molecular conocido. El peso molecular medio de esta fracción, calculado a partir de un volumen de elución de 3,52 ml, se estima en aproximadamente $1,6 \cdot 10^6$ daltons.

3.1.2.3. Fracción AqHH-C.

Para la determinación del peso molecular de los polisacáridos constituyentes de la fracción AqHH-C se utilizó una columna empaquetada con Sephacryl S-400 (apartado 2.3.6.3). A partir del volumen de elución (92 ml) se estima un peso molecular medio de 26.000 daltons. Se obtiene un resultado muy similar cuando se usa la columna μ Bondagel E-linear.

3.1.3. Análisis por electroforesis en poliacrilamida.

Las fracciones AqHH-A, AqHH-B y AqHH-C, así como extractos crudos de células de *S. fredii* HH103 fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. En el revelado se emplea el procedimiento de oxidación con plata, con o sin tratamiento previo con el fijador del polisacárido capsular, azul alciano, CPS, que evita que este polisacárido se elimine en los lavados posteriores. En general, la comparación de geles revelados por ambos métodos permite distinguir entre lipopolisacáridos, que aparecen en ambos casos, y polisacáridos capsulares, que sólo aparecen cuando son previamente fijados con azul alciano.

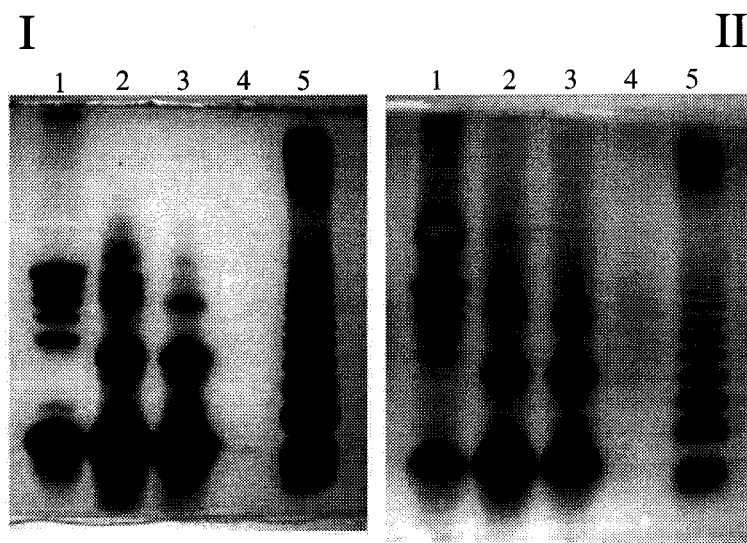


Figura 3.2. SDS-PAGE de los extractos de células de HH103 (carriles I-1 y II-1) y de las fracciones AqHH-A, AqHH-B y AqHH-C (carriles I-2 al I-4 y II-2 al II-4). El gel I fue revelado siguiendo un procedimiento en el que no se trata previamente el gel con azul dextrano. Los carriles I-5 y II-5 son los correspondientes a extractos de células de *Salmonella typhimurium*, tomados como referencia.

La Figura 3.2 muestra que las fracciones AqHH-A (carriles I-2 y II-2) y AqHH-B (carriles I-3 y II-3) contienen LPS, ya que aparecen una serie de bandas escalonadas similares al perfil de bandas de los extractos de células de HH103 (carriles I-1 y II-1), tanto con tratamiento con azul alciano como sin éste. La mayor movilidad de las bandas en estas muestras procedentes del aislamiento y purificación se debe, probablemente, a que el LPS en ellas se encuentra parcialmente degradado.

La fracción AqHH-C no contiene, según los datos de SDS-PAGE, una cantidad significativa de LPS, puesto que no se aprecia ninguna mancha en el gel revelado sin tratarlo con azul alciano (carril I-4), y sólo una mancha difusa cuando éste se emplea en el proceso de revelado (carril II-4). Para mejorar la visualización del polisacárido capsular, se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida pero en ausencia de SDS para evitar la migración de las moléculas

de LPS al interior del gel. De este modo, el revelado sólo muestra las bandas correspondientes al polisacárido capsular.

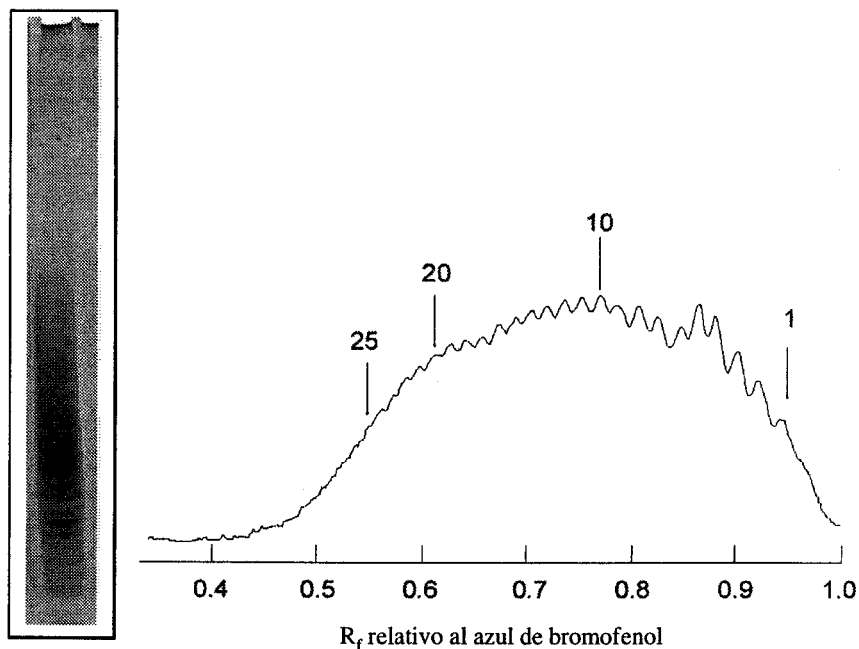


Figura 3.3. PAGE en ausencia de SDS y revelado con azul alciano y oxidación con plata, densitograma de éste y numeración de las bandas de la fracción AqHH-C. La electroforesis se detuvo cuando el azul de bromofenol llegó a 1 cm del extremo del gel. No se detectó ninguna banda por debajo de la marcada como 1.

La Figura 3.3 muestra el perfil de bandas obtenido; el polisacárido fue fijado con azul alciano antes del revelado con plata. Se puede observar un perfil de, al menos, 26 bandas seguido de una mancha borrosa.

En ausencia de azul alciano, no se detecta el polisacárido, incluso usando grandes cantidades de muestra. Estos resultados están de acuerdo con los descritos para los polisacáridos capsulares de *Sinorhizobium*^{26,83,84}. Sin embargo, la sensibilidad del revelado con plata después de la fijación con azul alciano es bastante baja en este caso, puesto que es necesario aplicar de 5 a 10 veces más muestra que la utilizada normalmente. Como se muestra más adelante, la estructura del polisacárido capsular de la cepa HH103 no contiene grupos *cis*-dihales que puedan reducir el ion Ag^+ , lo que explicaría porqué la fracción AqHH-C

casi no se aprecia en la Figura 3.2. La electroforesis del extracto de células en tampón Tris-borato muestra un perfil similar al de la fracción AqHH-C, por lo que el pequeño tamaño del CPS purificado no se debe a su degradación durante la purificación.

Estos datos permiten concluir que el polisacárido contenido en la fracción AqHH-C es el polisacárido capsular aislado de *S. fredii* HH103. Dicho polisacárido se denomina CPS-HH en esta tesis.

3.1.4. Estudio por RMN del polisacárido CPS-HH.

Por comparación de los espectros de ^1H -RMN de las fracciones AqHH-B y AqHH-C (Figura 3.4), se observa que la primera está formada por una mezcla del polisacárido que compone la fracción AqHH-C y otro compuesto; este último podría ser el lipopolisacárido, responsable del patrón de bandas en el análisis de SDS-PAGE, como se ha indicado en el apartado anterior. En el espectro de la fracción AqHH-C no se aprecian las señales de este último compuesto, lo que coincide con lo observado por electroforesis.

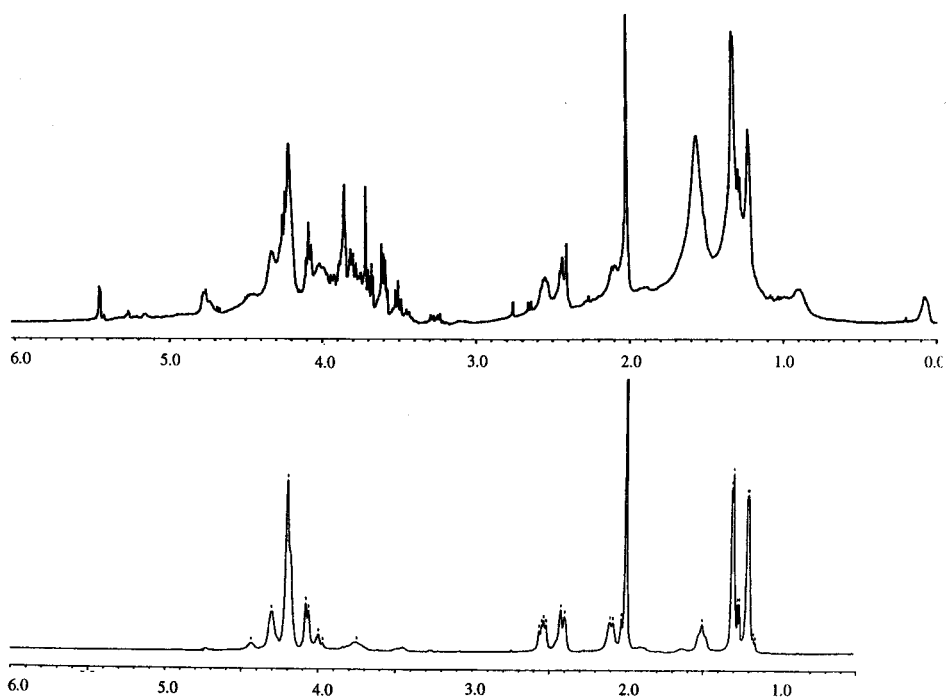


Figura 3.4. Espectros de ^1H -RMN de las fracciones AqHH-B (superior) y AqHH-C (inferior).

Debido a su mayor homogeneidad, se utilizó la Fracción AqHH-C para el estudio por RMN del polisacárido CPS-HH.

El espectro de ^1H -RMN del polisacárido CPS-HH contenido en la fracción AqHH-C que se muestra en la Figura 3.4 proporciona poca información. Así, aunque en la zona entre 1 y 3 ppm se aprecian señales identificables como singuletes ($\delta_{\text{H}} = 2,01$ ppm), dobletes ($\delta_{\text{H}} = 1,30$ y $1,21$ ppm), y multipletes ($\delta_{\text{H}} = 2,75$, $2,43$, $2,11$ y $1,52$ ppm), la zona entre 4 y 5 ppm está muy poco resuelta. Los espectros de ^{13}C -RMN (Figura 3.5) y HSQC editado (Figura 3.6), sin embargo, permiten la identificación y la asignación de varias señales:

La señal en espectro de ^{13}C a $\delta_{\text{C}} = 18,3$ ppm, que se correlaciona en el espectro HSQC con la señal a $\delta_{\text{H}} = 1,30$ ppm se asignó a un grupo metilo; igualmente, la señal a $\delta_{\text{C}} = 19,9$ ppm, correlacionada con la señal a $\delta_{\text{H}} = 1,21$ ppm, se asignó a otro grupo metilo. Finalmente, la señal a $\delta_{\text{C}} = 23,4$ ppm, que el espectro HSQC permite correlacionar con el singulete a $\delta_{\text{H}} 2,01$ ppm, se asignó al grupo metilo de un sustituyente acetilo.

La naturaleza metilénica del carbono de desplazamiento químico 37,2 es demostrada inequívocamente por el signo negativo (rojo) de las correspondientes señales de correlación en el espectro de correlación heteronuclear ($\delta_{\text{H}} = 2,11$ y $1,52$ ppm). De la misma forma, la señal de $\delta_{\text{C}} = 45,2$ ppm, correlacionada con las señales de $\delta_{\text{H}} = 2,75$ y $2,43$ ppm, corresponde a otro carbono metilénico.

Los desplazamientos químicos de las señales a $\delta_{\text{C}} 49,8$ y $55,1$ ppm permiten asignarlas, en un principio, a carbonos metínicos unidos a nitrógeno.

En la región de δ_{C} de 65 a 75 ppm aparecen cuatro señales de carbono ($\delta_{\text{C}} = 73,1$, $69,2$, $68,0$ y $66,4$ ppm), que se correlacionan con señales de protón en la región de δ_{H} de 4 a 4,5 ppm, y fueron asignadas, en un principio, a carbonos metínicos unidos a oxígeno.

La señal ancha a $\delta_{\text{C}} = 99,7$ ppm no presenta una señal de correlación en el HSQC, y fue asignada al carbono acetálico de una cetosa. Además, la región de campo bajo del ^{13}C -RMN muestra tres señales a $173,7$, $175,7$ y $178,0$ ppm que fueron asignadas a tres carbonos carbonílicos.

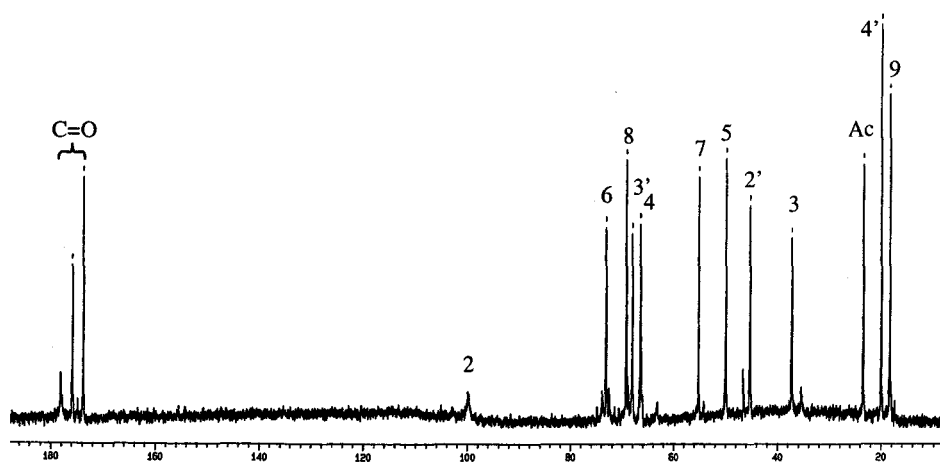


Figura 3.5. Espectro de ^{13}C -RMN del polisacárido CPS-HH registrado a 125,7 MHz.

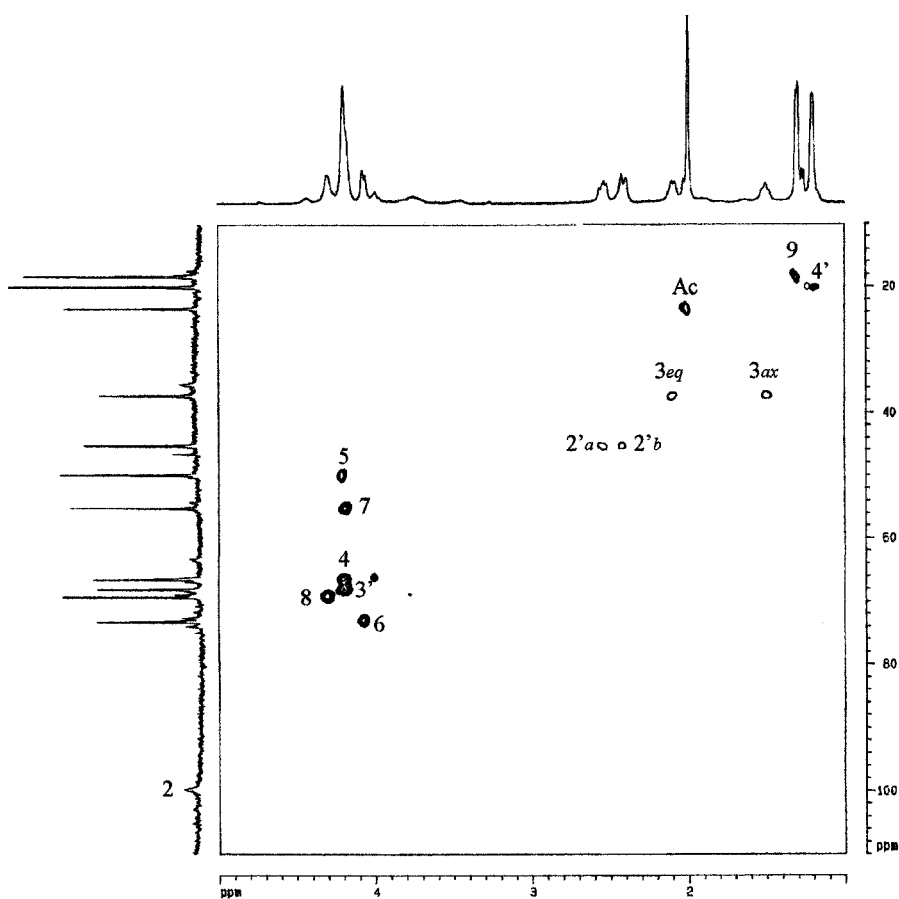


Figura 3.6. Espectro HSQC con multiplicidad editada del polisacárido capsular CPS-HH, registrado a 500 MHz.

La estructura del polisacárido CPS-HH se deduce a partir de los datos de HSQC (Figura 3.6), COSY (Figura 3.7) y 2D-HSQC-TOCSY (Figura 3.8):

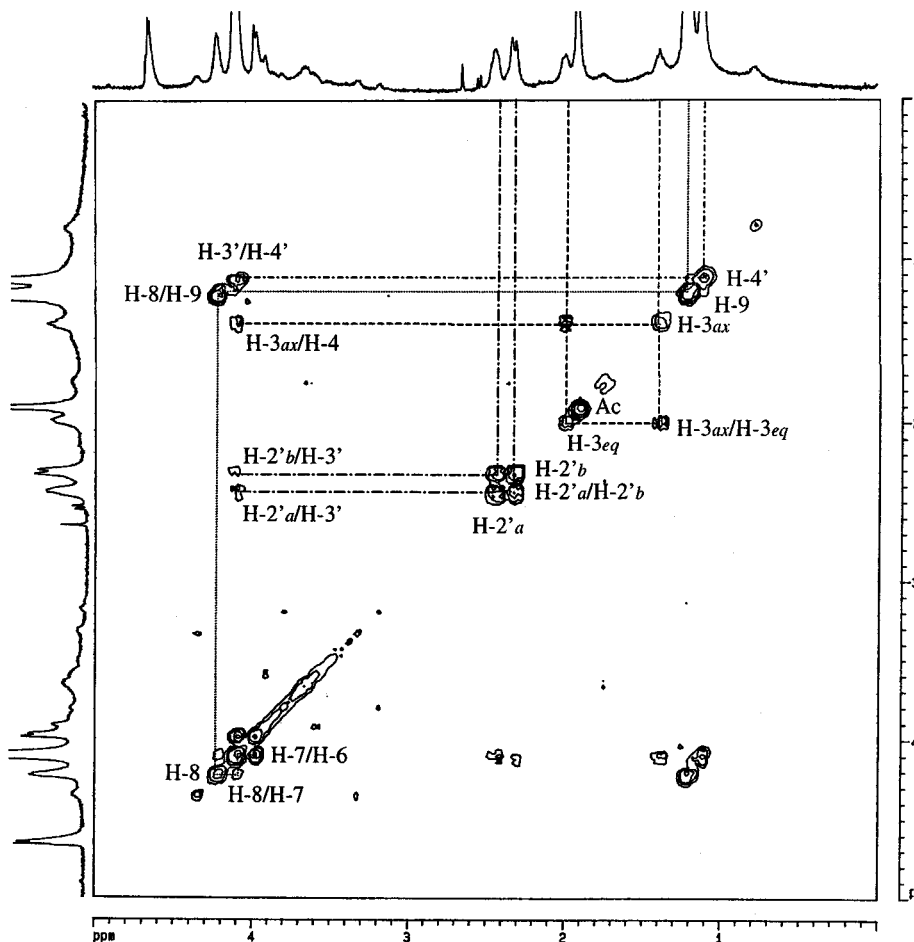


Figura 3.7. Espectro COSY, registrado a 500 MHz, del polisacárido capsular CPS-HH. Las distintas líneas discontinuas señalan las conectividades a lo largo de los sistemas de espín.

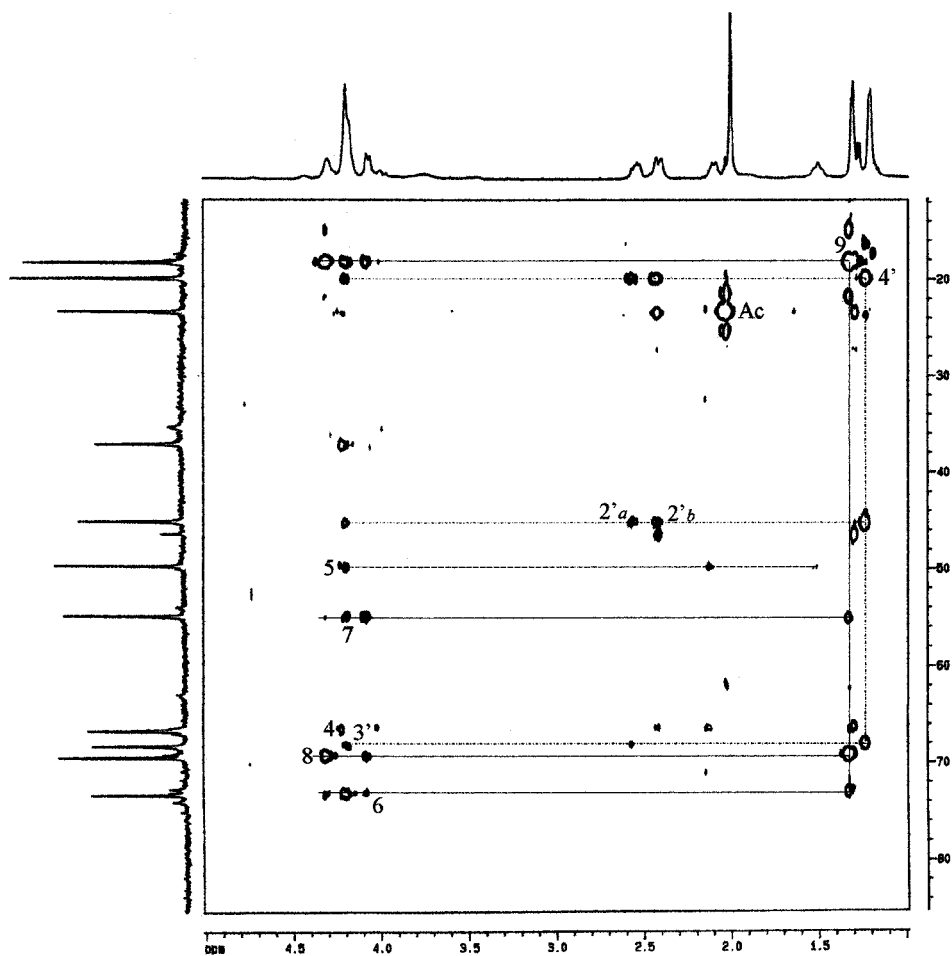
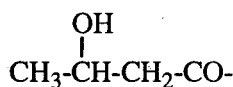


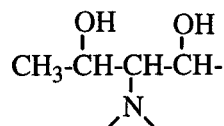
Figura 3.8. HSQC-TOCSY del polisacárido CPS-HH registrado a 500 MHz con un tiempo de mezcla de 140 ms. Los picos negativos (rojos) corresponden a correlaciones de tipo TOCSY mientras que los positivos (negros) corresponden a correlaciones del tipo HSQC.

El espectro 2D-HSQC-TOCSY fue esencial en este estudio, ya que en él, para una determinada señal, las señales de ^1H que pertenecen al mismo sistema de espín se muestran horizontalmente y la de los ^{13}C que pertenecen a dicho sistema de espín se muestran verticalmente. Los datos de RMN permiten identificar una serie de fragmentos que se detallan en los siguientes puntos:

- a) El grupo metilo a $\delta_{\text{H}} = 1,21$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 19,9$ ppm, se correlaciona en el espectro 2D-HSQC-TOCSY con la señales de CH_2 a $\delta_{\text{C}} = 45,2$ ppm y la de $\delta_{\text{C}} = 68,0$ ppm ($\delta_{\text{H}} = 4,20$ ppm). El orden de las señales en este sistema de espín se obtiene a partir del espectro COSY: la señal del metilo y la del grupo CH_2 están correlacionadas con las de $\delta_{\text{H}} = 4,20$, que se asignó tentativamente a la de un metino unido a oxígeno. Por último, los desplazamientos químicos de las señales metilénicas están dentro de la zona de aparición de señales de CH_2 alifático unido a un grupo carbonilo. Por tanto, este sistema de señales permite identificar un grupo 3-hidroxitirilo:

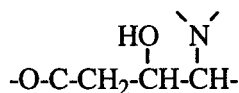


- b) El grupo metilo a $\delta_{\text{H}} = 1,30$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 19,9$ ppm) se correlaciona a través del espectro 2D-HSQC-TOCSY con tres señales a $\delta_{\text{H}} = 4,07$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 73,1$ ppm), $\delta_{\text{H}} = 4,19$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 55,1$ ppm) y $\delta_{\text{H}} = 4,30$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 69,2$ ppm). El desplazamiento químico a 55,1 ppm se asignó, como se dijo anteriormente, al de un carbono metínico unido a nitrógeno. El orden de las señales se determina de nuevo a partir de los datos del espectro COSY: así, la señal de $\delta_{\text{H}} = 1,30$ ppm se correlaciona en el COSY con la de $\delta_{\text{H}} = 4,30$ ppm, y ésta, a su vez, con la de 4,19 ppm. La señal a $\delta_{\text{H}} = 4,07$ aparece correlacionada con una señal a aproximadamente 4,2 ppm. Estas cuatro señales aparecen siempre en el mismo sistema de espín en el espectro 2D-HSQC-TOCSY, con lo que se puede descartar que la señal a $\delta_{\text{H}} = 4,07$ ppm esté correlacionada con otra distinta a la de $\delta_{\text{H}} = 4,19$ ppm. A partir de los datos anteriores se pudo identificar el sistema:



- c) Las señales metilénicas a $\delta_{\text{H}} = 1,52$ y $\delta_{\text{H}} = 2,11$ ppm, características de un 3-desoxiazúcar, están correlacionadas en el espectro HSQC con las de la señal de un carbono metilénico a $\delta_{\text{C}} = 37,2$ ppm. En el espectro 2D-HSQC-TOCSY aparece una señal de correlación de tipo TOCSY (en rojo) entre esta última señal de carbono y una señal a $\delta_{\text{H}} = 4,2$ ppm; aunque no aparecen las señales de tipo HSQC (en negro) para el grupo CH_2 anterior, sí lo hacen cuando se registra el espectro 2D-HSQC-TOCSY usando un tiempo de mezcla de 20 ms en lugar de 140 ms. La señal a $\delta_{\text{C}} = 49,8$ ppm, aparece correlacionada con las del dicho grupo CH_2 en el espectro 2D-HSQC-TOCSY. En el experimento 2D-HSQC-TOCSY registrado con un tiempo de mezcla de 20 ms se aprecia igualmente la correlación entre las señales metilénicas y la señal de carbono a 66,4 ppm. La desaparición de las señales de cruce cuando aumenta el tiempo de mezcla se debe a la transferencia de la magnetización a través de los sistemas de espín, que produce un debilitamiento de la intensidad de la señal HSQC.

En este caso, sin embargo, no se puede determinar el orden de los grupos CH de $\delta_{\text{H}} 4,2$ ppm, ya que se solapan en el espectro COSY. (La señal de cruce H-3 $_{eq}$ / H-4 no aparece, posiblemente debido al pequeño valor de la correspondiente constante de acoplamiento). Posteriormente se pudo determinar dicho orden a partir de los datos de masas y RMN del monosacárido. Parece tratarse, pues, de un sistema



- d) Quedan sin asignar a uno de los anteriores sistemas de espín las tres señales que aparecen en la zona de $\delta_{\text{C}} 173,7\text{-}178,0$ ppm, aunque muy probablemente pertenecen a los carbonilos de los grupos acetilo, 3-hidroxiutilo y al grupo carboxilo de un derivado del Kdo.

Los sistemas de señales b) y c) se asignaron a las señales C-3 a C-9 de un ácido 3,9-didesoxinonulosónico, lo que permite concluir que la muestra analizada

consistía en un homopolímero de un ácido 3,9-tetradesoxi-diaminononulosónico que tiene como sustituyentes un grupo acetilo y un grupo 3-hidroxi-butirilo. El espectro de ^{13}C RMN registrado con un tiempo de espera lo suficientemente largo como para conseguir la relajación de todos los carbonos permite comparar las proporciones relativas de éstos. Se obtuvo una relación muy próxima a 1:1 para las quince señales encontradas, lo que descarta la presencia de otros sustituyentes, así como indica la naturaleza homopolimérica del polisacárido.

Los valores de desplazamiento químico de ^1H y ^{13}C , así como las asignaciones, se resumen en la Tabla 3.1.

		Posición								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Azúcar	H	–	–	1,52(ax) 2,11(eq)	4,20	4,21	4,07	4,19	4,30	1,30
	C	173,7*	99,7	37,2	66,4	49,8	73,1	55,1	69,2	18,3
3-Hidroxibutiramido	H	–	2,75(a) 2,43(b)	4,20	1,21					
	C	178,0*	45,2	68,0	19,9					
Acetamido	H	–	2,01							
	C	175,7*	23,4							

*Las asignaciones son intercambiables

Tabla 3.1. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C para el polisacárido capsular CPS-HH.

3.1.5. Análisis de azúcares.

El análisis por CGL-EM de los *O*-trimetilsilil derivados de los metil glicósidos obtenidos después del tratamiento de las fracciones AqHH-A, AqHH-B y AqHH-C reveló, en todos los casos, la presencia de glucosa, Kdo y trazas de ácido galacturónico, galactosa, manosa, ácido glucurónico y ramnosa. Sin embargo, ni en la fracción AqHH-B ni en la AqHH-C se detectó ningún pico mayoritario que pudiera proceder del monosacárido que constituye el polisacárido identificado por RMN, probablemente debido a la conocida labilidad de este tipo de compuestos bajo condiciones ácidas.^{85,86} En el caso de la fracción AqHH-C, por tanto, sólo aparecerían los azúcares componentes de otro polisacárido, posiblemente el LPS, a pesar de encontrarse en muy baja concentración con respecto al polisacárido capsular.

3.1.6. Análisis por FAB y MALDI-TOF.

Para poder determinar completamente la estructura de la unidad de repetición se procedió a la hidrólisis parcial del polisacárido con ácido acético al 1 % (apartado 2.3.5.1) y se aisló el monosacárido de repetición por cromatografía de filtración sobre gel.

En el análisis por FAB, registrando los iones positivos, se observan los iones pseudomoleculares $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ y $[M+2 Na-H]^+$ (sal sódica más sodio) a m/z 379, 401 y 423, respectivamente. Las masas observadas son consistentes con los elementos estructurales identificados por RMN.

Por otra parte, se registraron los espectros MALDI-TOF en modo positivo del polisacárido CPS-HH y del producto de su autohidrólisis, llevada a cabo calentando la disolución acuosa a 60°C durante aproximadamente tres horas. Los dos espectros son muy similares (la Figura 3.9 muestra el espectro del polisacárido parcialmente hidrolizado). En ellos se aprecian los picos debidos a las agregaciones de los iones procedentes de las diferentes sales sódicas y aductos de éstos con cationes sodio. Así, fueron detectadas las masas m/z 401, asignada como antes al aducto sódico del monómero (registrada m/z 400); m/z 761, asignada al aducto sódico del dímero (registrada m/z 762); m/z 1165, el aducto sódico de la sal disódica del trímero (registrada m/z 1165); m/z 1547, el aducto sódico de la sal

trisódica del tetrámero (registrada m/z 1547); y m/z 1929, el aducto sódico de la sal tetrasódica del pentámero (registrada m/z 1930). La presencia de los aductos de sodio de las sales sódicas ha sido descrita previamente para oligosacáridos del ácido siálico.⁸⁷

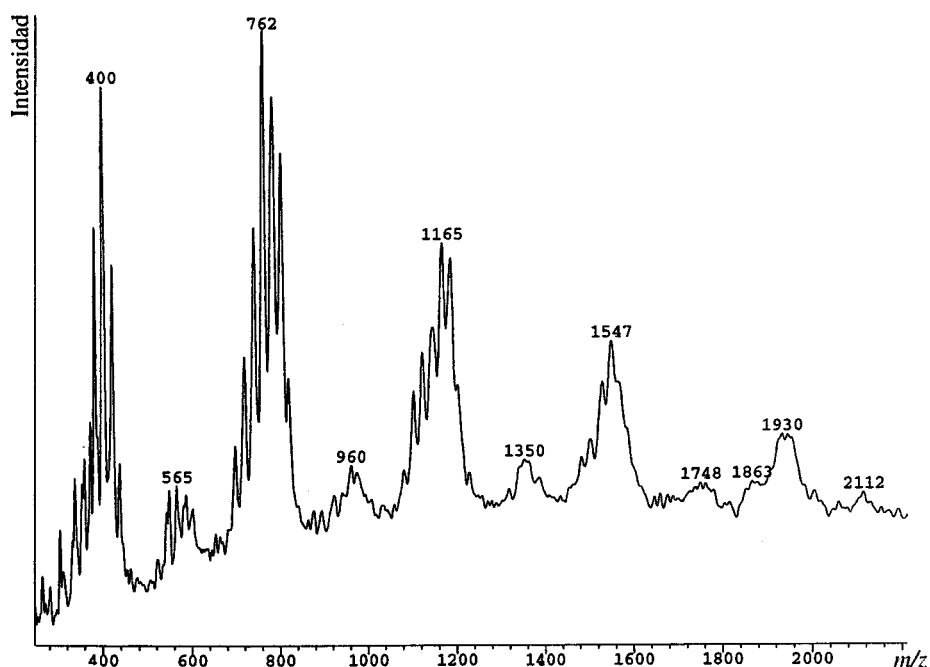


Figura 3.9. Espectro MALDI-TOF registrado en modo positivo del polisacárido CPS-HH parcialmente hidrolizado. Los valores m/z indicados en cada pico corresponden al valor medio de todos los iones en el cluster.

Estos experimentos confirman el peso molecular de la unidad de repetición. Asimismo, muestran que el polisacárido es un homopolímero y que el autohidrolizado está compuesto por una serie homóloga de oligosacáridos.

El tamaño y la proporción de dichos oligosacáridos es importante puesto que puede ser un factor importante en su actividad biológica.⁸⁸ Sin embargo, aunque el tamaño de moléculas pequeñas puede ser determinado de forma muy precisa mediante técnicas de espectrometría de masas, estas técnicas no son adecuadas para la cuantificación de cada componente en una mezcla polidispersa, ya que su sensibilidad disminuye rápidamente cuando aumenta el tamaño de dichas moléculas. No obstante, el rango de polimerización y la abundancia relativa de las

moléculas se puede obtener fácilmente del perfil electroforético (Figura 3.3), aunque no el tamaño absoluto de dichas moléculas. Afortunadamente, en este caso fue posible asignar la banda más rápida al monómero, ya que éste era el menor fragmento obtenido usando MALDI-TOF. La muestra, por tanto, está compuesta por una serie de moléculas con un grado de polimerización de uno a más de 26 unidades de monosacárido (Figura 3.3). No se observa un tamaño predominante, ya que las cantidades de moléculas compuestas de 3 a 20 unidades fueron similares.

3.1.7. Estudio por RMN del monosacárido de repetición.

Los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C se muestran en la Tabla 3.2 y fueron asignados a partir de los datos de ^1H -RMN (Figura 3.11), ^{13}C -RMN (Figura 3.10), COSY (Figura 3.12) y HSQC-editado (Figura 3.13). Los valores de δ_{C} para C-5 y C-7 (50,1 y 54,2 ppm, respectivamente) de nuevo indican que los carbonos en estas posiciones están unidos a nitrógeno.

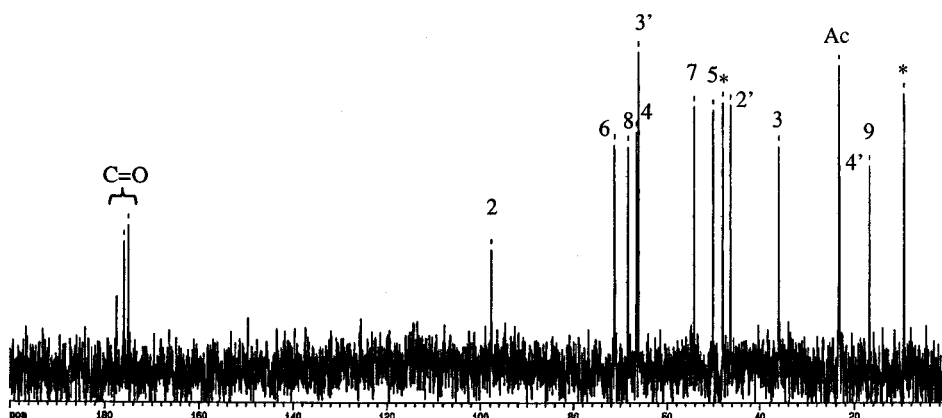


Figura 3.10. Espectro de ^{13}C -RMN, registrado a 125,7 MHz, del monosacárido de repetición aislado del polisacárido CPS-HH. Las señales marcadas con asteriscos corresponden a etanol residual.

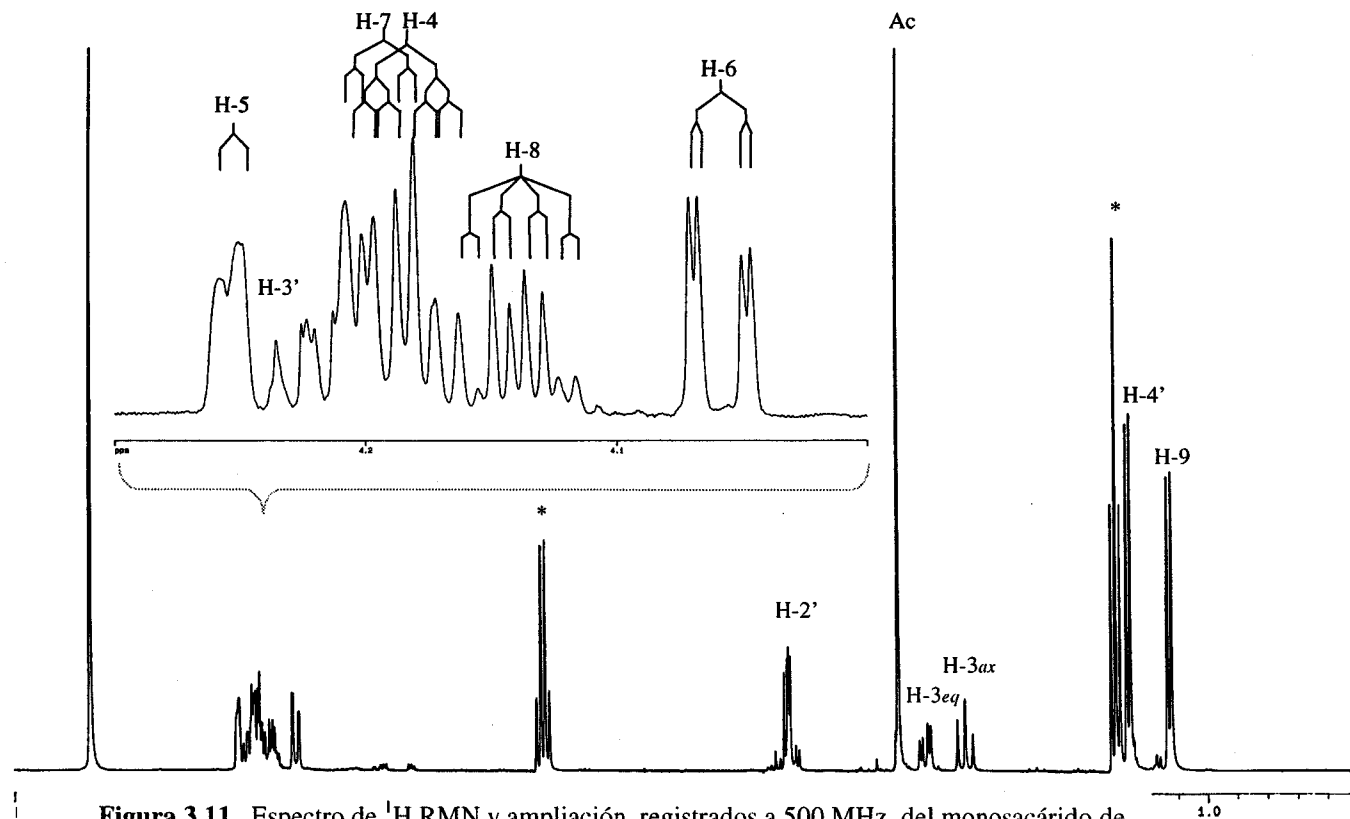


Figura 3.11. Espectro de ¹H RMN y ampliación, registrados a 500 MHz, del monosacárido de repetición. Las señales marcadas con asteriscos corresponden a etanol residual.

La asignación se obtiene fácilmente a partir del COSY (Figura 3.12), ya que se pueden seguir los caminos de conectividad partiendo tanto de los dos metilos (H-9 y H-4'), como de los grupos metilénicos H-3 y H-2'. En dicha figura también se muestra una ampliación de la zona de δ_H 4-4,5 ppm.

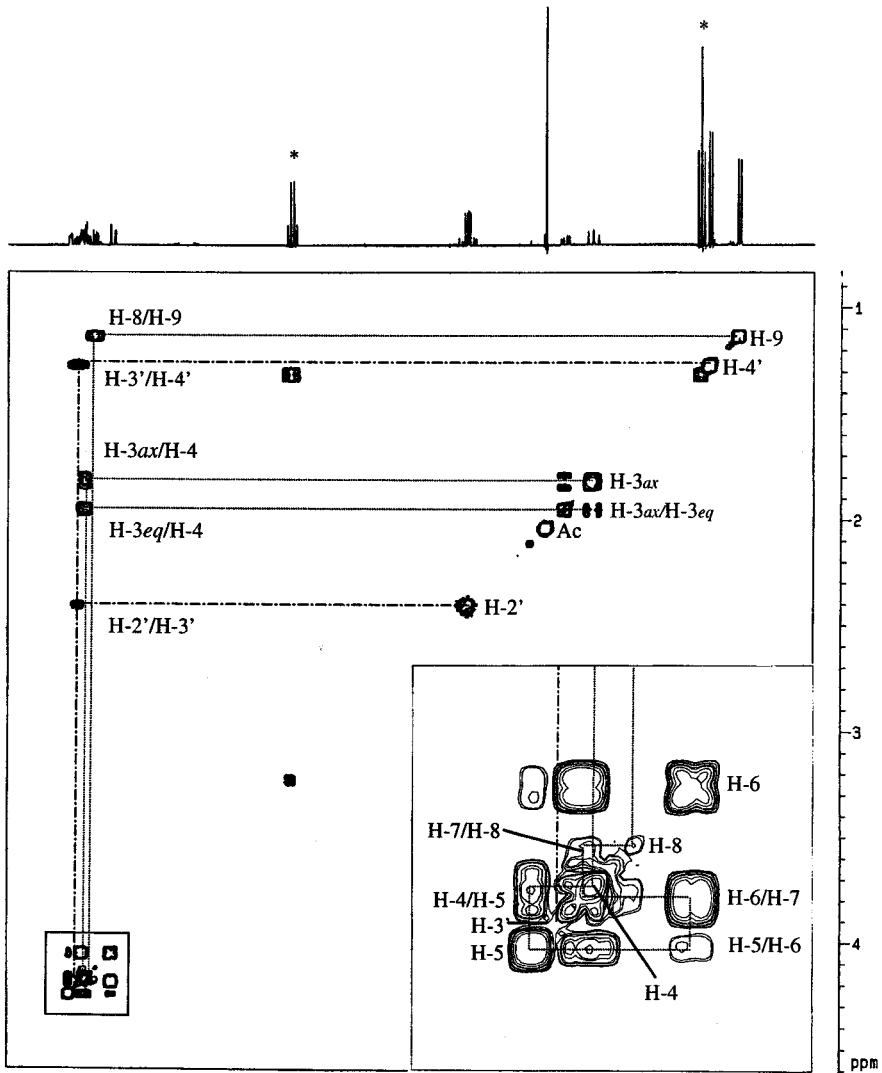


Figura 3.12. Espectro COSY a 500 MHz del monosacárido de repetición. Las señales marcadas con asteriscos corresponden a etanol residual.

La asignación de los carbonos se realizó basándose en espectro de HSQC:

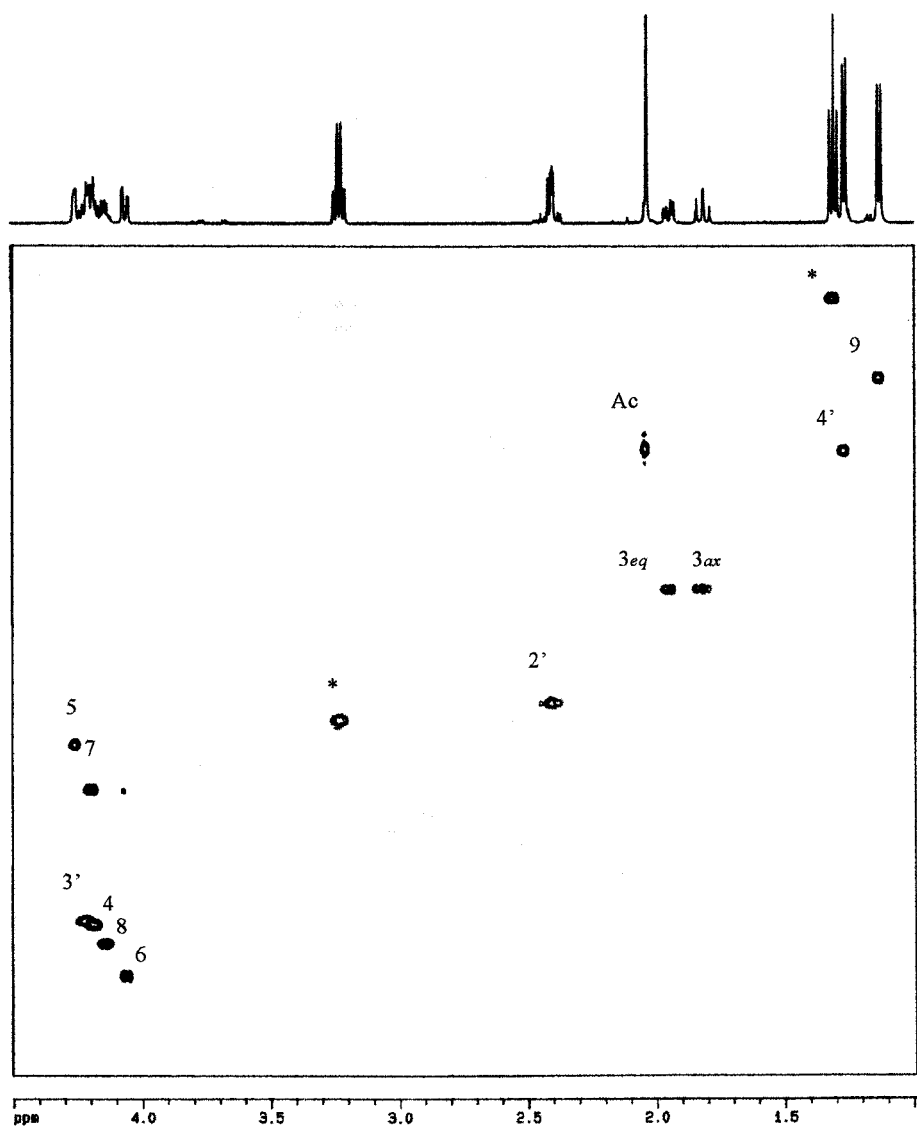


Figura 3.13. Espectro HSQC editado a 500 MHz del monosacárido de repetición. Las señales en rojo corresponden a los carbonos metilénicos. Las señales marcadas con asteriscos corresponden a etanol residual.

Las constantes de acoplamiento $J_{3ax,4}$ (12,7 Hz), $J_{4,5}$ (4,2 Hz) y $J_{5,6}$ (1,7 Hz) indican la orientación axial de H-4 y la ecuatorial de H-5. Puesto que el sustituyente en C-6 no puede ocupar la posición axial, se deduce que la posición de H-6 es axial. Por otro lado, el valor tan bajo de la constante de acoplamiento $J_{5,6}$ es consistente con el valor de $J_{4,5}$ encontrado, por ejemplo, en la D-galactosa. Por lo tanto, el fragmento C-4,5,6 tiene la configuración *lixo*.

El valor relativamente alto de la constante $J_{6,7}$ (10,5 Hz) es característico de derivados del ácido neuramínico que presentan la configuración *eritro* en el fragmento C-6,7,⁹¹ mientras que para la configuración *treo* están descritos valores de constantes de acoplamiento bastante pequeños, del orden de 1 a 2 Hz.⁸⁹

La configuración del fragmento C-7,8 se obtiene comparando los valores de desplazamiento químico de C-9 ($\delta_C = 16,8$ ppm) con los registrados para la configuración *treo* (de 19,6 a 20,3 ppm) y *eritro* (de 16,2 a 17,7 ppm).

Como en el caso del polisacárido, se puede identificar un grupo acetilo y el grupo $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-CO-}$. El hecho de que la diferencia entre los dos H-2' del grupo 3-hidroxi-butanoilo sea mucho mayor en el polisacárido se puede deber a que esta cadena lateral no sea mucho más flexible en el monosacárido.

Por último, la diferencia entre los δ_H de las señales para H-3 ecuatorial y H-3 axial, 0,13 ppm, da cuenta de la posición ecuatorial del grupo carboxilo vecino.⁹⁰

De los datos anteriores se deduce que la configuración del azúcar es L-*glicero-L-mano* o bien la enantiómera de ésta.⁹⁰⁻⁹²

Los datos de desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento se detallan en la Tabla 3.2.

Para determinar la configuración absoluta del azúcar, se midió el poder rotatorio de éste, obteniéndose un valor de $[\alpha]_D -45^\circ$ (c: 1,1 en agua). En la bibliografía se describen otros compuestos similares de configuración absoluta L^{91,92,94} cuyo poder rotatorio es del orden de -30° a -40° , con lo que se puede concluir que el monosacárido es un derivado diacílico del ácido 5,7-diamino-3,5,6,9-tetradexoxi-L-*glicero- α -L-mano*-nonulosónico (ácido pseudamínico).

		Posición								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Azúcar	H	-	-	1,81(ax) 1,94(eq)	4,18	4,25	4,06	4,19	4,14	1,13
	J	-	-	-12,7(3ax,3eq) 12,7(3ax,4)	5,0(3eq,4) 4,2(4,5)	1,7(5,6)	10,5(6,7)	3,3(7,8)	6,5(8,9)	
	C	175,0*	97,7	36,0	66,6	50,1	71,3	54,2	68,4	16,8
3-Hidroxibutiramido	H	-	2,41(a) 2,39(b)	4,23	1,26					
	J	-	-14,5(2'a,2'b) 8,1(2'a,3)	4,9(2'b,3') 6,3(3',4')						
	C	177,4*	46,4	66,2	23,4					
Acetamido	H	-	2,03							
	C	175,9*	23,2							

Tabla 3.2. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C , y constantes de acoplamiento para el monosacárido de repetición aislado del polisacárido capsular CPS-HH. (* Las asignaciones son intercambiables.)

3.1.8. Análisis por impacto electrónico del monosacárido de repetición.

La posición de los sustituyentes acilo presentes en el monosacárido de repetición procedente del polisacárido CPS-HH se determina a partir de los espectros de impacto electrónico de alta resolución de su correspondiente alditol permetilado.

El grupo carbonilo se redujo tal como se indica en el apartado 2.3.5.2, aunque utilizando NaBD₄ en lugar de NaBH₄. El poliol resultante se esterificó con HCl 0,625 M en metanol (20 °C, 2,5 h) y posteriormente se redujo el grupo carboxilo tratándolo con 2 mg de NaBH₄ disuelto en 500 µl de etanol:agua (75:25 v/v) durante 12 h a temperatura ambiente. Finalmente, se metiló (apartado 2.3.3.1) y se sometió a un análisis por CGL-EM. Éste mostró la presencia de (2*R* y 2*S*)-3,5-7,9-tetradesoxi-2-deutero-1,2,4,6,8-penta-*O*-metil-5-(*N*-metilacetamido)-7-[*N*-metil-(3-metoxibutiramido)]-*L*-glicero-*L*-manonitol. El cromatograma resultante, junto con el espectro de masas y el esquema de fragmentación, se muestran en la Figura 3.14.

La determinación de las masas exactas de los fragmentos por espectrometría de masas de alta resolución confirma el esquema de fragmentación propuesto. Los resultados se recogen en la tabla siguiente. El pico base a *m/z* 102,091674 (C₅H₁₂NO) se asignó a un fragmento secundario procedente de la pérdida de CH₃CH(OCH₃)CH=C=O en el fragmento primario de *m/z* 202,143719.

Fragmento	Masa exacta	Fórmula Molecular	Desviación (p.p.m.)
479	479,331282	C ₂₃ H ₄₅ DN ₂ O ₈	0,9
434	434,295509	C ₂₁ H ₄₀ DN ₂ O ₇	4,9
420	420,281651	C ₂₀ H ₃₈ DN ₂ O ₇	0,8
331	331,223404	C ₁₆ H ₃₁ N ₂ O ₅	-0,1
277	277,187385	C ₁₃ H ₂₅ DNO ₅	0,0
246	246,170080	C ₁₂ H ₂₄ NO ₄	1,8
233	233,161089	C ₁₁ H ₂₁ DNO ₄	0,3
202	202,143719	C ₁₀ H ₂₀ NO ₃	3,0
102	102,091674	C ₅ H ₁₂ NO	2,1

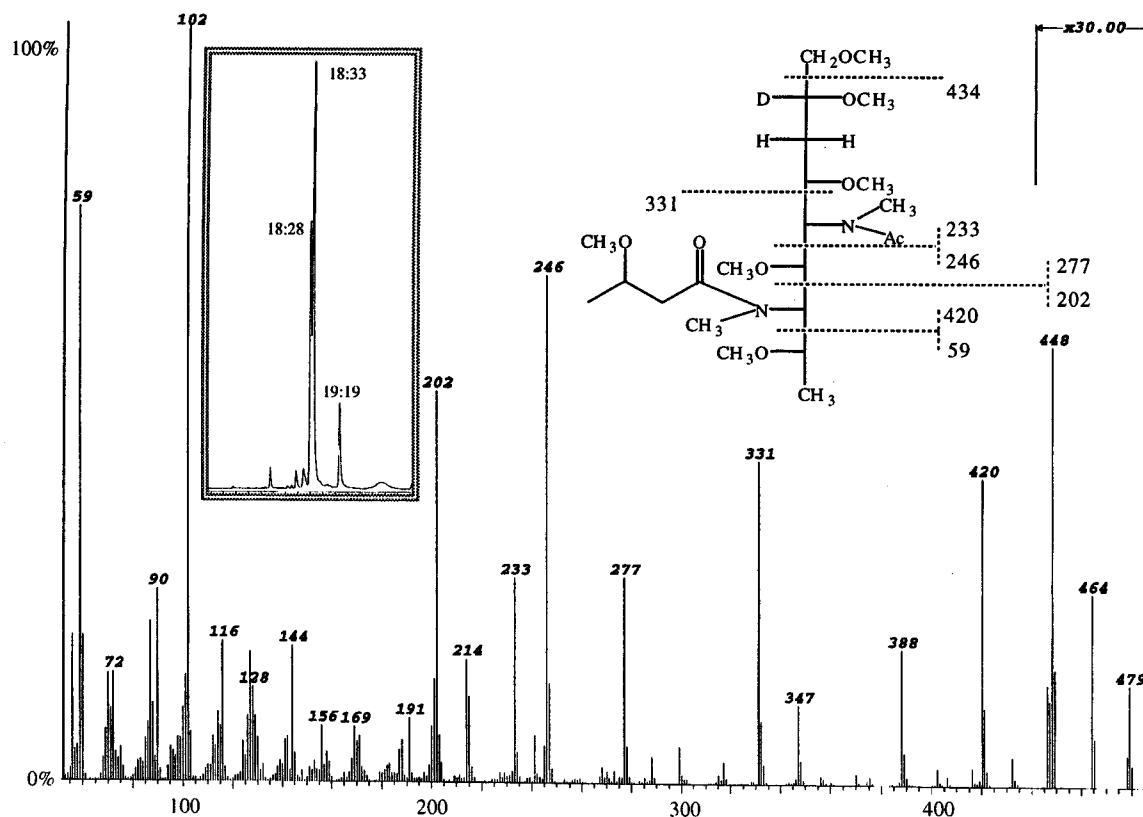


Figura 3.14. Cromatograma de CGL-EM de la mezcla resultante de la formación del alditor permetilado derivado del monosacárido de repetición, IE-EM y esquema de fragmentación del (2*R* ó 2*S*)-3,5,7,9-tetradexosi-2-deutero-1,2,4,6,8-penta-*O*-metil-5-(*N*-metilacetamido)-7-[*N*-metil-(3-metoxibutiramido)]-*L*-glicero-*L*-manonitol (picos a 18:28 y 18:33). El pico a t_R 19:19 corresponde al derivado con el grupo COOCH_3 sin reducir.

Los datos anteriores permiten determinar la posición de los sustituyentes en el monosacárido de repetición. Así, el grupo acetilo se encuentra en C-5, unido a través de un nitrógeno, y el grupo 3-hidroxi-butirilo se encuentra en C-7, unido también a través del nitrógeno. Igualmente, se confirma la secuencia del esqueleto carbonado del monosacárido obtenida mediante RMN.

3.1.9. Determinación de las posiciones de enlace en el polisacárido CPS-HH.

La posición del enlace glicosídico del derivado del ácido pseudamínico en el homopolisacárido se determina mediante el análisis por metilación de un disacárido aislado en la hidrólisis parcial de éste (ver apartado anterior).

Se redujo el grupo carbonilo del oligosacárido, se metiló y se redujo el grupo carboxilo. Posteriormente se hidrolizó (ácido trifluoroacético al 1 %, 100 °C, 1 h.), redujo y acetiló tal como se describe en el apartado 2.3.3.3. En el análisis por CGL-EM sólo se puede detectar la presencia del derivado procedente de la unidad reductora: (2*R* ó 2*S*)-1-*O*-acetil-3,5,7,9-tetradesoxi-2-deutero-2,4,6,8-tetra-*O*-metil-5-(*N*-metilacetamido)-7-[*N*-metil-(3-*O*-acetilbutiramido)]-*L*-glicero-*L*-manononitol (Figura 3.15).

El espectro de impacto electrónico de alta resolución confirma, al igual que en el apartado anterior, el esquema de fragmentación propuesto. Los resultados se recogen en la tabla siguiente:

Fragmento	Masa exacta	Fórmula Molecular	Desviación (p.p.m.)
535	535,320986	C ₂₅ H ₄₅ DN ₂ O ₁₀	1,0
476	476,271663	C ₂₂ H ₃₈ DN ₂ O ₉	0,4
359	359,216887	C ₁₇ H ₃₁ N ₂ O ₆	3,7
305	305,182540	C ₁₄ H ₂₅ DN ₂ O ₆	-0,8
274	274,165515	C ₁₃ H ₂₄ NO ₅	-0,2
261	261,157209	C ₁₂ H ₂₁ DNO ₅	-4,3
230	230,139220	C ₁₁ H ₂₀ NO ₄	0,1
102	102,091595	C ₅ H ₁₂ NO	2,9

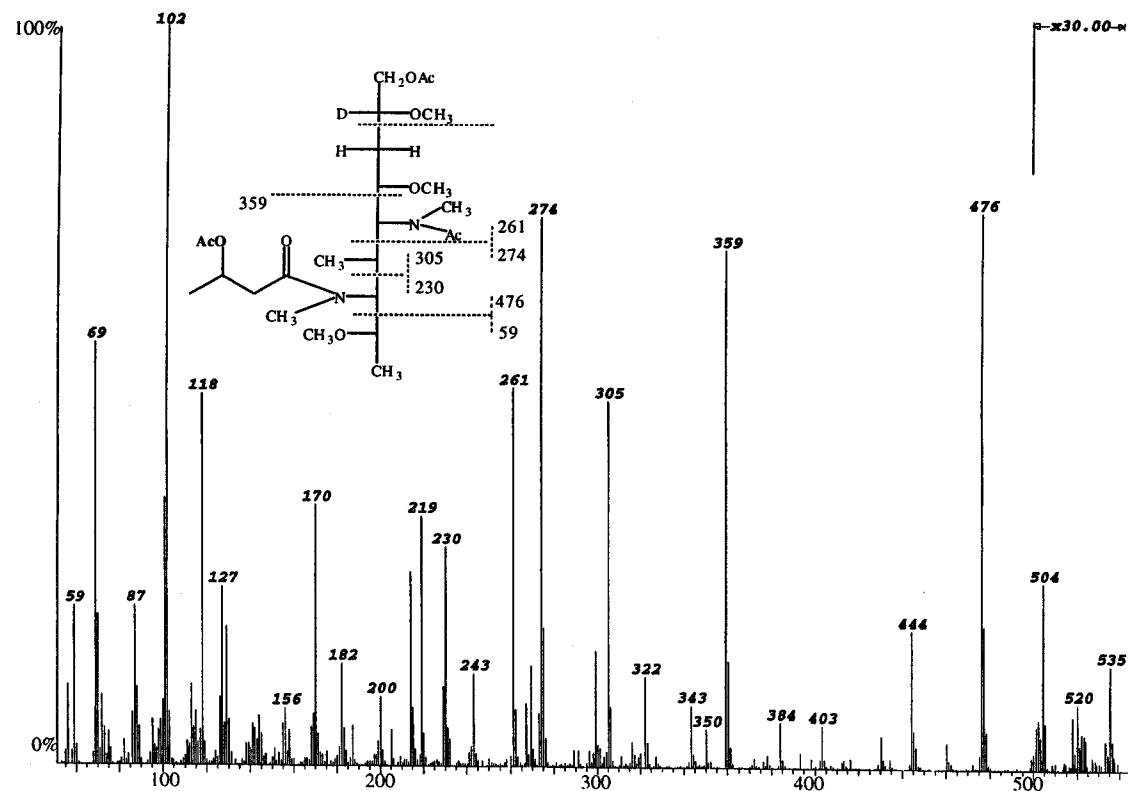


Figura 3.15. IE-EM y esquema de fragmentación del (2*R* ó 2*S*)-1-*O*-acetil-3,5,7,9-tetradesoxi-2-deutero-2,4,6,8-tetra-*O*-metil-5-(*N*-metilacetamido)-7-[*N*-metil-(3-*O*-acetilbutiramido)]-*L*-glicero-*L*-manononitol obtenido en el análisis por metilación de un disacárido procedente de la hidrólisis parcial del polisacárido CPS-HH.

El pico a m/z 102 tiene el mismo origen que el que se indica en el apartado anterior.

Los anteriores resultados muestran claramente que el enlace glicosídico se da entre el OH hemiacetálico de una unidad y el grupo hidroxilo del residuo 3-hidroxitiramido de la unidad contigua. En consecuencia, las unidades de repetición en el azúcar están unidas por dos enlaces: uno acetálico y otro amídico.

El hecho de que el enlace sea acetálico y, por tanto, de que no exista un hidrógeno unido al carbono anomérico, hace que no se encuentren diferencias considerables entre los δ_C de los carbonos implicados en el enlace y los vecinos en el monosacárido y el polisacárido. Así, están descritas diferencias de 1,5 a 2 ppm en el carbono sustituido (efecto α), y de aproximadamente -1,5 y -2,0 ppm para los carbonos vecinos (efecto β).^{92,93} Estos datos son consistentes con los obtenidos comparando los δ_C de la cadena de 3-hidroxitiramido del monosacárido y el polisacárido: para C-2', C-3' y C-4' las diferencias son -1,2, 1,8 y -3,5 ppm. Este último valor difiere más de los datos descritos en la bibliografía probablemente debido a que el C-4' no está unido a un grupo hidroxilo.

Asimismo, la pequeña diferencia entre los desplazamientos químicos de H-3_{ax} y H-3_{eq} (0,59 ppm) en el espectro de ¹H-RMN del polisacárido (Tabla 3.1) indica la orientación ecuatorial del grupo carboxilo (para una orientación ecuatorial de dicho grupo está descrita una diferencia de 0,6 ppm, mientras que para la orientación axial esta diferencia es de aproximadamente 0,9 ppm^{92,95}). Por otro lado, el desplazamiento δ_C para C-2 está descrito como entre 99 y 100 ppm cuando la orientación es ecuatorial y entre 101 y 104 ppm cuando es axial.⁹³ El valor de δ_C en este caso es 99,7, lo que corrobora la orientación ecuatorial del grupo COOH. De acuerdo con las recomendaciones para la nomenclatura de carbohidratos, la anomería del enlace glicosídico es, por tanto, α .

3.1.10. Determinación de la configuración absoluta del grupo 3-hidroxitiramido.

La hidrólisis del polisacárido CPS-HH con TFA 2 M (121 °C, 1 h), seguida de la extracción del hidrolizado con acetato de etilo permite aislar el ácido 3-hidroxitirámico. La configuración absoluta de éste se determina formando los

correspondientes 2-octil ésteres *R* y *S*, que posteriormente son sililados y analizados por CGL-EM.

Para la esterificación se usa (*S*)-2-octanol y (*R,S*)-2-octanol en presencia de ácido trifluoroacético (una gota, 140 °C, toda la noche), y la sililación se lleva a cabo como se describe en el apartado 2.3.1.1. Para el análisis cromatográfico se utiliza un gradiente de temperatura de 10 °C/min desde una temperatura inicial de 70 °C (3 min) hasta una temperatura final de 170 °C seguido de un gradiente de 25 °C/min hasta 280 °C. El potencial de ionización fue de 70 eV.

La Figura 3.16 muestra los cromatogramas parciales para la mezcla 1:1 de diastereoisómeros obtenida con la esterificación con 2-octanol racémico (a) y la mezcla 3:1 obtenida con la esterificación con (*S*)-2-octanol (b). Cuando el mismo procedimiento se aplica sobre una muestra de ácido 3-hidroxi-butírico enantioméricamente puro (SIGMA) sólo se obtiene uno de los picos cuando se usa (*S*)-2-octanol, con lo que se descarta la posibilidad de que la muestra haya sufrido una racemización parcial.

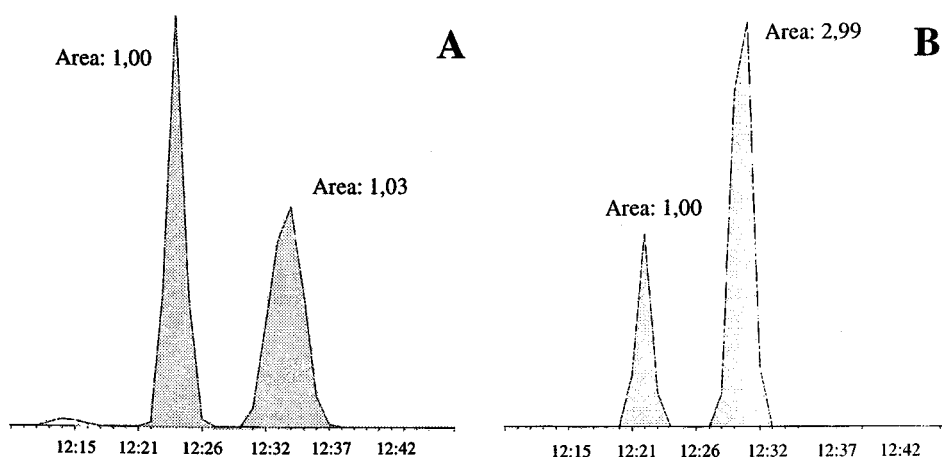
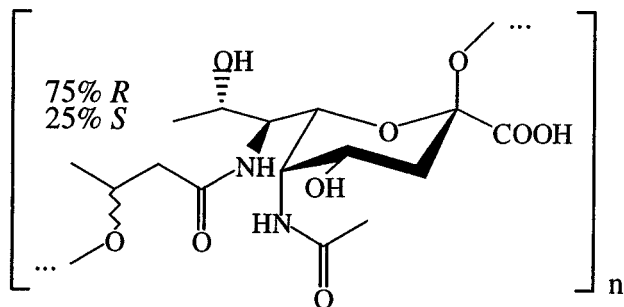


Figura 3.16. Análisis por CGL-EM de la mezcla de diastereoisómeros obtenidos en la determinación de la configuración absoluta del ácido 3-hidroxi-butírico presente en el polisacárido CPS-HH. **A)** Mezcla 1:1 obtenida con la esterificación con 2-octanol racémico. **B)** Mezcla 1:3 obtenida con la esterificación con (*S*)-2-octanol.

Los resultados anteriores permiten proponer que el 75 % del ácido 3-hidroxi-butírico en el polisacárido tiene la configuración *R* y el 25 % la configuración *S*. Finalmente, la estructura propuesta para el polisacárido capsular producido por *Sinorhizobium fredii* HH103 es la siguiente:



3.2. ESTUDIO CONFORMACIONAL EN DISOLUCIÓN DEL POLISACÁRIDO AISLADO DE *SINORHIZOBIUM FREDII* HH103 Y DE SU UNIDAD DE REPETICIÓN.

En primer lugar se procedió a un estudio conformacional del monosacárido de repetición mediante cálculos de dinámica molecular y estudios de RMN basados en el efecto NOE. Posteriormente, a partir de los datos obtenidos, se procedió al estudio del polisacárido en disolución.

3.2.1. Estudio conformacional del monosacárido de repetición.

Para los cálculos de dinámica molecular se definieron los siguientes ángulos diedros:

Φ : C-1-C-2-O-2-C-3'	ω_3 : C-6-C-7-N-7-C-1'
Ψ : C-2-O-2-C-3'-C-4'	ω_4 : N-7-C-1'-C-2'-C-3'
ω_1 : C-5-C-6-C-7-C-8	ω_5 : C-1'-C-2'-C-3'-C-4'
ω_2 : C-6-C-7-C-8-C-9	

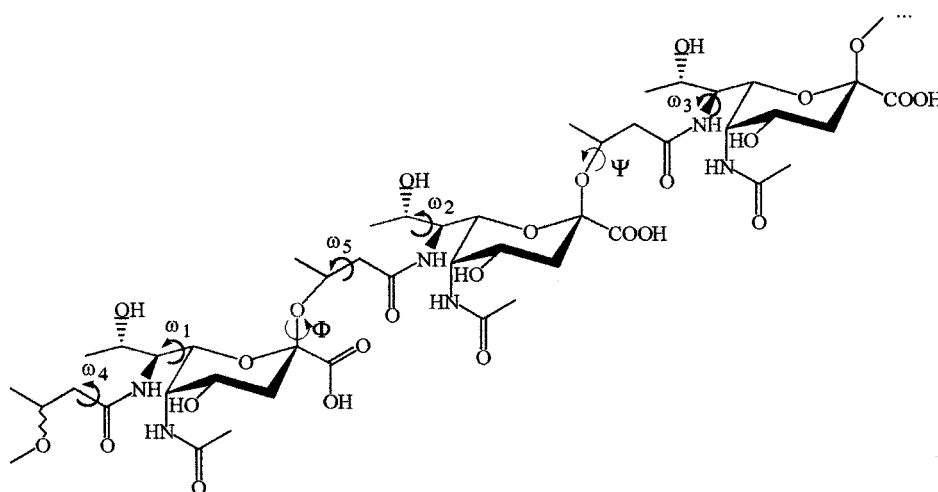


Figura 3.17. Definición de los ángulos diédros en el polisacárido CPS-HH y su monosacárido de repetición. Los ángulos diédros vienen definidos por los enlaces con el mismo color.

3.2.1.1. Estudio de modelado molecular.

Como un primer paso para determinar la estructura tridimensional del polisacárido, se realizaron cálculos de mecánica y dinámica molecular sobre el monosacárido. Así, puesto que el campo de fuerzas MM3* ha dado resultados satisfactorios en el estudio de azúcares,⁹⁶ se utilizó dicho programa, incluido en MACROMODEL 4.5,⁹⁷ para calcular el espacio conformacional accesible.

En primer lugar, se llevaron a cabo veintisiete simulaciones de dinámica molecular (MD) utilizando diferentes estructuras de partida. En dichas estructuras, los valores iniciales de ω_1 y ω_2 fueron 180° y -60° en todos los casos, de acuerdo con los datos de RMN (que se discuten más adelante en el apartado 3.2.1.2), aunque dichos ángulos se dejaron libres durante las minimizaciones y las simulaciones de dinámica molecular. Por otra parte, los valores de ω_3 , ω_4 y ω_5 se tomaron como combinaciones de los valores 60° , -60° y 180° . Los enlaces amídicos se consideraron en la conformación *trans*. Por último, la configuración de grupo 3-hidroxibutiramido se tomó inicialmente como *S*.

Para la simulación del disolvente se utilizó, en el caso de las minimizaciones, una constante dieléctrica $\epsilon = 80$, y el modelo de disolvente continuo GB/SA (*Generalized Born Solvent-accessible Surface Area*) para realizar las dinámicas. En general, las estructuras fueron minimizadas con gradientes conjugados y las estructuras resultantes fueron utilizadas como estructuras de partida en las dinámicas a 300 K. El paso de integración fue de 1 fs. El periodo de equilibración fue de 100 ps, tras el cual se registraron las estructuras cada ps durante 1 ns.

En la Figura 3.18 se presenta un histograma de los distintos valores que adoptan los ángulos de torsión estudiados.

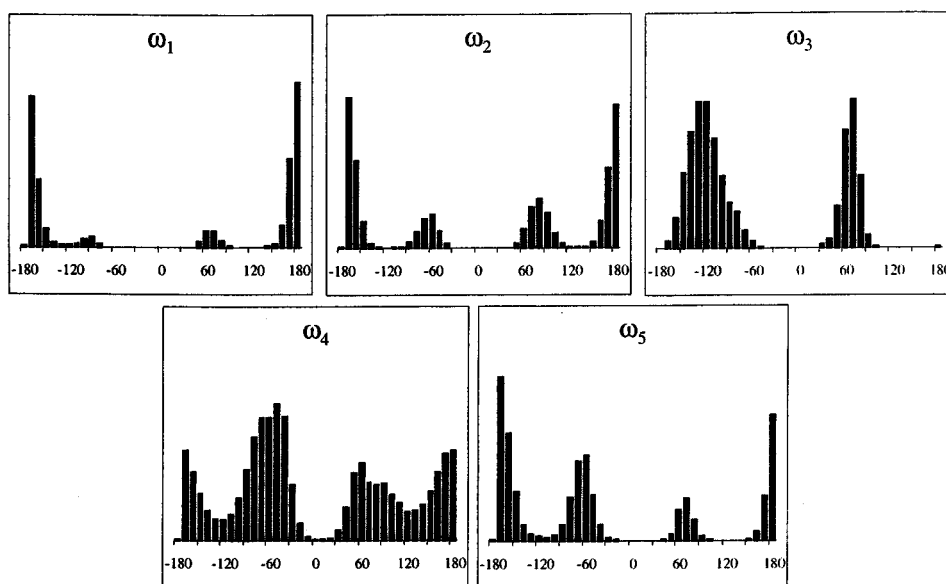


Figura 3.18. Histogramas de las poblaciones de los diferentes ángulos de torsión del monosacárido de repetición durante las 27 simulaciones de dinámica molecular (1 ns cada una) con el campo de fuerzas MM3*.

Se observa:

- ω_1 permanece próximo a 180° en todas las simulaciones.
- En lo que respecta a ω_2 , las tres conformaciones alternadas están presentes según los datos de MD, y sería especialmente importante la conformación *anti*; sin embargo, según los datos de RMN, el valor de ω_2 en la conformación mayoritaria es cercano a -60° (ver apartado 3.2.1.2), ya que de otro modo la constante $J_{7,8}$ sería mucho mayor.
- Para ω_3 , los valores se agrupan en dos zonas: en una de ellas, dicho ángulo de torsión adopta un valor próximo a 60° , mientras que en la segunda, el ángulo cambia a -120° , lo que proporciona una interacción estérica menor que en el caso de la conformación anterior.
- ω_4 se encuentra muy distribuido entre los tres posibles valores, destacando -60° .

- Por último, ω_5 adopta una disposición *anti* preferentemente, aunque los valores *gauche* también son posibles.

A lo largo de las distintas dinámicas estudiadas, se aprecia que estos dos últimos ángulos de torsión (ω_4 y ω_5) están correlacionados. Así, se observan frecuentemente las parejas ω_4/ω_5 $-60^\circ/180^\circ$, $60^\circ/60^\circ$, $-60^\circ/-60^\circ$ y $180^\circ/-60^\circ$ independientemente de la estructura de partida. Dichas parejas, muy probablemente, corresponden a mínimos de baja energía. Para analizar convenientemente esta relación, se procedió a calcular el mapa relajado de energía potencial para la pareja de ángulos de torsión ω_5 vs ω_4 . Para ello, previamente se genera el correspondiente mapa rígido usando un paso de 18° . Posteriormente, cada punto (ω_4, ω_5) de este mapa fue optimizado usando hasta 5000 iteraciones con gradientes conjugados. La conformación de partida, con respecto al resto de los ángulos, se tomó $\omega_1 = 180^\circ$, $\omega_2 = -60^\circ$ y $\omega_3 = -120^\circ$. El resultado se muestra en la Figura 3.19.

Puesto que las dinámicas se realizaron tomando como estructura de partida el monosacárido con configuración absoluta *S* en el grupo 3-hidroxibutiramido, se calculó también el mapa relajado del monosacárido *R* para poder comparar los resultados. Se observa que ambos mapas son prácticamente idénticos, ya que la conformación energéticamente más favorable es aquella en la que $\omega_5 = 180^\circ$ en ambos casos, es decir, el metilo se encuentra en *anti* con respecto al resto de la cadena. Sólo se aprecian diferencias en los mapas de probabilidad cuando se examinan algunos mínimos de mayor energía, por ejemplo $180^\circ/-60^\circ$ en el monosacárido *S* y $180^\circ/60^\circ$ en el monosacárido *R*. En realidad, estos mínimos corresponden a estructuras equivalentes, enantiómeras considerando sólo el grupo 3-hidroxibutiramido, y la diferencia procede fundamentalmente de la definición del ángulo diedro ω_5 : los valores positivos en un enantiómero corresponden a los negativos en el otro, y viceversa.

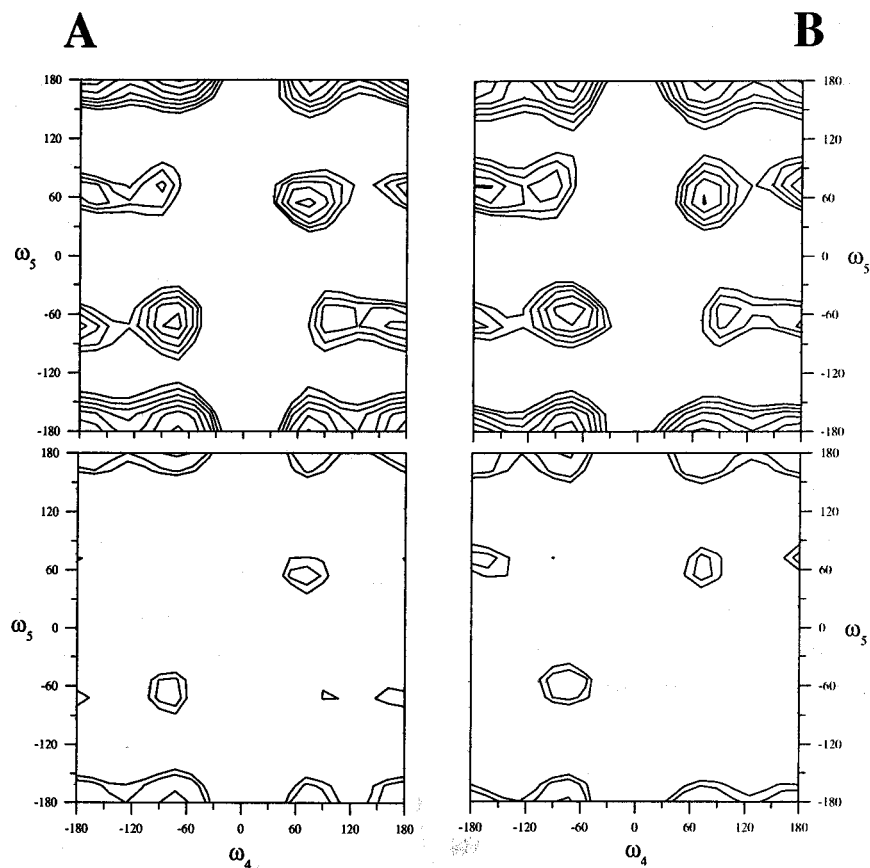


Figura 3.19. Mapas relajados obtenidos con MM3* $\epsilon=80$ (parte superior) y sus correspondientes mapas de probabilidad calculados a 300 K (parte inferior). Los niveles de energía están dados cada $2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ hasta un máximo de $12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ sobre el mínimo global; los niveles de probabilidad están dados a 0,5, 1 y 5 %. La figura **A** corresponde al grupo 3-hidroxitiramido con configuración *S* y la figura **B**, al grupo con la configuración *R*.

El mínimo global, junto con los mínimos de menor energía se muestran en la siguiente tabla:

R						S					
ω_1	ω_2	ω_3	ω_4	ω_5	E (kJ/mol)	ω_1	ω_2	ω_3	ω_4	ω_5	E (kJ/mol)
-179	-65	-138	-77	180	105,8	-178	-65	-135	-72	-175	105,4
-178	-63	-134	71	175	106,7	-180	-64	-131	-174	-178	106,5
-179	-65	-133	178	177	107,2	-179	-65	-135	74	179	107,2
-178	-67	-145	-77	-59	107,9	-179	-66	-143	-78	-66	108,1
-179	-65	-135	73	62	108,9	-178	-65	-135	70	54	108,8

Tabla 3.3. Mínimos de baja energía calculados a partir de los mapas relajados ω_4 vs ω_5 .

Así pues, la presencia de varios conformeros distintos no puede descartarse (apartado 3.2.1.2), sino que es muy posible que varias geometrías estén presentes al mismo tiempo en disolución. No obstante, se puede considerar la siguiente figura como una visión representativa de una de las conformaciones mayoritarias del monosacárido en disolución:

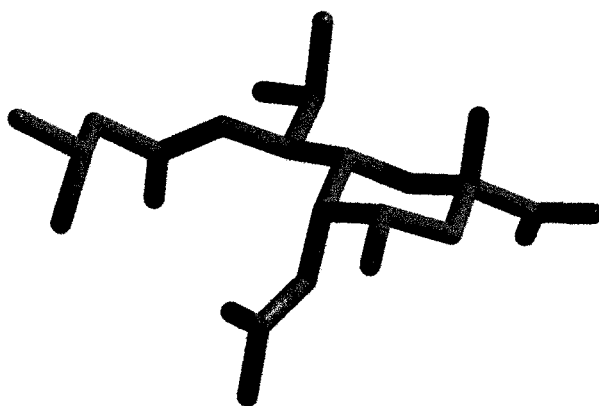


Figura 3.20. Uno de los posibles conformeros de baja energía del monosacárido de repetición, que está de acuerdo con los datos de RMN.

3.2.1.2. Información obtenida por RMN.

Puesto que los datos obtenidos por RMN son valores promediados en el tiempo, los parámetros que se pueden deducir a partir de estos experimentos corresponden a una conformación promedio.

Los experimentos de RMN fueron registrados en un espectrómetro Varian Unity 500, usando una disolución aproximadamente 12 mM de la muestra a diferentes temperaturas entre 299 y 320 K. Los espectros se registraron en D₂O. El experimento HMBC se realizó usando la secuencia “*gradient enhanced*”,⁹⁸ con 256 incrementos de 2 K puntos reales para digitalizar un ancho espectral de 2.000 × 15.000 Hz. Se adquirieron ocho barridos por incremento, con un retardo de 65 ms para la evolución de acoplamiento ²*J* y ³*J*. Los experimentos 2D NOESY,⁹⁹ 2D ROESY¹⁰⁰ y 2D-T-ROESY¹⁰¹ se realizaron usando cuatro tiempos de mezcla diferentes: 150, 300, 450 y 600 ms, con 256 incrementos de 2 K puntos reales. Se observó una buena linealidad hasta 200 ms (NOESY) y 300 ms (ROESY). Los errores estimados en las intensidades de los NOE son menores del 20%. Los experimentos 1D NOESY se adquirieron con los mismos tiempos de mezcla usando la técnica “*double pulse field gradient spin echo*”.¹⁰²

Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C fueron asignados completamente tal como se recoge en la **Tabla 3.1** y **Tabla 3.2**. Las ambigüedades en la asignación de los carbonos de los grupos carboxílicos se resolvieron mediante una combinación de HMBC y HMQC-TOCSY.

Los anillos de piranosa pueden describirse como esencialmente monoconformacionales ¹C₄, tal como se deduce de los acoplamiento vecinales protón-protón. En el caso del monosacárido, los acoplamiento para la cadena lateral C-6–C-9 fueron *J*_{6,7} = 10,5 Hz, *J*_{7,8} = 3,3 Hz y *J*_{8,9} = 6,5 Hz, lo que indica una conformación mayoritaria de dicha cadena lateral que corresponde a una orientación *anti* entre H-6 y H-7, y una orientación *gauche* entre H-7 y H-8. El enlace H-8–H-9 es flexible, como se deduce del valor promedio de la constante de acoplamiento *J*_{8,9}. De hecho, los valores de *J* esperados para ω₁ 180° y ω₂ -60° son 10,1 Hz y 3,2 Hz, muy cercanos a los experimentales.

Por otra parte, el valor de las constantes de acoplamiento *J*_{2',a,3'} y *J*_{2',b,3'} (8,1 y 4,9 Hz) indica que la conformación *anti* no es la única que se encuentra presente respecto a ω₅, ya que los valores teóricos en este caso serían 11,4 y 1,6 Hz. En el caso del monosacárido *R*, los valores teóricos de estas constantes de acoplamiento en las conformaciones con ω₅ 60° son 3,1 y 11,6 Hz, y 1,6 y 5,1 Hz en la

conformación con $\omega_5 -60^\circ$. Se puede calcular a partir de estos valores teóricos la proporción de cada conformación necesaria para obtener los datos experimentales, resultando que la conformación *anti* se encuentra en disolución en aproximadamente un 60%, mientras que las dos conformaciones *gauche* están presentes en un 30% ($\omega_5 +60^\circ$) y un 10% ($\omega_5 -60^\circ$). Estos resultados se reflejan, al menos aproximadamente, en el mapa de probabilidad calculado para dicho monosacárido.

Así pues, la existencia de varios mínimos próximos energéticamente implica que la presencia de varios conformeros distintos no puede descartarse, sino que es muy posible que varias geometrías estén presentes al mismo tiempo en disolución, especialmente en lo que se refiere al grupo 3-hidroxitiramido. No obstante, se puede considerar la Figura 3.20 como una visión representativa de una de las conformaciones mayoritarias del monosacárido que está de acuerdo con los cálculos de mecánica y dinámica molecular y con los datos de RMN.

La buena linealidad observada al construir las curvas para los espectros NOESY y ROESY (intensidad frente a tiempo de mezcla) garantizó que fuese adecuada la aplicación de la aproximación de los espines aislados, dentro de ciertas restricciones. Para el monosacárido, todas las señales de cruce en el NOESY fueron positivas (a 500 MHz, 299 K y 300 ms de tiempo de mezcla).

3.2.2. Estudio conformacional del polisacárido.

3.2.2.1. Información obtenida por RMN.

Al igual que en el caso del monosacárido, se determinaron las distancias entre protones en el polisacárido a partir de los datos de NOE, aplicando la aproximación de espines aislados. Los resultados se recogen en la Tabla 3.5.

Las constantes de acoplamiento se pudieron estimar en el polisacárido a partir de las anchuras de las señales de cruce en los espectros TOCSY, COSY y HSQC. Se pudo determinar que las constantes $J_{6,7}$, $J_{7,8}$ y $J_{8,9}$ no cambian significativamente en el polímero respecto a las del monosacárido de repetición. Por otro lado, los protones H-2'*a* y H-2'*b* se encuentran mucho más diferenciados en el espectro que en el caso del monosacárido, lo que denota una menor flexibilidad en la cadena lateral (Figura 3.4).

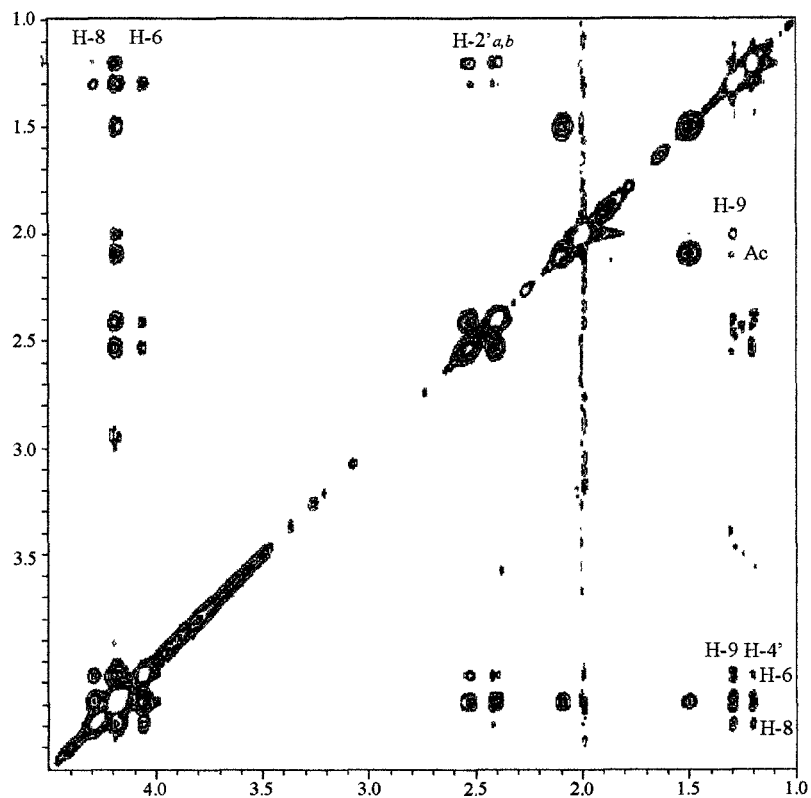


Figura 3.21. Sección parcial del espectro NOESY a 500 MHz del polisacárido CPS-HH, tomado a 299 K con un tiempo de mezcla de 300 ms.

3.2.2.2. Estudio de modelado molecular.

Una vez realizado el estudio conformacional del monosacárido, se construyó un disacárido que fue posteriormente exhaustivamente minimizado; dicho disacárido se utilizó para generar un tetrasacárido en el que todos los grupos 3-hidroxibutiramido tenían la *configuración R* (tetrasacárido RRRR). Los valores iniciales de los ángulos de torsión en dicho tetrasacárido se tomaron de modo que estuviesen de acuerdo con los datos de RMN (Tabla 3.5) y con los obtenidos en el estudio conformacional del monosacárido.

De la misma forma, para examinar el comportamiento de dichos ángulos de torsión en estructuras de mayor tamaño, se construyó un octasacárido que fue sometido a minimización. La conformación elegida resultó ser estable, ya que los ángulos de torsión resultantes tras el proceso de minimización no difieren en gran medida de los valores iniciales. Los correspondientes ángulos de torsión y distancias interprotónicas se muestran en las Tabla 3.4 y Tabla 3.5. Igualmente, la Figura 3.22 muestra una imagen de dicha conformación. Puede observarse que la cadena adopta una estructura pseudohelicoidal.

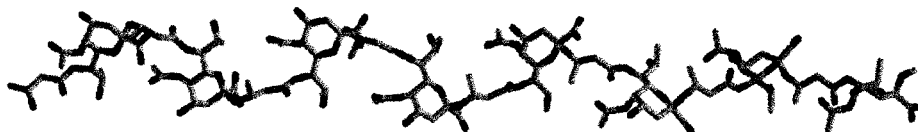


Figura 3.22. Conformación de un fragmento octasacárido del polisacárido CPS-HH, que está de acuerdo con los datos de RMN.

Por su parte, el tetrasacárido previamente generado se sometió a una simulación de dinámica molecular. En ella se observa que, aunque la estructura inicial se mantiene en los primeros instantes de la simulación, ésta rápidamente adopta una conformación aparentemente más estable (Figura 3.23). Los datos de MD muestran que la orientación adoptada por el ángulo de enlace Φ es la favorecida por el efecto *exo*-anomérico ($\Phi = 60^\circ$). Con respecto a Ψ , se adopta mayoritariamente una relación *sin* entre la cadena lateral y el anillo de piranosa, con valores centrados alrededor de -120° (Figura 3.23). Dichos valores suponen una disposición eclipsada de los enlaces C-2-O-2 y C-3'-H-3' que minimiza las interacciones estéricas entre el anillo de azúcar, especialmente el grupo COOH, y la cadena de 3-hidroxibutiramido (incluido el grupo metilo en C-4').

Con respecto al resto de las torsiones ω , las más estables corresponden a $\omega_1 = 180^\circ$, $\omega_2 = -60^\circ$, $\omega_3 = -120^\circ$, $\omega_4 = 180^\circ$ y $\omega_5 = 60^\circ$ (Figura 3.23). Estos valores de ω_4 / ω_5 , que en el monosacárido correspondían a un mínimo poco poblado estadísticamente, corresponden ahora a la conformación más poblada debido a que en ella la cadena y el anillo de azúcar se disponen en una orientación *anti*.

Torsión	Promedio en la MD	Promedio en el octasacárido.
Φ	66	67
Ψ	-86	76
ω_1	175	174
ω_2	-72	-77
ω_3	-137	-137
ω_4	-168	-168
ω_5	74	65

Tabla 3.4. Ángulos de torsión para la estructura minimizada encontrada para el octasacárido y los valores promedio hallados en la dinámica molecular del tetrasacárido.

En la Tabla 3.5 se presenta una comparación entre los valores de distancia protón-protón obtenidos experimentalmente y los calculados tanto a partir de la dinámica molecular del tetrasacárido como de la estructura minimizada del octasacárido. Se aprecia que, aunque la correspondiente estructura media puede explicar la mayoría de los NOE interresiduales, algunos de los valores encontrados en la MD difieren significativamente de los datos experimentales, especialmente la distancia entre H-9 y el metilo del grupo acetamido (H-9/Me-Ac). Una forma de explicar este resultado experimental es que, además de la conformación encontrada en la dinámica molecular, exista una proporción significativa de la conformación presentada por el octasacárido.

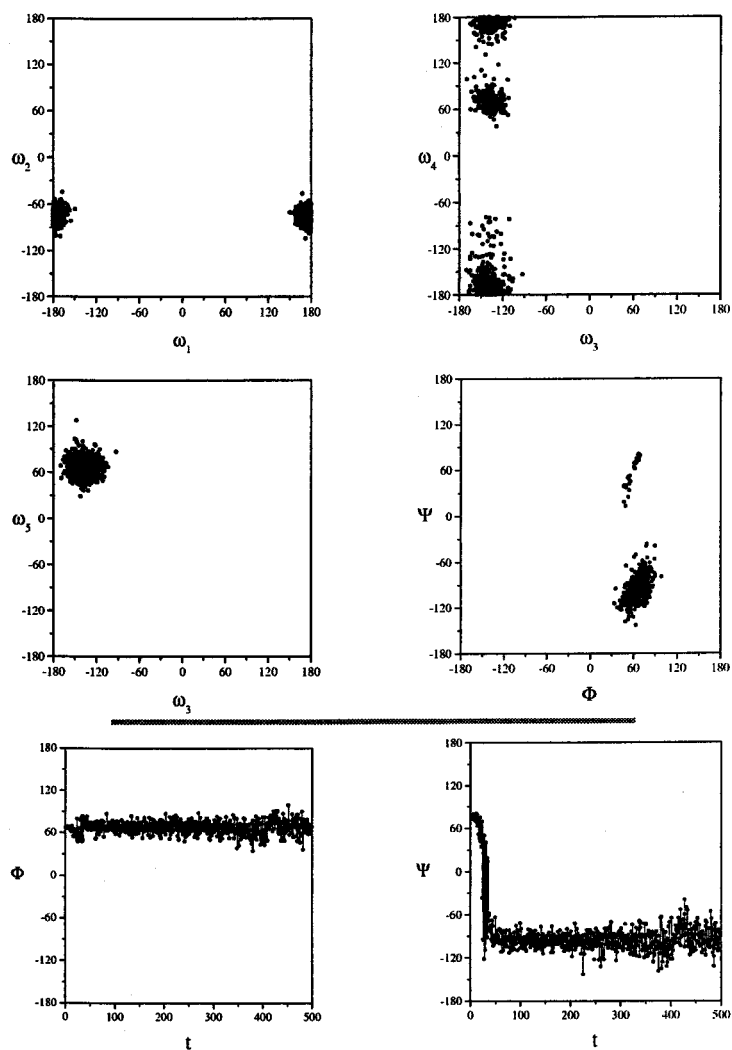


Figura 3.23. Mapas de los ángulos de torsión ω (arriba) y trayectorias de los ángulos Φ y Ψ (abajo) durante la MD de 500 ps del tetrasacárido *RRRR*. Se muestra la suma de la trayectorias de cada uno de los tres enlaces glicosídicos.

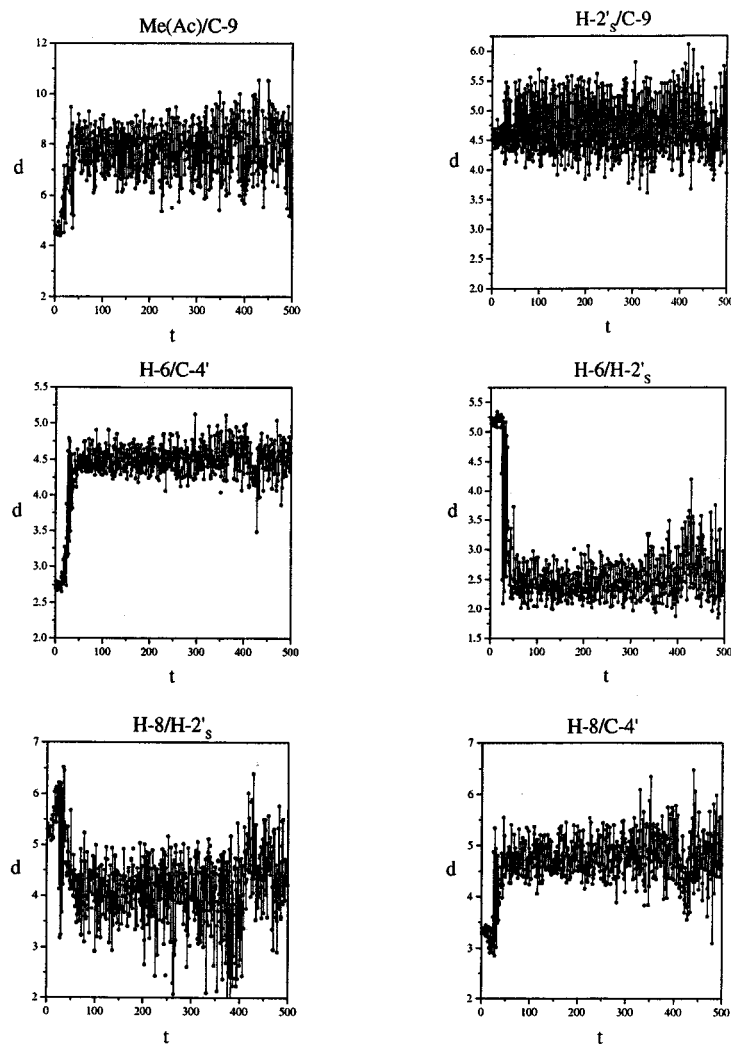


Figura 3.24. Trayectoria de algunas distancias protón-protón y protón-carbono (en Å) calculadas durante la dinámica molecular de 500 ps del tetrasacárido *RRRR*. Se muestra la suma de las trayectorias de cada uno de los enlaces glicosídicos.

Pareja H/H	MM (Å)	MD (Å)	Exp. (Å)
H-9/ H-6	1,9	1,7 (1,4/2,2)	2,5-2,9
H-8/ H-6	3,0	3,0 (2,4/3,7)	2,5-2,9
H-4'/ H-6	1,6	3,3 (1,7/5,4)	2,9-3,5
H-4'/ H-8	2,2	3,6 (2,5/5,0)	2,8-3,4
H-9/ But 2a,b	3,4	3,5 (2,5/5,0)	2,7-3,3
H-9/ Ac-Me	2,3	4,0 (2,2/8,3)	2,9-3,5
H-6/ But 2a,b	4,3	3,8 (1,8/5,3)	2,8-3,4
H-8/ But 2a,b	3,6	4,6 (3,4/6,9)	2,9-3,5

Tabla 3.5. Comparación entre las distancias experimentales (Exp) obtenidas para el polisacárido y las distancias promedio calculadas para el octasacárido (MM) y el tetrasacárido (MD). Junto a estas últimas se incluyen también los valores máximo y mínimo hallados en la dinámica molecular. En el caso de los protones pertenecientes a grupos metilo, la distancia se ha calculado restando 1,1 Å a la distancia carbono-protón.

Por otra parte, se construyó un segundo tetrasacárido usando como unidad de repetición un disacárido en el que el grupo 3-hidroxi-butiramido del extremo no-reductor tenía la configuración *S*, mientras que dicho grupo tenía la configuración *R* en el extremo reductor. Este tetrasacárido, denominado *SRSR*, fue sometido a una simulación de dinámica molecular. En este caso, se puede observar (Figura 3.25) que, mientras que Φ sigue siendo aproximadamente 60° , los valores de Ψ y ω_5 son muy diferentes dependiendo de la configuración del grupo 3-hidroxi-butiramido implicado en el enlace glicosídico. Así, Ψ y ω_5 adoptan valores próximos a -120° y 60° , respectivamente, cuando dicho grupo tiene la configuración *R*, como ocurre en el tetrasacárido *RRRR*. Sin embargo, cuando presenta la configuración *S* los valores adoptados son próximos a 120° y -60° . En ambos casos, la orientación entre los enlaces C-2-O-2 y C-3'-H-3' es eclipsada, y entre los enlaces C-1'-C-2' y C-3'-O-2 es *anti*.

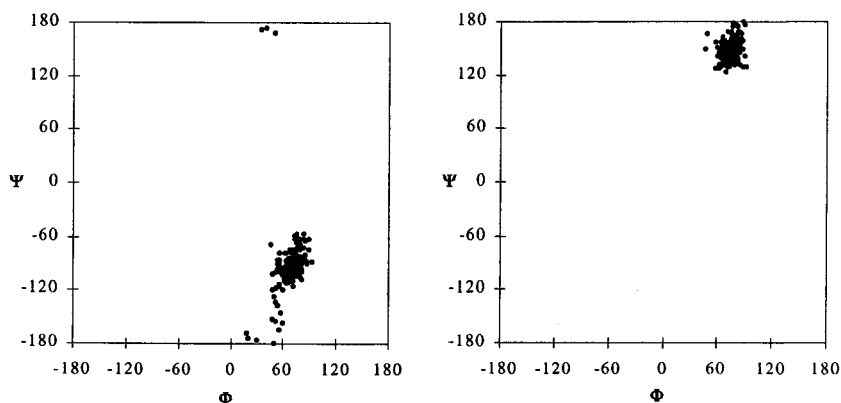


Figura 3.25. Mapas Ψ vs Φ de los enlaces glicosídicos en el tetrasacárido *SRSR* durante la dinámica molecular de 500 ps. Se presentan los mapas correspondientes a un enlace con un grupo 3-hidroxibutiramido con la configuración *R* (izquierda) y con la configuración *S* (derecha).

La Figura 3.26 muestra la comparación entre la trayectoria de la distancia C-9/Ac-Me durante la dinámica en el caso de un enlace con un grupo 3-hidroxibutiramido con la configuración *R* (tetrasacárido *RRRR*) y en el caso de un grupo con la configuración *S* (tetrasacárido *SRSR*). Se aprecia que este último da lugar a una mayor aproximación de ambos grupos metilo durante toda la simulación (la distancia mínima entre protones obtenida es de 1,6 Å). Así, las señales NOE H-9/Ac-Me pueden explicarse también si los grupos 3-hidroxibutiramido con la configuración *S* se encuentran distribuidos homogéneamente en una cadena formada por monosacáridos con la configuración *R*.

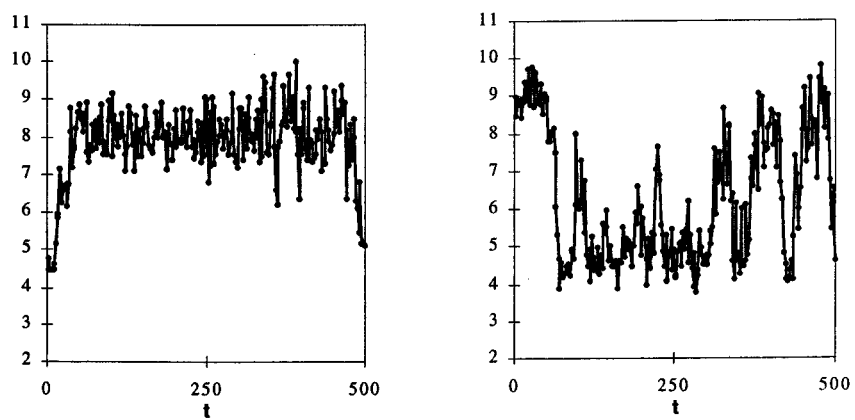


Figura 3.26. Trayectorias de las distancias C-9/Ac-Me en los tetrasacáridos *RRRR* (izquierda) y *SRSR* (derecha) durante las MD de 500 ps.

4. POLISACÁRIDO AISLADO DE S. FREDII SVQ293

4.1. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR AISLADO DE *SINORHIZOBIUM FREDII* SVQ293.

4.1.1. Cultivo de bacterias, aislamiento y purificación de los polisacáridos.

El mutante *S. fredii* SVQ293 es un derivado de *S. fredii* HH103 que tiene una inserción del transposón Tn5. Dicho mutante forma una colonia más mucosa que la cepa nativa, requiere tiamina para crecer en medios mínimos y forma nódulos en la soja que fijan muy poco nitrógeno.

Para obtener los polisacáridos bacterianos se preparan cultivos iniciales de 300 ml en medio líquido TY (descrito en el apartado 3.1.1), manteniendo el sistema en agitación (aprox. 180 rpm) a 28 °C. Una vez que este cultivo alcanza la fase estacionaria temprana, se emplea como inoculante de 30 litros de medio TY líquido suplementado con el antibiótico kanamicina. Después de la inoculación, este cultivo se incuba durante 3 días a 28 °C, pasándose aire estéril a un flujo de 50 l/min con el fin de airearlo. Transcurrido este tiempo, el cultivo se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 15 min. El sobrenadante se elimina y el sedimento de células se lava tres veces con NaCl 0,5 M con el fin de eliminar el posible exopolisacárido residual y otros restos del medio de cultivo. Posteriormente se liofiliza y almacena en botellas selladas a temperatura ambiente.

Los polisacáridos superficiales se extraen y purifican siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.1.1. El residuo de células se extrae con una mezcla de fenol-agua (1:1), obteniéndose dos fracciones: una fase acuosa (AqSV) y una fase fenólica (FenSV); los extractos AqSV y FenSV se purifican mediante cromatografía de intercambio aniónico y tratamiento con enzimas.

El crudo obtenido a partir de la fase acuosa (AqSV) se cromatografía a través de una columna rellena de Sephacryl S-500 (60 × 2,6 cm) y NaCl 0,2 M/NaN₃ al 0,02% como eluyente, utilizando un detector de índice de refracción y el revelado con sulfúrico-orcinol. Se obtienen tres fracciones, dos de las cuales contenían carbohidratos atendiendo al revelado con sulfúrico orcinol. En la Figura 4.1-I se muestra el cromatograma obtenido.

Fracción AqSV-A: Su volumen de elución se incluye dentro del rango de fraccionamiento de la columna.

Fracción AqSV-B: Su volumen de elución es próximo al volumen total de la columna.

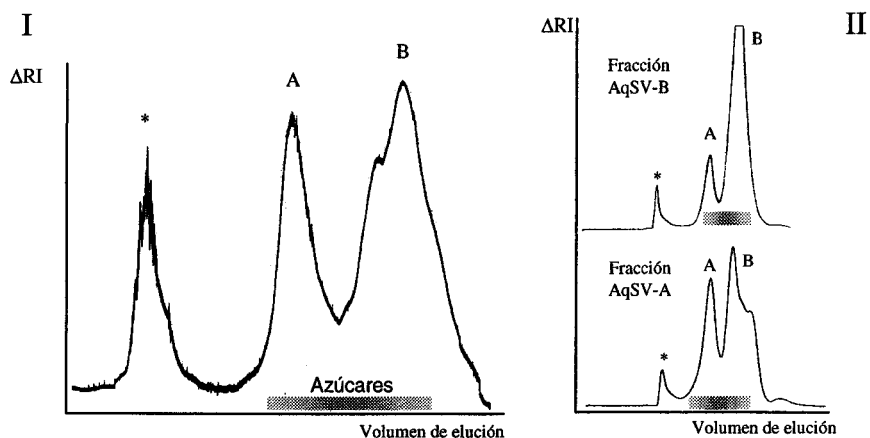


Figura 4.1. Cromatogramas de la elución del crudo de la fase acuosa AqSV (I) y de las fracciones AqSV-A y AqSV-B a través de Sephacryl S-500 (II). Se indica el rango de muestra en el que se detectaron azúcares. Los picos del cromatograma marcados con asteriscos no contenían azúcares.

Estas dos fracciones se cromatografiaron de nuevo usando Sephacryl S-500 (**¡Error!No se encuentra el origen de la referencia.**) para buscar una mejor separación. Atendiendo a los cromatogramas obtenidos, y que se muestran en la Figura 4.1-II, la fracción AqSV-B se encuentra en mayor proporción que la fracción AqSV-A.

En la fase fenólica **FenSV** la cantidad de muestra que contiene azúcares es muy pequeña proporción en comparación con la cantidad de muestra obtenida. Por otra parte, el resultado del análisis de azúcares es muy similar al de la fracción AqSV-A de la fase acuosa (como se muestra más adelante en el apartado 4.1.4), por lo que probablemente esté formada por trazas de lipopolisacárido. El estudio se centró en la fase acuosa.

4.1.2. Electroforesis de las fracciones AqSV-A y AqSV-B.

La naturaleza de las fracciones aisladas AqSV-A y AqSV-B, así como la posible alteración en el LPS del mutante SVQ293, se examinan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (apartado 2.2).

En general, el análisis por SDS-PAGE permite separar los LPS de muchas especies de rizobia (incluyendo las de *Sinorhizobium*) en dos tipos, dependiendo de la movilidad: las bandas de LPS I, que presentan una movilidad mayor y que comprende los oligosacáridos del core y el lípido A, y las bandas de LPS II, constituido por el core, el lípido A y el O-antígeno en distintos grados de polimerización^{103,104} y que suele presentar un perfil de bandas escalonadas.

Los perfiles de LPS de los extractos de células de HH103 y SVQ293 muestran una diferencia de movilidad entre las distintas regiones, por lo que, efectivamente, el LPS se ha visto afectado. Por su parte, los perfiles correspondientes a las dos fracciones aisladas AqSV-A y AqSV-B muestran que la fracción AqSV-A da lugar a un perfil de bandas muy similar al perfil obtenido a partir del extracto de células de *S. fredii* SVQ293, aunque con la región de LPS I más intensa probablemente debido a una degradación parcial sufrida durante el proceso de extracción; sin embargo, la fracción AqSV-B no presenta manchas en la zona del LPS II y la del LPS I es poco intensa en comparación con el carril anterior. La fracción AqSV-B, aparentemente, está constituida por un polisacárido de tipo capsular, distinto del LPS; la mancha que aparece en la zona inferior del gel correspondería a un resto del LPS degradado de la fracción AqSV-A. Dicho polisacárido capsular se denomina CPS-SVQ en esta tesis.

Los patrones de bandas obtenidos se muestran en la Figura 4.2. Se incluye también el patrón de bandas obtenido a partir del extracto de células de *S. fredii* SVQ293 obtenido al realizar la electroforesis en ausencia de SDS (apartado 2.2). Este nuevo patrón de bandas corresponde al polisacárido capsular de *S. fredii* SVQ293.

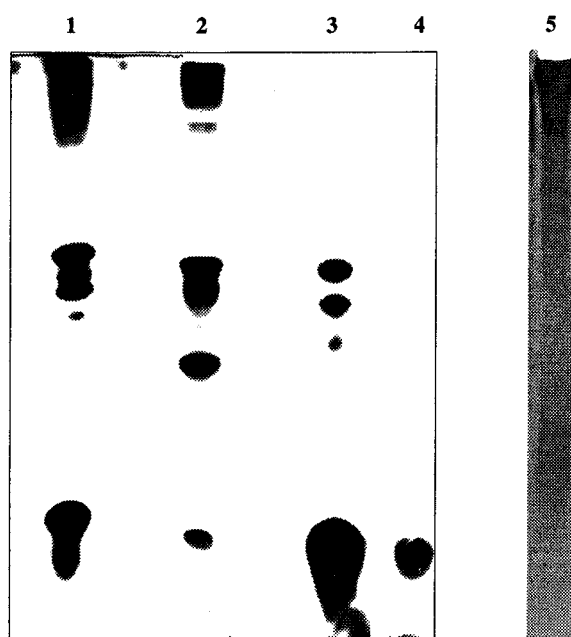


Figura 4.2. SDS-PAGE, revelado sin usar azul alciano, de los extractos de células de HH103 (carril 1), SVQ293 (carril 2) y de las fracciones AqSV-A y AqSV-B (carriles 3 y 4, respectivamente). En el carril 5 se muestra el PAGE sin SDS y revelado usando azul alciano, del extracto de células de SVQ293, donde se observa la presencia del CPS.

4.1.3. Determinación del peso molecular.

El peso molecular de las fracciones AqSV-A y AqSV-B se determina por cromatografía de filtración sobre gel usando una columna μ Bondagel E-Linear conectada a un sistema de HPLC (apartado 2.3.6.3). El seguimiento de la columna se realiza mediante un sistema de detección por índice de refracción.

En el cromatograma de la fracción AqSV-A se observa un pico mayoritario a un volumen de elución de 3,41 min que corresponde a un peso molecular medio de aproximadamente de $2,5 \cdot 10^6$ Da. En el correspondiente cromatograma de la fracción AqSV-B se observa un pico mayoritario cuyo volumen de elución

($V_e = 4,29$ min) permite estimar un peso molecular medio de aproximadamente 80.000 Da., seguido de otros más pequeños a 20.000 y 4.000 Da., que podrían proceder de una degradación parcial del primero.

4.1.4. Análisis de azúcares de las fracciones AqSV-A y AqSV-B.

El análisis de los monosacáridos que componen los polisacáridos encontrados en cada una de las fracciones (AqSV-A y -B) se realiza como se describe en el apartado 2.3.1. La fracción AqSV-A está constituida por manosa, ácido galacturónico, galactosa, glucosa y Kdo. Su composición es muy similar al del LPS de la cepa nativa HH103 (apartado 3.1.5); este hecho, junto con el perfil de bandas en el análisis por electroforesis, permite identificar en esta fracción el LPS del mutante SVQ293.

La fracción AqSV-B está constituida por ribosa, galactosa, Kdn (el derivado desaminado del ácido neuramínico) y un derivado de este último, en una proporción 1,0:1,8:0,2:1,1. El cromatograma correspondiente al análisis de azúcares se muestra en la Figura 4.3.

Asimismo, los espectros de masas de los trimetilsilil derivados de los metil glicósidos de Kdn y su derivado se muestran en la Figura 4.4.

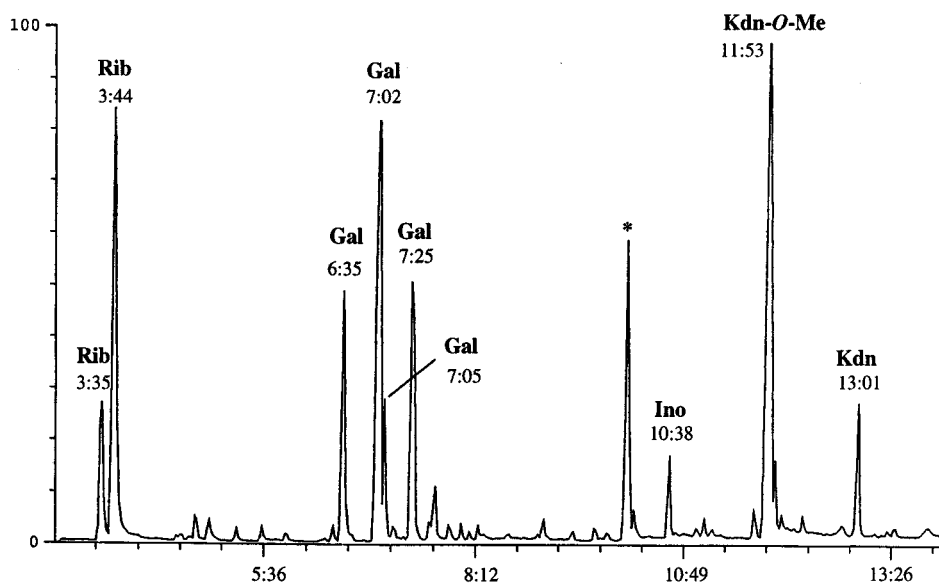


Figura 4.3. CGL-EM de los trimetilsilil derivados de los metil glicósidos obtenidos a partir del polisacárido capsular constituyente de la fracción AqSV-B. La señal marcada con un asterisco no corresponde a azúcares.

Las estructuras de los diferentes fragmentos se asignaron de acuerdo con el esquema de fragmentación propuesto por Mononen.¹⁰⁵ Las masas de los fragmentos procedentes de roturas análogas se diferencian en 58 unidades de masa (m/z 597 y 539, 566 y 508, 553 y 495, 451 y 393, 419 y 361, 361 y 303).

Esta diferencia se puede explicar con la presencia de un grupo *O*-metilo en el trimetilsilil éter del derivado de Kdn en lugar del correspondiente grupo trimetilsililo. Es más, este grupo metilo debe estar situado en las posiciones 4 ó 5 ya que los fragmentos a m/z 103, 205 y 307, que proceden de la rotura de los enlaces C-9-C-8, C-8-C-7 y C-7-C-6, se encuentran en ambos espectros de masas.

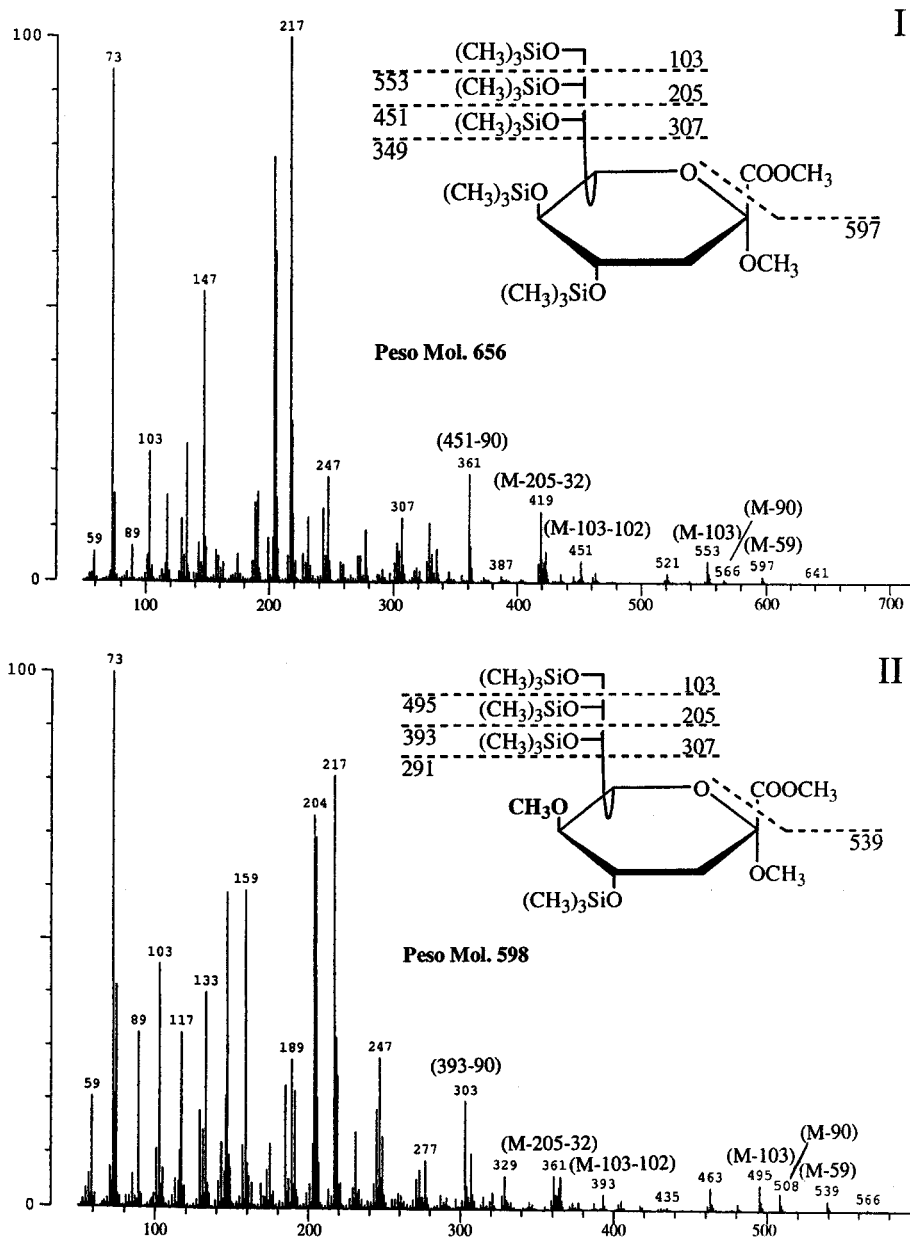


Figura 4.4. Espectros de masas de los trimetilsilil derivados de los metil glicósidos de Kdn (I) y 5-O-metil-Kdn (II), junto con los esquemas de fragmentación correspondientes.

4.1.5. Análisis de la configuración absoluta de los azúcares de CPS-SVQ.

La determinación de la configuración absoluta de los monosacáridos procedentes del polisacárido capsular CPS-SVQ se realiza a través de la formación de los 2,3,4,6-tetra-*O*-trimetilsilil-(+)-2-butilglicósidos, como se describe en el apartado 2.3.2

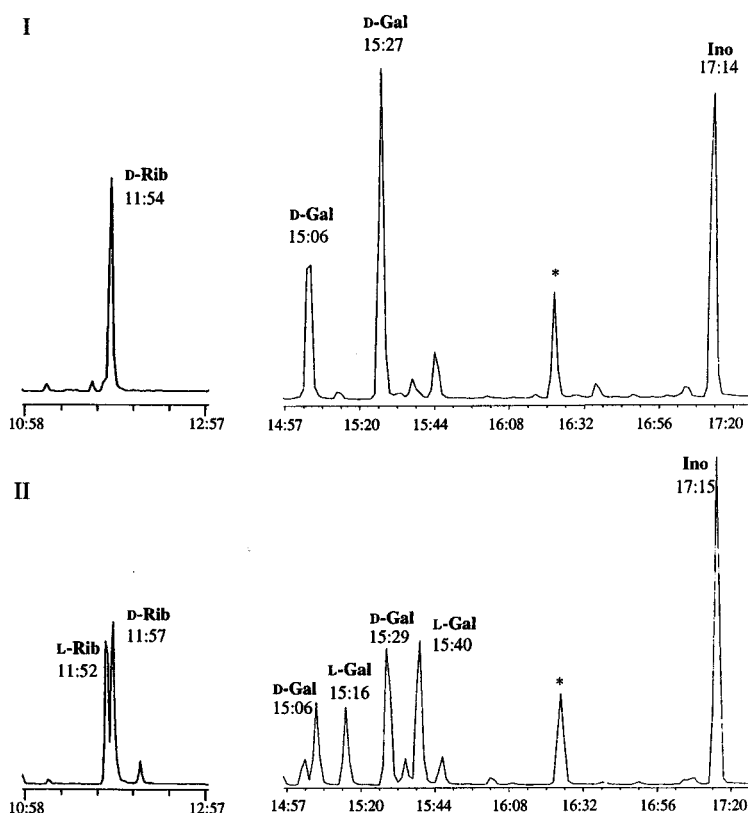


Figura 4.5. Cromatogramas de CGL-EM de los 2,3,4,6-tetra-*O*-trimetilsilil-2-butil glicósidos del CPS de *S. fredii* SVQ293 (CPS-SVQ), obtenidos al tratar la muestra con (+)-2-butanol (I) y (±)-2-butanol (II).

En la Figura 4.5 se muestran los cromatogramas correspondientes a la formación de los trimetilsilil derivados de los (+)-2-butilglicósidos (I) y (±)-2-butilglicósidos (II). En el primer caso se obtienen los dos diastereoisómeros, mientras que en el segundo sólo uno de ellos.

La comparación de los tiempos de retención de los derivados obtenidos a partir de patrones permite determinar la configuración absoluta de los monosacáridos que componen el polisacárido CPS-SVQ (Tabla 2.2).

Se obtiene que tanto la ribosa como la galactosa pertenecen a la serie D, que es la que se encuentra mayoritariamente en la naturaleza. La configuración absoluta del Kdn y su derivado metilado (*O*-Me-Kdn) no se pudo establecer ya que no se obtuvieron los correspondientes 2-butir glicósidos. La configuración relativa de estos dos últimos azúcares se determina a través de los valores de las constantes de acoplamiento escalar obtenidas en el espectro de ^1H -RMN del trisacárido de repetición (apartado 4.1.10).

4.1.6. Análisis por metilación del polisacárido CPS-SVQ.

El polisacárido se somete a un análisis por metilación de acuerdo con el método descrito en el apartado 2.3.3. La muestra se metila, se hidroliza, se reduce con NaBD_4 (en lugar de NaBH_4 para marcar el carbono del grupo alcohol primario que procede del grupo carbonilo) y finalmente se acetila. El análisis por CGL-EM de los acetatos de alditol parcialmente metilados resultantes permite identificar los siguientes compuestos:

- 1,2,4-tri-*O*-acetil-1-deutero-3,5-di-*O*-metilribitol, procedente de un residuo de ribofuranosa sustituido en la posición 2, cuyo espectro se muestran en la Figura 4.6.
- 1,2,5-di-*O*-acetil-1-deutero-3,4,6-tri-*O*-metilgalactitol, procedente de un residuo de galactopiranososa sustituido también en la posición 2, cuyo espectro se muestra en la Figura 4.7.
- 2,6,9-tri-*O*-acetil-3-desoxi-2-deutero-5,6,8-tri-*O*-metil-glicero-galacto- γ -nononolactona, procedente de la γ -lactona del *O*-Me-Kdn en forma piranososa. El espectro de masas correspondiente se muestra en la Figura 4.8.

La aparición de esta lactona puede deberse a que en los extremos reductores del polisacárido, o de oligosacáridos si éste ha sufrido una degradación parcial, el azúcar terminal debe ser aquel cuyo enlace glicosídico sea más débil, en este caso el Kdn o su derivado metilado; al ser un azúcar terminal, es mucho más flexible y

es posible que en el medio básico de la metilación (o bien espontáneamente) se forme la lactona interna entre el grupo COOH y el OH en C-4. En las etapas posteriores de hidrólisis, reducción y acetilación, tanto aquellos derivados del Kdn que no hayan formado la lactona, como aquellos en los que la lactona se haya hidrolizado, el grupo carboxilo sigue como COOH y, por tanto al ser compuestos poco volátiles, se degradarían y no pueden detectarse en el análisis por CGL-EM. Consecuentemente, sólo aquellos que hayan formado la lactona pueden detectarse en el CGL-EM.

Por otra parte, la formación de la γ -lactona indica que, de las dos posiciones posibles (O-4 y O-5) para el grupo metilo, deducido de la comparación de los espectros de masas del Kdn y su *O*-metil derivado (apartado 4.1.4), es la posición 5 la que se encuentra metilada; de esta forma, queda impedida la formación de la δ -lactona, probablemente más estable.

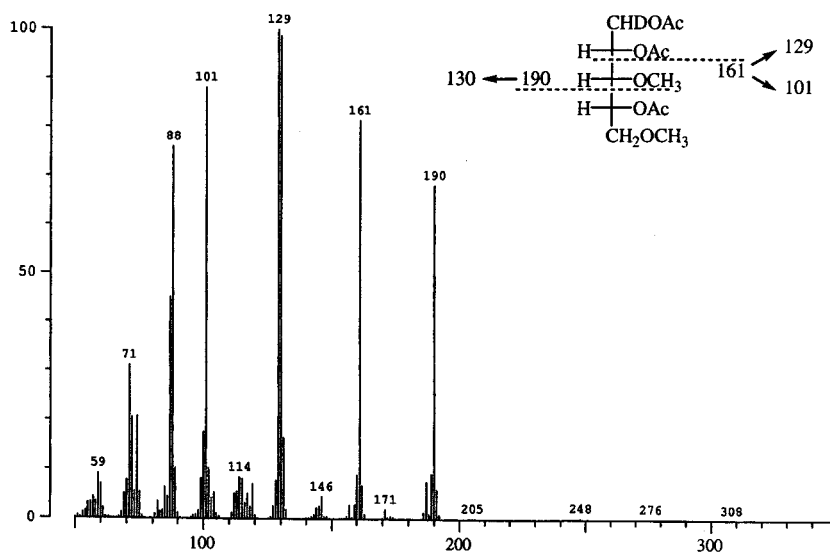


Figura 4.6. Espectro de masas y esquema de fragmentación del 1,2,4-tri-*O*-acetil-1-deuterio-3,5-di-*O*-metilribitol procedente del estudio por metilación del polisacárido CPS-SVQ.

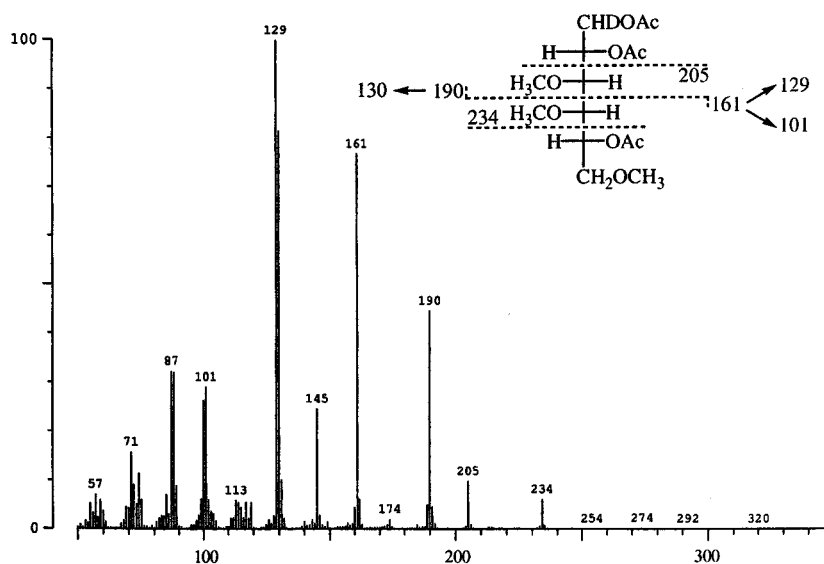


Figura 4.7. Espectro de masas y esquema de fragmentación del 1,2,5-di-*O*-acetil-1-deuterio-3,4,6-tri-*O*-metilgalactitol procedente del análisis por metilación del polisacárido CPS-SVQ.

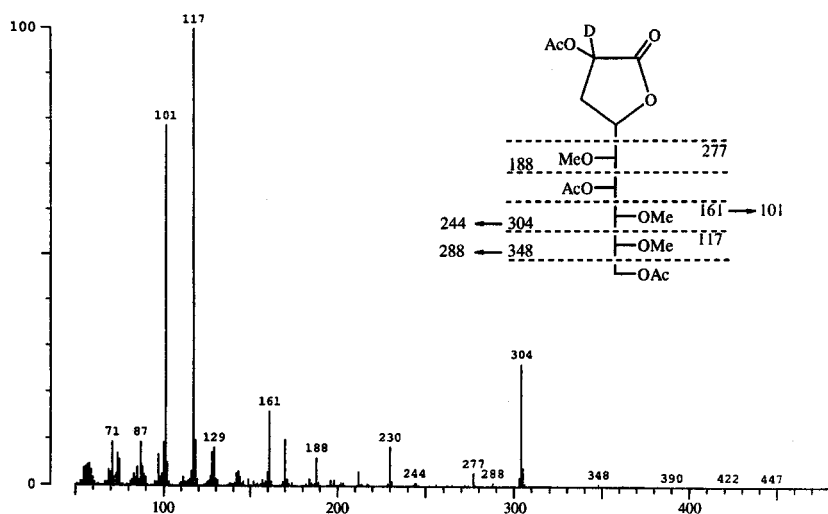


Figura 4.8. Espectro de masas y esquema de fragmentación de la 2,6,9-tri-*O*-acetil-3-desoxi-2-deutero-5,6,8-tri-*O*-metil-glicero-galacto- γ -nonono-lactona procedente del análisis por metilación del polisacárido CPS-SVQ.

4.1.7. Estudio por RMN del polisacárido CPS-SVQ.

Las señales de ^1H y ^{13}C del polisacárido CPS-SVQ se asignan mediante experimentos ^1H -RMN (Figura 4.9) 1D-TOCSY, COSY (Figura 4.11) y HSQC editado (Figura 4.10), realizados como se describe en el apartado 2.3.7. Los desplazamientos químicos correspondientes se recogen en la Tabla 4.1. De los datos obtenidos se puede deducir que:

El residuo de ribofuranosa (unidad **a**), presenta un valor de δ_{C} del C-1 a 105,0 ppm, que, junto con el bajo valor de la constante de acoplamiento $J_{1,2}$ muy próximo a cero ($\delta_{\text{H}} = 5,20$ ppm en la Figura 4.9), sugiere que se trata del anómero β . Además, el desplazamiento a campo bajo de la señal de C-2 ($\delta_{\text{C}} = 79,0$ ppm) indica que esta posición está sustituida.

El residuo de galactopiranososa (unidad **b**), presenta valores de δ_{H} y δ_{C} (5,06 y 95,6 ppm, respectivamente), que, junto con el de $J_{1,2}$ (aproximadamente cero en la Figura 4.9), permiten identificar la anomería de este residuo como α . De nuevo, la señal de C-2 ($\delta_{\text{C}} = 71,0$ ppm) está desplazada a campo bajo respecto al valor descrito para un α -D-galactopiranosido sin sustituir¹⁰⁶ ($\delta_{\text{C}} = 69,3$ ppm), mientras que las señales de los carbonos adyacentes al enlace glicosídico sufren un desplazamiento a campo alto de -3,6 (C-1) y -2,5 (C-3) respecto a los descritos. De lo anterior se deduce que esta unidad se encuentra sustituida en la posición 2.

El residuo de 5-*O*-Me-Kdnp (unidad **c**) presenta un valor de $\delta_{\text{H}} = 2,74$ ppm para la señal asignada a H-3 $_{eq}$, lo que es característico de una disposición axial del grupo COOH; se trata, por tanto, del anómero α .¹⁰⁷ Además, los desplazamientos hacia campo bajo de las señales de C-5 y C-9 indican que estas posiciones están sustituidas.¹⁰⁷ Estos resultados confirman los resultados del análisis por metilación en el apartado anterior.

La naturaleza metilénica de C-5 (**a**), C-6 (**b**), C-3 (**c**) y C-9 (**c**) es demostrada inequívocamente por el signo negativo de las señales de cruce en el espectro de HSQC editado (líneas de puntos en la Figura 4.10).

Por último, se puede distinguir un singulete intenso a $\delta_{\text{H}} 3,57$ ppm y $\delta_{\text{C}} 60,5$ ppm. Estos valores de desplazamiento químico son característicos de un grupo metoxilo.

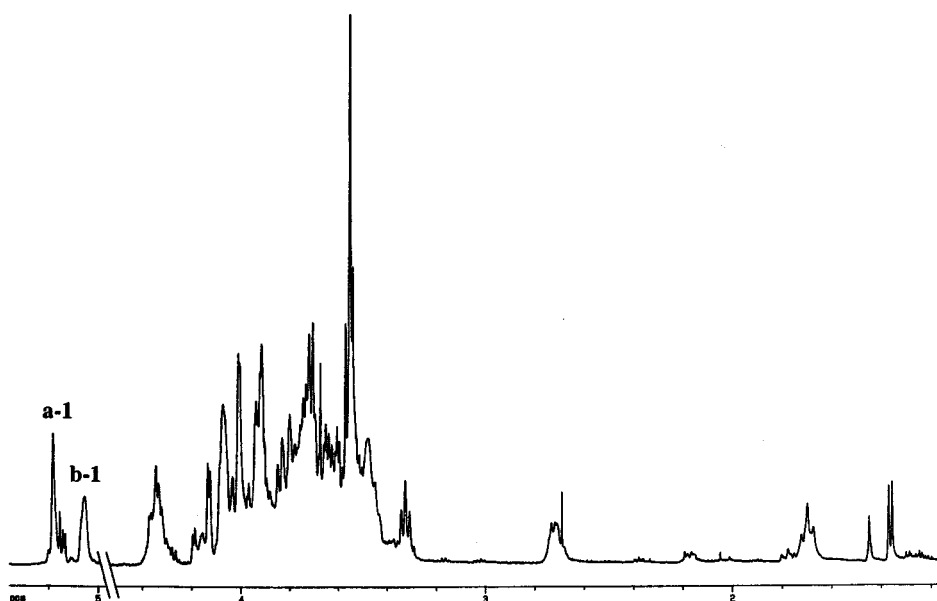


Figura 4.9. Espectro de ^1H -RMN, adquirido a 500 MHz, del polisacárido capsular CPS-SVQ. Se indican las señales de los protones anoméricos de los residuos de ribosa (**a-1**) y galactosa (**b-1**).

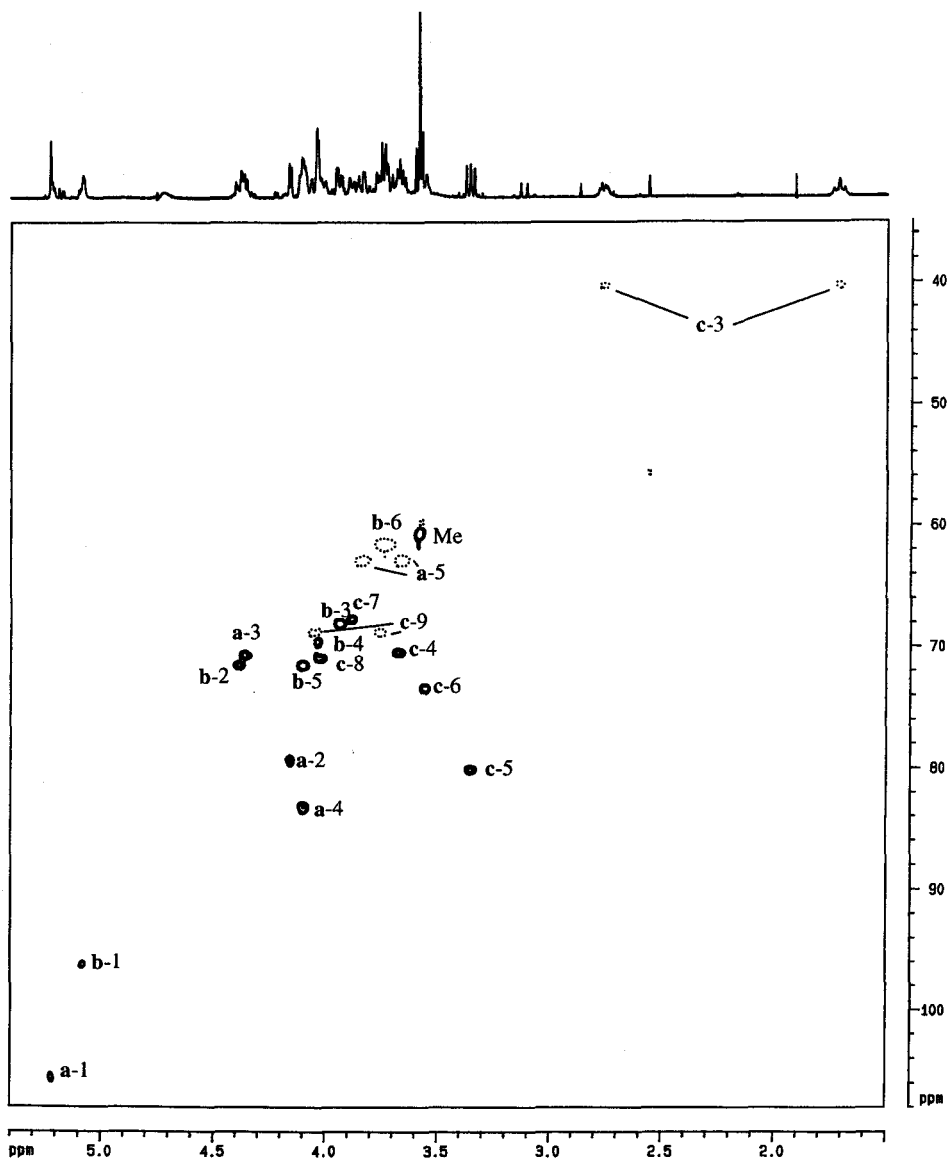


Figura 4.10. HSQC con multiplicidad editada del polisacárido capsular CPS-SVQ registrado a 500 MHz. Los picos en línea punteada corresponden a carbonos metilénicos.

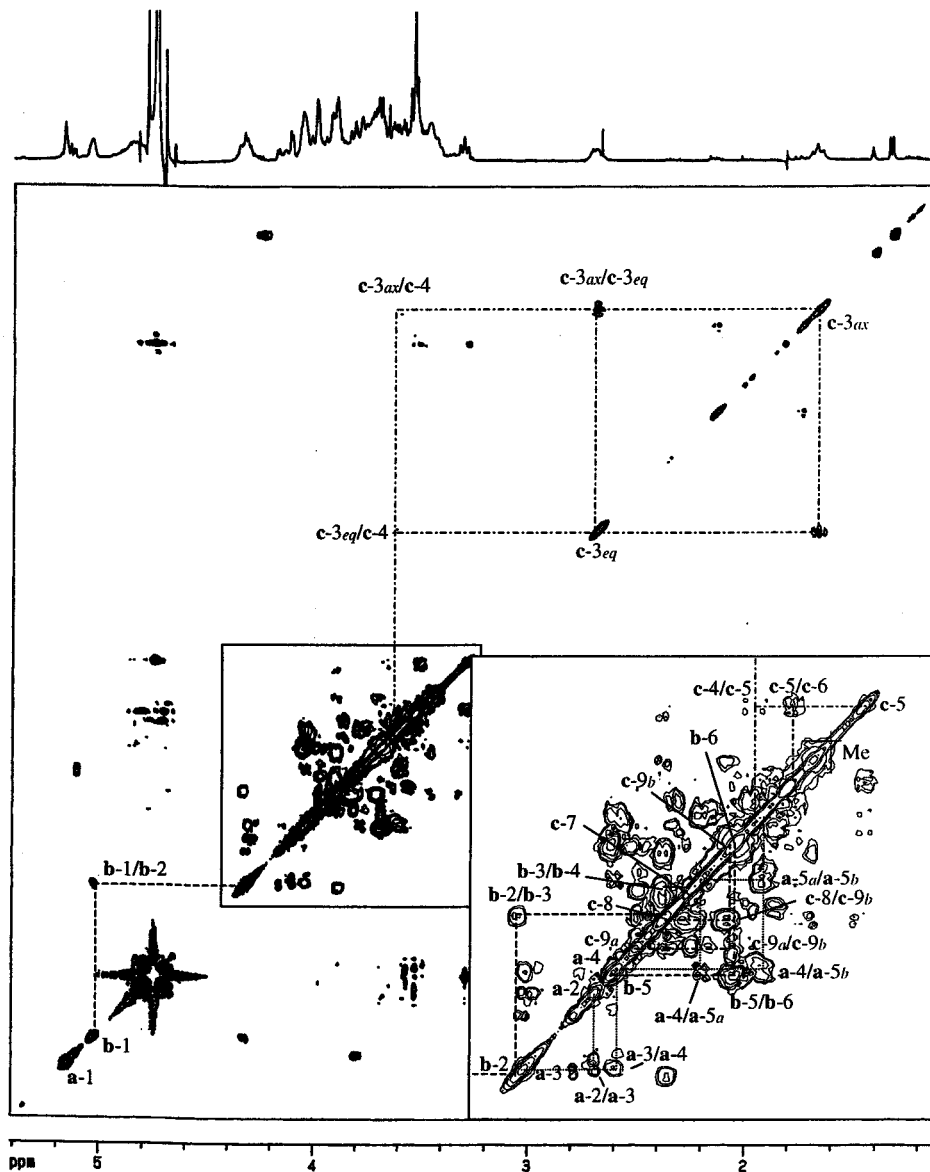


Figura 4.11. Espectro COSY 45, registrado a 500 MHz, del polisacárido CPS-SVQ.

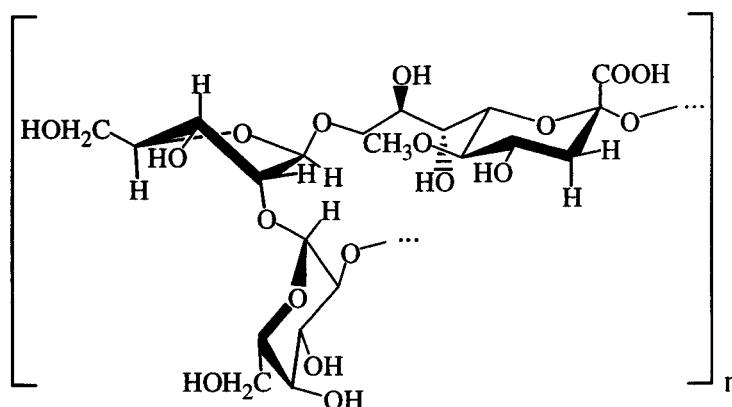
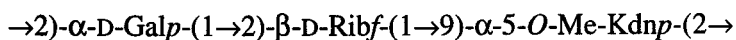
		Posición									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Me
→2)-β-D-Ribf-(1→ (a)	H	5,20	4,13	4,36	4,08	3,82(a) 3,66(b)					
	C	105,0	79,0	70,5*	83,0	62,7					
→2)-α-D-Galp-(1→ (b)	H	5,06	4,36	3,93	4,02	4,08	3,73(a) 3,73(b)				
	C	95,6	71,0 [§]	67,7	69,3	71,1 [§]	61,3				
→9)-α-D-5-O-Me-Kdnp-(2→ (c)	H	-	-	1,70(ax) 2,74(eq)	3,66	3,34	3,57	3,85	4,02	4,04(a) 3,74(b)	3,57
	C	172,9	99,2	40,2	70,2*	79,8	73,2	67,3	70,7	68,7	60,5

*y §: Las asignaciones son intercambiables.

Tabla 4.1. Desplazamientos químicos de ¹H y ¹³C (en ppm) para el polisacárido CPS-SQV.

La determinación de la secuencia de las tres unidades identificadas se basa en la aparición de efecto NOE entre los protones glicosídicos y trans-glicosídicos de las unidades contiguas. Se registró el espectro 2D-NOESY del polisacárido (Figura 4.12) tal como se describe en el apartado 2.3.7.9. Las conectividades NOE observadas se recogen en la Tabla 4.2. Los NOE inter-residuo entre H-1 (a) y H-9a y H-9b (c), y entre H-1 (b) y H-1 y H-2 (a) permitieron determinar que la secuencia de los residuos en el polisacárido era **b**→**a**→**c**. Finalmente, el NOE observado entre H-5 (c) y el grupo MeO sugiere que este último se encuentra en la posición 5 del residuo c.

Los resultados anteriores, junto con los resultados del análisis de azúcares (apartado 4.1.4), configuración absoluta (apartado 4.1.5) y metilación (apartado 4.1.6), permiten proponer la siguiente estructura para la unidad de repetición del polisacárido capsular CPS-SVQ, aislado de *S. fredii* SVQ293:



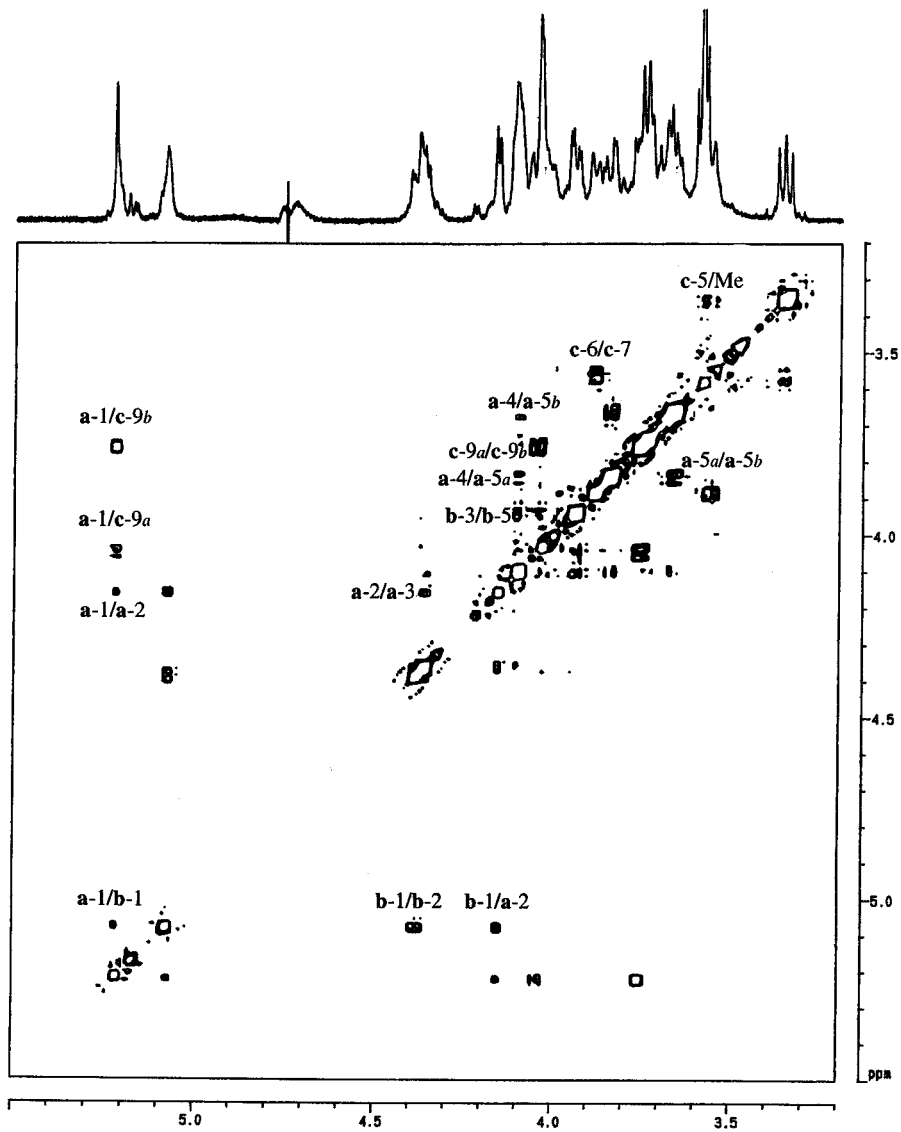


Figura 4.12. Espectro NOESY a 500 MHz del polisacárido capsular CPS-SVQ.

Residuo	Protón	Correlación con
→2)-β-D-Ribf-(1→ (a)	H-1	H-2 (a), <u>H-1 (b)</u> , <u>H-9a</u> y <u>H-9b (c)</u>
	H-2	H-3 (a), <u>H-1 (b)</u>
	H-4	H-5a y H-5b (a)
	H-5a	H-5b (a)
→2)-α-D-Galp-(1→ (b)	H-1	H-2 (b), <u>H-1</u> y <u>H-2 (a)</u>
	H-3	H-4 (b), H-5 (b)
	H-5	H-6a,b (b)
→9)-α-5-O-Me-Kdnp-(2→ (c)	H-3ax	H-3eq y H-5 (c)
	H-3eq	H-4 (c)
	H-5	Me
	H-7	H-6 (c) o Me
	H-9a	H-9b (c), <u>H-1 (a)</u>
	H-9b	<u>H-1 (a)</u>

Tabla 4.2. Correlaciones NOE observadas en el polisacárido CPS-SVQ. Los NOE entre residuos se muestran subrayados.

4.1.8. Estudio del oligosacárido de repetición.

El estudio del oligosacárido de repetición del polisacárido CPS-SVQ obtenido a partir de la hidrólisis parcial (autohidrólisis) de éste permite confirmar los resultados anteriores.

El polisacárido se disuelve en agua y se calienta a 60 °C durante seis horas. El hidrolizado se cromatografía usando una columna rellena de Sephadex G-50 y se aísla un oligosacárido. El análisis por CGL-EM de los trimetilsilil derivados de los metil glicósidos de los monosacáridos que componen dicho oligosacárido

permite identificar los mismos azúcares que constituyen el polisacárido del que procede: Rib, Gal, Kdn y 5-*O*-Me-Kdn en aproximadamente la misma proporción.

4.1.9. Análisis por metilación del oligosacárido de repetición.

El oligosacárido aislado se somete a una reducción del grupo carbonilo en C-2 con NaBD₄ y posteriormente es trideuterometilado con CD₃I para localizar la posición del grupo Me en el *O*-Me-Kdn según se describe en el apartado 2.3.4.1.

En el espectro de FAB registrado en modo positivo del derivado del oligosacárido obtenido se observa el pico pseudomolecular [M+Na]⁺ a *m/z* 806; este peso molecular se corresponde con el correspondiente derivado de un trisacárido formado por ribosa, galactosa y 5-*O*-Me-Kdn. El espectro de masas IE-EM y el esquema de fragmentación del oligosacárido alditol perdeuterometilado se muestra en la Figura 4.13. Los fragmentos a *m/z* 231 y 397 muestran que la secuencia de monosacáridos es Gal→Rib→*O*-Me-Kdn, confirmando los datos del análisis por RMN del polisacárido CPS-SVQ (apartado 4.1.7). Los fragmentos a *m/z* 171 y 215 demuestran que el grupo *O*-metilo se encuentra en la posición 5 del ácido. Asimismo, el fragmento a *m/z* 474 muestra que la unión de la unidad de Ribf→5-*O*-Me-Kdn es (1→9).

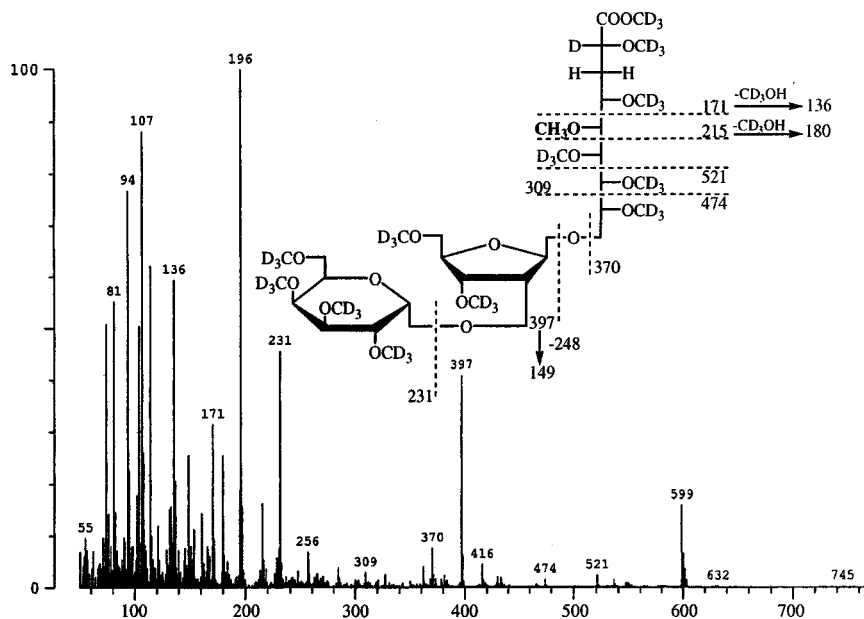
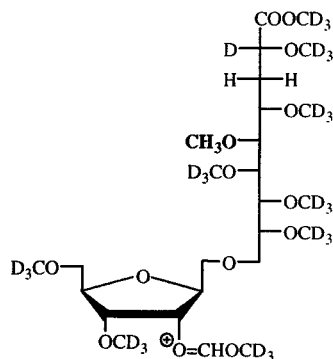


Figura 4.13. Espectro de masas (IE-EM) y esquema de fragmentación del trisacárido-alditol pertrideuterometilado procedente del trisacárido de repetición.

Finalmente, el ion de m/z 599 procede de una rotura de tipo de tipo ab ald J_1 , formándose el siguiente fragmento:



Siguiendo el análisis por metilación (apartado 2.3.3), el trisacárido-alditol anterior se hidroliza, se reduce con NaBD_4 y se acetila. El análisis por CGL-EM de los acetatos de alditol parcialmente metilados resultantes muestra la presencia de:

- 1,5-di-*O*-acetil-1-deutero-2,3,4,6-tetra-*O*-trideuterometilgalactitol, procedente del residuo de galactopiranososa en el extremo no reductor, cuyo espectro de masas se muestra en la Figura 4.14.
- 1,2,4-tri-*O*-acetil-1-deutero-3,5-di-*O*-trideuterometilribitol, procedente del residuo de ribofuranosa unida en la posición 2, cuyo espectro de masas se muestra en la Figura 4.15.
- 1,9-di-*O*-acetil-3-desoxi-1,1,2-trideutero-2,4,6,7,8-penta-*O*-trideuterometil-5-*O*-metil-glicero-galacto-nonitol, derivado del residuo 5-*O*-Me-Kdn en forma piranososa. El espectro de masas de este último, y su esquema de fragmentación se muestran en la Figura 4.16. La presencia de un grupo acetilo en O-9 confirma que el enlace ribosa-5-*O*-Me-Kdn es (1→9).

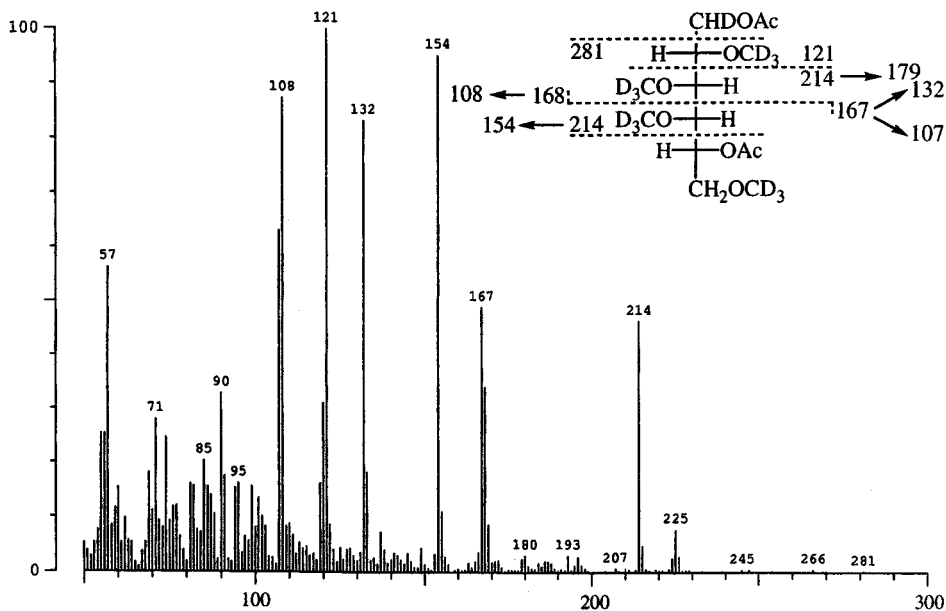


Figura 4.14. Espectro de masas y esquema de fragmentación del 1,5-di-*O*-acetil-1-deutero-2,3,4,6-tetra-*O*-trideuterometilgalactitol procedente del análisis por metilación del trisacárido de repetición del polisacárido CPS-SVQ.

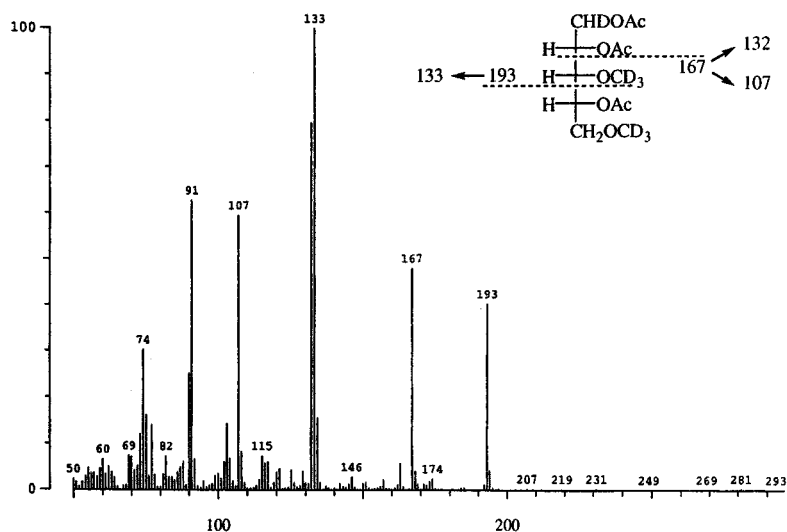


Figura 4.15. Espectro de masas y esquema de fragmentación del 1,2,4-tri-*O*-acetil-1-deuterio-3,5-di-*O*-trideuterometilribitol procedente del análisis por metilación del trisacárido de repetición del polisacárido CPS-SVQ.

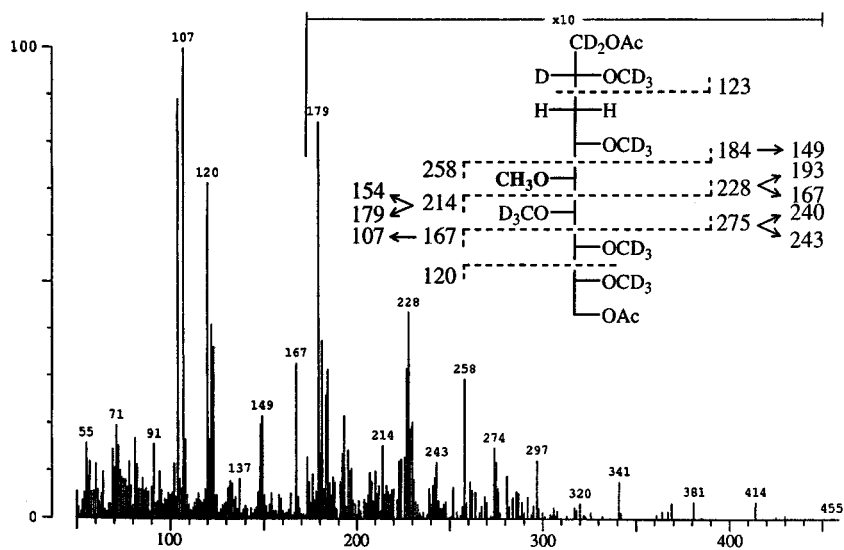


Figura 4.16. Espectro de masas y esquema de fragmentación del 1,9-di-*O*-acetil-3-desoxi-1,1,2-trideutero-2,4,6,7,8-penta-*O*-trideuterometil-5-*O*-metil-glicero-galacto-nonitol procedente del análisis por metilación del trisacárido de repetición del polisacárido CPS-SVQ.

4.1.10. Estudio por RMN del trisacárido de repetición.

Las señales de ^1H y ^{13}C del trisacárido de repetición se asignaron a partir de los experimentos ^1H -RMN (Figura 4.17), DBF-COSY (Figura 4.18), 1D-TOCSY (Figura 4.19) y HSQC. Las asignaciones y constantes de acoplamiento se recogen en la Tabla 4.3.

En el polisacárido, el valor de $\delta_{\text{C}} = 105,8$ ppm de C-1 del residuo de ribofuranosa sugiere una anomería β . Esta suposición es confirmada por el conjunto de constantes de acoplamiento de dicho residuo ($J_{1,2} = 1,0$ Hz, $J_{2,3} = 4,8$ Hz, $J_{3,4} = 6,9$ Hz) característico de una β -D-ribofuranosa en la conformación $^3\text{T}_2$ como se recoge en la bibliografía.¹⁰⁸ (ver apartado 4.2).

En el caso del residuo de galactopiranososa, se observa un brusco cambio en los desplazamientos químicos de C-2 y H-2 en comparación con los valores encontrados en el polisacárido CPS-SVQ, que aparecen a campo más alto, lo que está de acuerdo con la pérdida de la sustitución en 2. El valor de la constante $J_{1,2} = 3,9$ Hz, así como los desplazamientos químicos $\delta_{\text{H}} = 5,12$ ppm y $\delta_{\text{C}} = 97,7$ ppm, corresponden a una anomería α .

En el residuo de 5-O-Metil-Kdn, las constantes de acoplamiento $J_{3_{ax},4}$, $J_{4,5}$, y $J_{5,6}$ (12,4, 9,5 y 9,9 Hz) dan cuenta de una orientación axial de H-4, H-5 y H-6, indicando una configuración *arabino* en la cadena C-4 al C-6. Por otra parte, el reducido valor de la constante $J_{6,7}$ (2,5 Hz) es característica de una disposición *treo* en los carbonos C-6 y C-7. Finalmente, la constante $J_{7,8}$ (8,9 Hz) es muy próxima a la encontrada para el ácido neuramínico (9,4 Hz) donde estos carbonos presentan una configuración *treo*. Esta similitud en las constantes de acoplamiento se extiende a todas las constantes encontradas en este residuo. Los datos anteriores permiten asignar la configuración del residuo como D-*glicero*-D-*galacto* o su enantiómera, siendo la misma que la del ácido neuramínico del cual se puede considerar derivado. Por último, el valor de δ_{H} H-3_{eq} en el residuo de 5-O-Metil-Kdn es de 2,11 ppm, que es característico de un grupo carboxilo en posición ecuatorial. Se observa, por tanto, un cambio en la disposición espacial del grupo carboxilo de axial (menos estable) en el polímero a una disposición ecuatorial, más estable, que es la que se observa en el Kdn y sus derivados con el hidroxilo anomérico libre.¹⁰⁹ Esta orientación corresponde a una anomería β .

		Posición									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Me
→2)-β-D-Ribf-(1→ (a)	H	5,13	4,16	4,31	4,05	3,78(a) 3,61(b)					
	J	1,0 (1,2)	4,8 (2,3)	6,9 (3,4)	2,8 (4,5a)	6,0 (4,5b)	-12,3 (5a,5b)				
	C	105,8	78,9	70,7	83,4	62,8					
α-D-Galp-(1→ (b)	H	5,12	3,81	3,91	3,95	4,07	3,70(a) 3,69(b)				
	J	3,9 (1,2)	10,3 (2,3)	3,4 (3,4)	1,0 (4,5)	4,8 (5,6b)	7,0 (5,6b)	-10,5 (6a,6b)			
	C	97,7	68,6	69,3	69,6*	71,7	61,7				
→9)-β-D-5-O-Me-Kdnp-(2→ (c)	H	-	-	1,73(ax) 2,11(eq)	3,98	3,30	3,85	3,71	3,82	3,97(a) 3,64(b)	3,54
	J	12,4 (3ax,4)	5,0 (3eq,4)	-12,5 (3ax,3eq)	9,5 (4,5)	9,9 (5,6)	2,5 (6,7)	8,9 (7,8)	2,3 (8,9a)	5,6 (8,9b)	-10,7 (9a,9b)
	C	177,2	96,8	39,8	69,6*	80,9	70,9	68,6	69,7*	70,3	60,7

Tabla 4.3. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C (en ppm) para el trisacárido de repetición procedente del polisacárido capsular CPS-SVQ. (*: Las asignaciones son intercambiables).

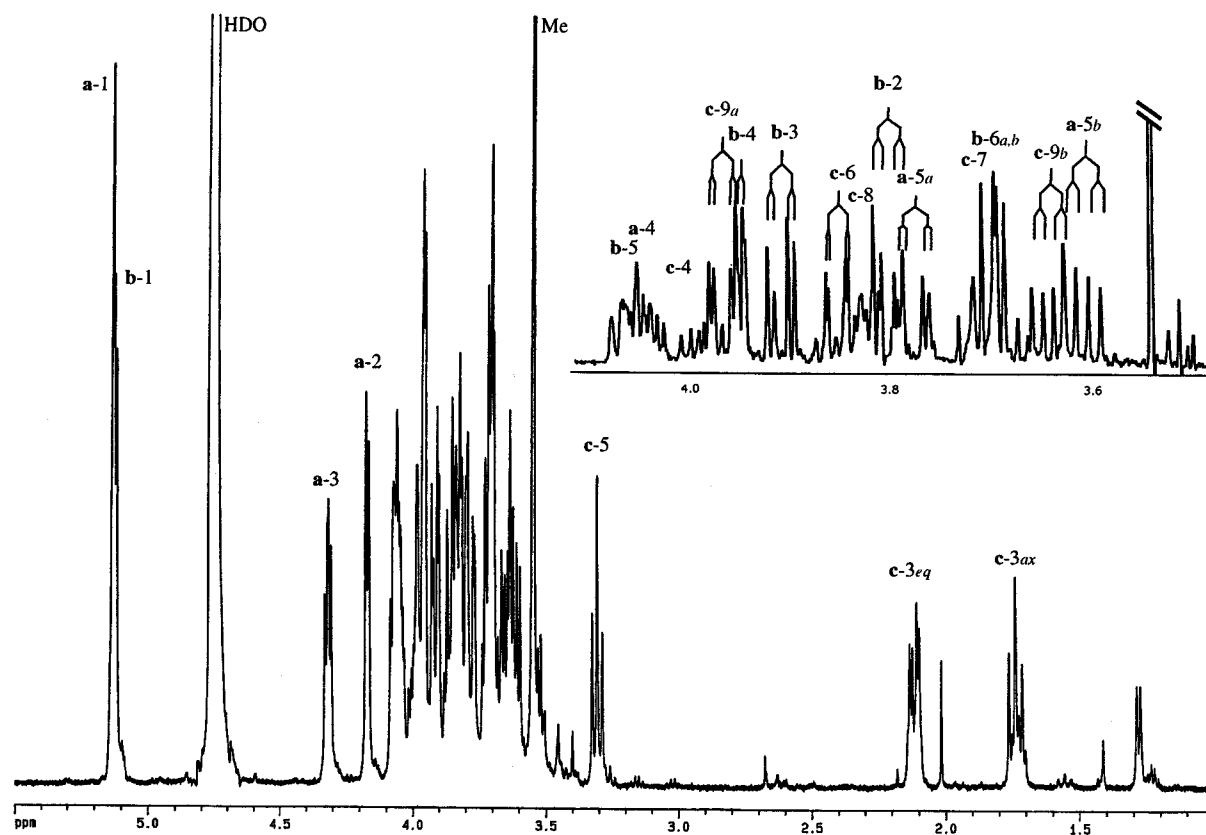


Figura 4.17. Espectro de ^1H RMN registrado a 500 MHz del trisacárido de repetición aislado a partir del polisacárido CPS-SVQ.

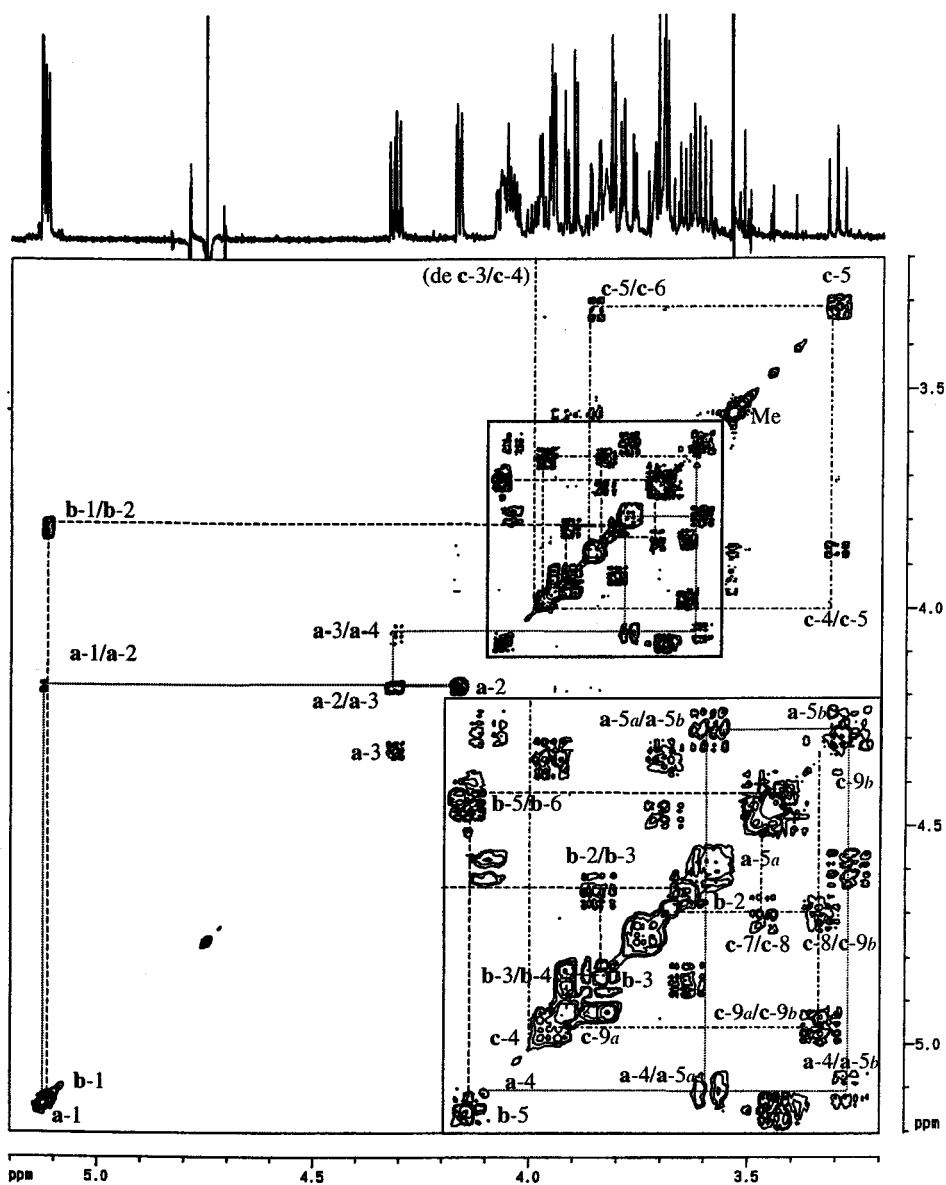


Figura 4.18. Espectro DBF-COSY, registrado a 500 MHz, del trisacárido de repetición aislado a partir del polisacárido capsular CPS-SVQ.

El experimento 1D-TOCSY que se muestra en la Figura 4.19 permite la detección de la señal H-5 de un componente minoritario formado por Kdn sin 5-*O*-metilo; la proporción relativa Kdn:5-*O*-Me-Kdn encontrada es 1:4, próxima a la encontrada en el análisis de azúcares del polisacárido (1:5,5). Este dato confirma los resultados obtenidos en el análisis de azúcares del polisacárido CPS-SVQ y de su trisacárido de repetición en lo referente a la proporción relativa de Kdn y 5-*O*-metil Kdn.

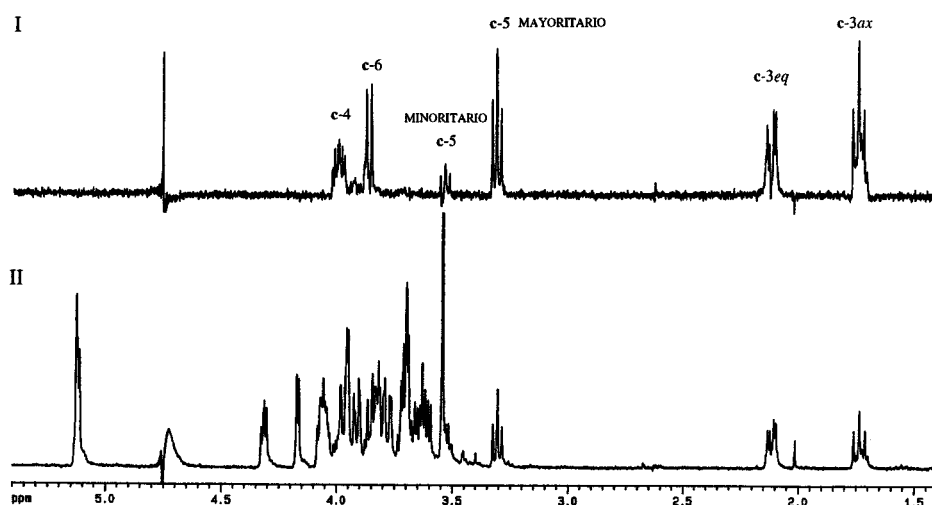
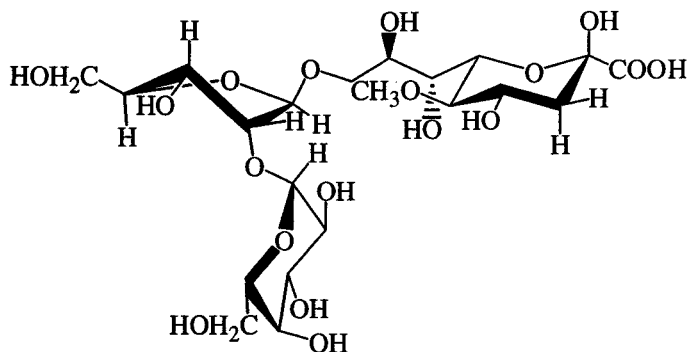
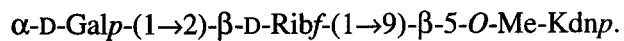


Figura 4.19. Espectro de ^1H -RMN del trisacárido de repetición (II) y subspectro 1D-TOCSY obtenido mediante la excitación selectiva de la señal a δ_{H} 1,73 ppm (I), mostrando las señales desde H-3 hasta H-6 del residuo de Kdn. Esta excitación selectiva permite aislar la señal H-5 del monosacárido Kdn minoritario.

Este espectro 1D-TOCSY se obtiene mediante una excitación selectiva de la señal del Kdn H-3_{ax} (δ_{H} = 1,73 ppm). El valor de δ_{H} a 3,54 ppm del H-5 del Kdn está muy próximo al valor descrito en la bibliografía^{109,110} (3,54) mientras que la señal equivalente en el residuo metilado se localiza a 3,30 ppm.

De los resultados anteriores, se propone que la estructura del trisacárido aislado de la hidrólisis parcial del polisacárido capsular del mutante de *S. fredii* SQV293 es la que se muestra a continuación:



4.2. ESTUDIO CONFORMACIONAL EN DISOLUCIÓN DE LA UNIDAD DE REPETICIÓN DEL CPS DE *S. FREDII* SVQ293.

En este apartado se describe el estudio conformacional de la unidad de repetición trisacáridica del polisacárido capsular CPS-SVQ (Figura 4.20.) mediante cálculos de dinámica molecular y estudios de RMN basados en el efecto NOE.

4.2.1. Análisis conformacional. Estudios de dinámica molecular.

A partir de los datos de constantes de acoplamiento se deduce que los anillos de piranosa de la galactosa y del 5-*O*-metil-Kdn, cuya configuración absoluta se supuso D, pueden describirse como esencialmente monoconformacionales: 4C_1 y 1C_4 , respectivamente. En el caso del residuo de ribofuranosa, las constantes de acoplamiento $J_{1,2}$, $J_{2,3}$ y $J_{3,4}$ indican que éste se encuentra mayoritariamente en una única conformación entre 3E y 3T_2 , similar a la forma C3'-endo encontrada en las estructuras del ARN.

Las constantes de acoplamiento en las cadenas laterales indican que se encuentran en equilibrio en los tres residuos.¹¹¹

Para los cálculos de dinámica molecular se definieron los ángulos diedros de los enlaces glicosídicos, tal como se muestra en la Figura 4.20.

Φ_{GR} (Φ del enlace galactosa – ribosa): H-1(Gal)–C-1(Gal)–O–C-2(Rib)

Ψ_{GR} (Ψ del enlace galactosa – ribosa): C-1(Gal)–O–C-2(Rib)–H-2(Rib)

Φ_{RK} (Φ del enlace ribosa – Kdn): H-1(Rib)–C-1(Rib)–O–C-9(Kdn)

Ψ_{RK} (Ψ del enlace ribosa – Kdn): C-1(Rib)–O–C-9(Kdn)–C-8(Kdn)

Igualmente, se definieron los ángulos Ω_R y Ω_K para describir la orientación de los grupos hidroximetilo en los residuos de ribosa y Kdn:

Ω_R (Ω de la ribosa): O-5–C-5–C-6–O-6

Ω_K (Ω del 5-*O*-Me-Kdn): O-9–C-9–C-8–O-8, tal como se muestra en la Figura 4.20-II.

Aunque se considera la orientación *tg* (*trans-gauche*) del hidroximetilo en la unidad de α -galactopiranososa, la orientación de dicho grupo no se estudió ya que, al encontrarse en un extremo de la molécula, su comportamiento es muy similar al de la galactosa libre. En el caso de la β -ribofuranosa se consideraron las tres orientaciones (*gt*, *gg* y *tg*) para el grupo CH₂OH; asimismo, se consideraron los rotámeros *gt*, *gg* y *tg* de la cadena lateral del residuo de Kdn (definido como O-8-C-8-C-9-O-9) (Figura 4.20). La orientación de los hidroxilos secundarios fue considerada *r* (sentido contrario al de las agujas del reloj).

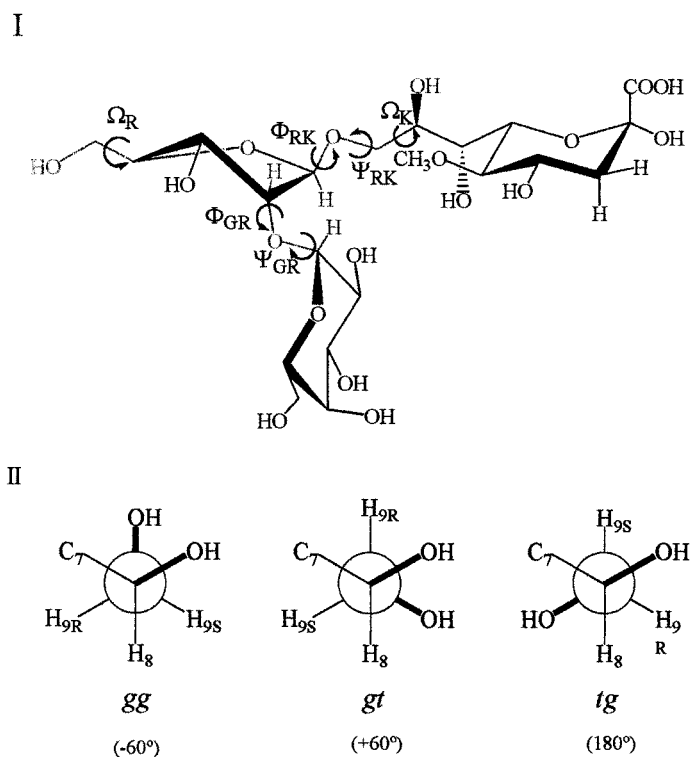


Figura 4.20. (I) Unidad de repetición encontrada en el polisacárido CPS-SVQ y ángulos diedros estudiados en los cálculos de dinámica molecular de la unidad trisacáridica. (II) Definición de los tres rotámeros *gauche-gauche*, *gauche-trans* y *trans-gauche* para el enlace C-8-C-9 del Kdn.

Los cálculos se realizan usando los campos de fuerza TRIPOS, empleando una constante dieléctrica $\epsilon = 80$, y MM3*, empleando el modelo de disolvente GB/SA (*Generalized Born solvent-accessible Surface Area*) para el agua.

En una primera etapa, se calcularon los mapas relajados de energía potencial para cada uno de los disacáridos constituyentes¹¹². Para ello se genera previamente el correspondiente mapa rígido usando un paso de 18° . Posteriormente, cada punto (Φ, Ψ) de este mapa se optimiza usando 200 iteraciones de *steepest descent*, seguidas de 1000 iteraciones con gradientes conjugados. Finalmente, se calcula la distribución de probabilidad para cada punto de los mapas relajados usando la función de Boltzmann a 303 K.

En dichos mapas, mostrados en la Figura 4.21, los enlaces glicosídicos presentan zonas de baja energía bien definidas que ocupan menos del 20 % de la superficie total de energía potencial. Estas zonas muestran valores de Φ característicos del efecto *exo-anomérico*¹¹³, aunque se encuentran algo más extendidas, como se recoge en la Tabla 4.4.

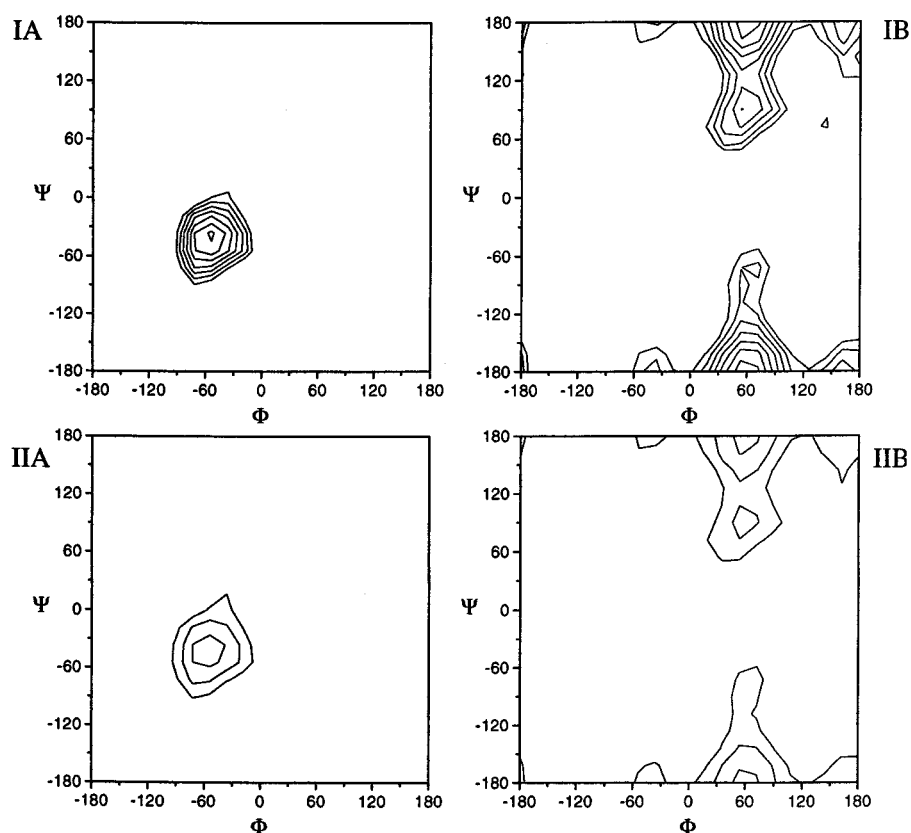


Figura 4.21. Mapas relajados (I) y de distribución de probabilidad (II) obtenidos a partir de la MM del trisacárido para el enlace galactosa-ribose (A) y ribosa-Kdn (B). Los niveles de energía están dados cada $2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ hasta un máximo de $12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ sobre el mínimo global; los niveles de probabilidad están dados a 10, 1 y 0,1 %.

Posteriormente se construyen las nueve estructuras iniciales obtenidas por combinación de los tres conformeros estables de las cadenas laterales de las unidades de ribosa y Kdn. Estas estructuras se someten a una minimización exhaustiva usando gradientes conjugados. Las estructuras minimizadas se utilizan como geometrías de partida para las simulaciones de dinámica molecular (MD) a 300 K utilizando los campos de fuerza TRIPOS y MM3*. En todos los casos las simulaciones se realizan con un paso de integración de 1 fs. El periodo de equilibración fue de 100 ps, y se toman muestras de la trayectoria cada 0,5 ps, siendo el tiempo total de la simulación 1 ns en cada caso. En la Figura 4.22 se muestran los mapas conformacionales generados para el trisacárido de repetición.

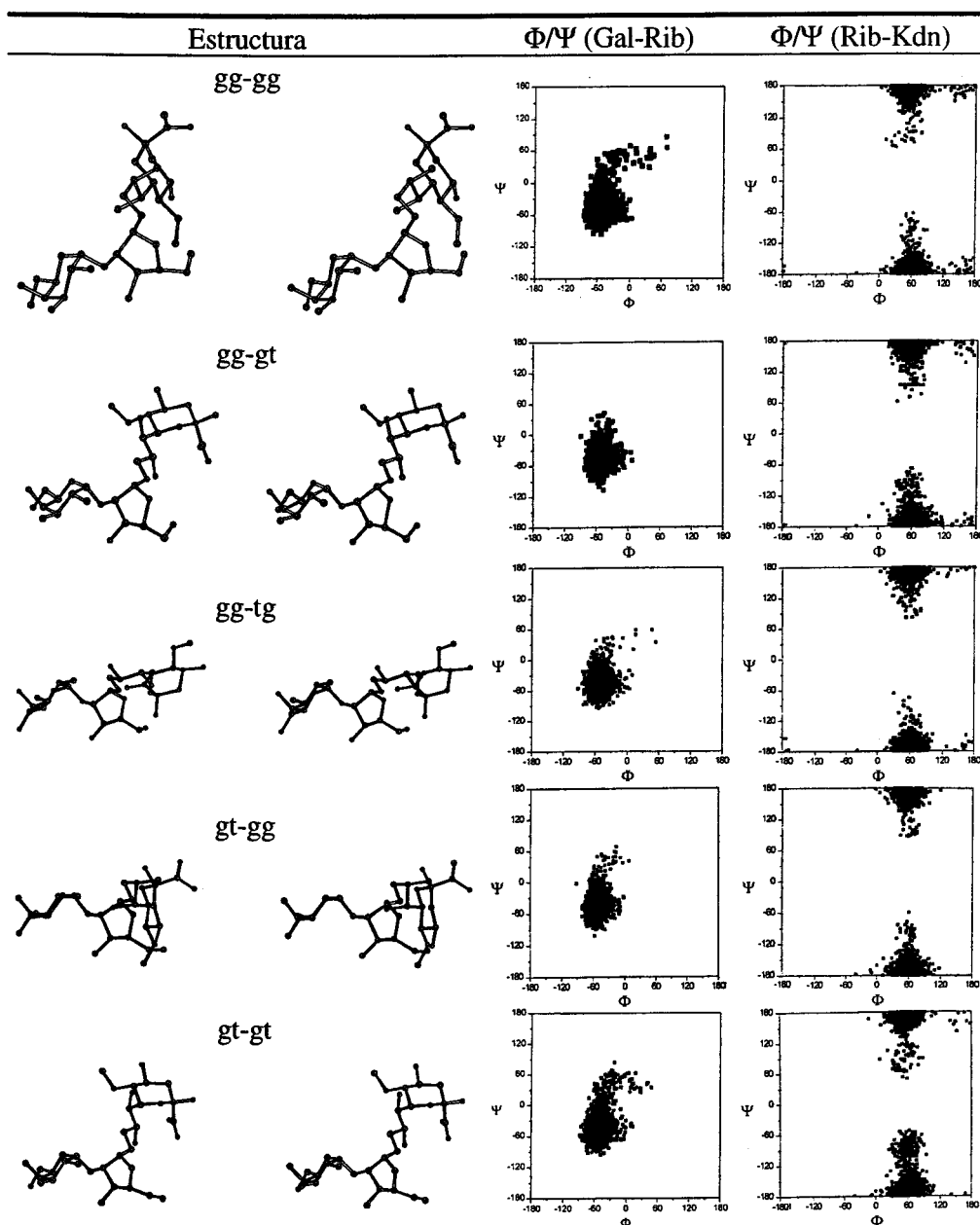


Figura 4.22. Estructuras de partida de las dinámicas de 1 ns y los mapas conformacionales Φ vs Ψ generados a partir de los datos resultantes. (continua)

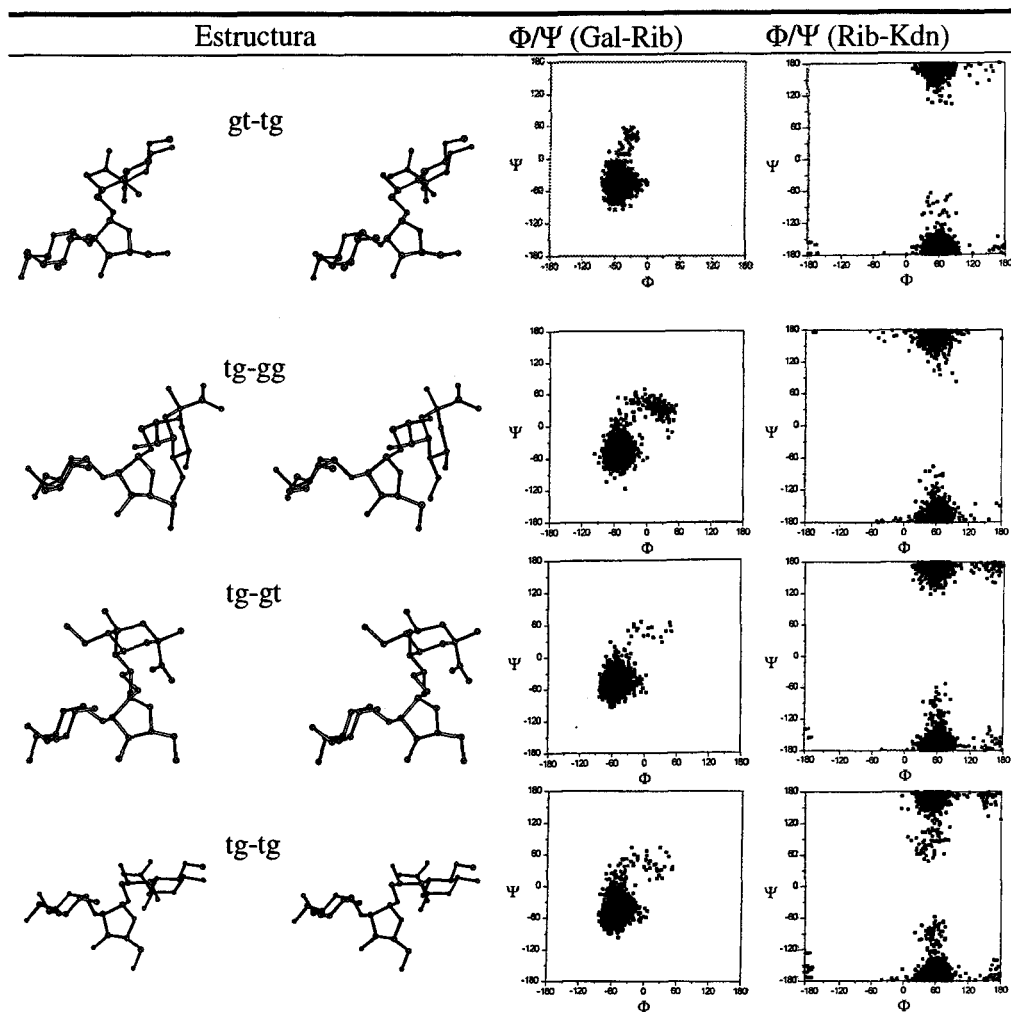


Figura 4.22 (continuación). Estructuras de partida de las dinámicas de 1 ns y los mapas conformacionales Φ vs Ψ generados a partir de los datos resultantes.

De acuerdo con los datos obtenidos para los dos enlaces glicosídicos, los ángulos de torsión cubren unas zonas bien definidas del mapa Φ/Ψ (Figura 4.22, Tabla 4.4), dependiendo poco del rotámero presente en los grupos hidroximetilo y del campo de fuerzas. En la Tabla 4.4 se resumen los valores de los ángulos de torsión y rangos de variación de los enlaces glicosídicos.

Torsión	Galp-Ribf	Ribf-Kdnp
Φ	-45 (de -90 a +60)	55 (de 0 a +90)
Ψ	-60 (de -100 a +80)	176 (de +90 a -60)

Tabla 4.4. Ángulos de torsión y rangos de variación de los enlaces glicosídicos deducidos de las simulaciones de dinámica molecular del trisacárido 1.

Independientemente del campo de fuerzas utilizado, los ángulos Φ_{GR} y Ψ_{GR} mostraron oscilaciones centradas a -60° en ambos casos. Estas oscilaciones fueron más pronunciadas en Ψ que en Φ , ya que el efecto *exo*-anomérico favorece las orientaciones en las que los enlaces C-1-O-5 y O-C-2 esté en disposición *gauche* ($\Phi = -60^\circ$). También se observan excursiones a la zona anti, aunque minoritarias.

En el caso de los ángulos Φ_{RK} y Ψ_{RK} (enlace Ribf-Kdnp), aparecen oscilaciones centradas a 60° y 180° , respectivamente. De nuevo, las oscilaciones son más pronunciadas alrededor de Ψ .

La mayoría de las simulaciones mostraron cierta estabilidad en los ángulos Ω de las cadenas laterales. Para poder evaluar más apropiadamente el espacio conformacional accesible para estos ángulos, se llevaron a cabo dos simulaciones de 10 ns cada una. Las trayectorias muestran varias transiciones en los ángulos Ω para las cadenas exocíclicas, aunque sigue existiendo una orientación mayoritaria.

De los ángulos Ω obtenidos de las estructuras minimizadas de cada rotámero, y utilizando la ecuación de Altona⁷⁴ para calcular las constantes de acoplamiento esperadas para esos ángulos, se puede estimar la distribución de rotámeros en disolución a partir de los valores experimentales de $J_{H,H}$. La Tabla 4.5 presenta una comparación entre la distribución observada experimentalmente y

la calculada por dinámica molecular (la mejor concordancia se consigue con la dinámica de 10 ns usando el campo de fuerzas MM3*).

	Distribución de los rotámeros <i>gg:gt:tg</i>			
	Experimental	MM3* (1 ns)	TRIPOS (1 ns)	MM3* (10 ns)
Ω (Ribf)	42:54:4	30:45:25	4:47:49	40:55:5 (para <i>gg-gg</i>) 40:55:5 (para <i>gg-gt</i>)
Ω (Kdnp)	52:48:0	38:46:16	53:13:33	90:9:1 (para <i>gg-gg</i>) 52:47:1 (para <i>gg-gt</i>)

Tabla 4.5. Poblaciones relativas de los rotámeros *gg*, *gt* y *tg* para las unidades de ribosa y Kdn. En el caso de las dinámicas de 1 ns, el resultado es la distribución global de todas las dinámicas. En el de las de 10 ns, se presentan las que se obtienen a partir de las estructuras *gg* para la Ribf, y *gg* y *gt* para el Kdnp.

En la Figura 4.23 se muestra una superposición de los diferentes conformeros encontrados en la simulación MD. Se observa que, a pesar de la variación relativamente pequeña de los ángulos de torsión glicosídicos, el espacio conformacional accesible para el trisacárido es bastante grande.

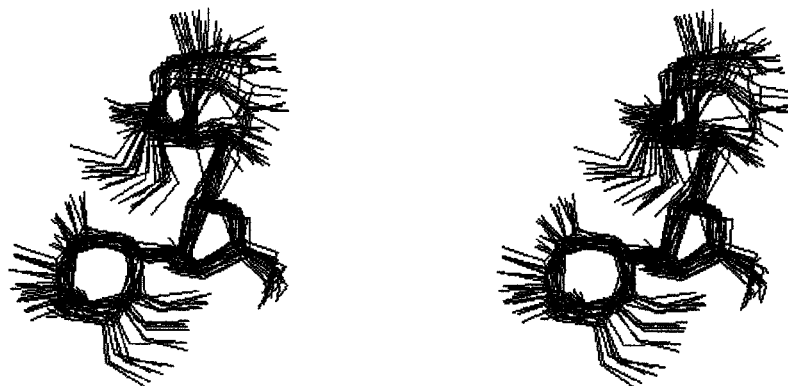


Figura 4.23. Superposición de los diferentes conformeros encontrados para el trisacárido durante la dinámica molecular de 10 ns.

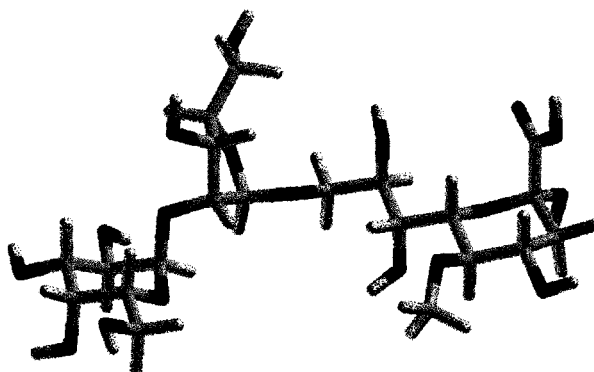


Figura 4.24. Uno de los posibles conformeros de baja energía del trisacárido, que está de acuerdo con los datos de RMN.

4.2.2. Información obtenida por RMN.

Puesto que los datos obtenidos por RMN son valores promediados en el tiempo, los parámetros que se pueden deducir a partir de estos experimentos corresponden a una conformación promedio.

Los experimentos de RMN se llevaron a cabo en un espectrómetro Varian Unity 500, usando una disolución del trisacárido obtenido en la autohidrólisis del CPS en D₂O (aproximadamente 3 mg/ml), a diferentes temperaturas entre 310 y 320 K. Los desplazamientos químicos, en ppm, están referidos al HDO residual (4,71 ppm) y a TMS externo (0 ppm). Los experimentos 2D-NOESY, 2D-ROESY y 2D-T-ROESY se realizaron usando cuatro tiempos de mezcla diferentes: 150, 300, 450 y 600 ms, con matrices de 256x2 K. Se observó una buena linealidad hasta 200 ms (NOESY) y 300 ms (ROESY). Los errores en las intensidades NOE se estimaron como menores del 20%. Los experimentos 1D-NOESY usando la técnica *double pulse field gradient spin echo* se adquirieron con los mismos tiempos de mezcla y se muestran en la Figura 4.25.

La asignación de los dos H-5 de la ribosa como pro-*S* ($\delta_H = 3,78$ ppm) y pro-*R* ($\delta_H = 3,61$ ppm) se basó en los datos de desplazamiento químico de ¹H de la bibliografía.¹¹⁴ La asignación de los protones H-9 de la unidad de Kdn se basó en los datos obtenidos en la dinámica, en los que el NOE H-1(Rib)-H-9_R (Kdn) es siempre más intenso que el correspondiente H-1(Rib)-H-9_S (Kdn), lo que experimentalmente se refleja en una mayor intensidad de la señal correspondiente a H-9_b (1,58 frente a 0,78 cuando se irradia la señal correspondiente a H-1(Rib)). El orden de desplazamientos químicos (pro-*S* mayor que pro-*R*) es el que se encuentra normalmente en las hexosas.¹¹⁵

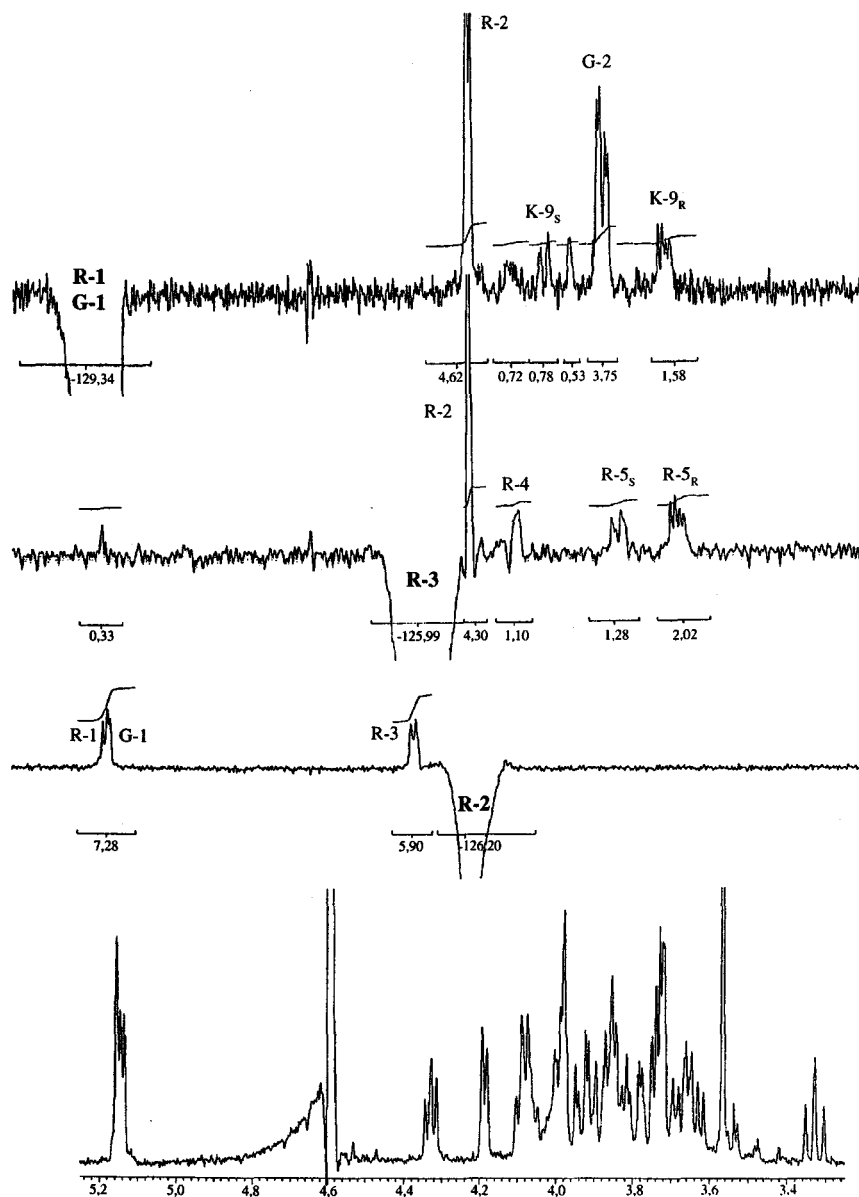


Figura 4.25. Espectros 1D-NOESY registrados a 500 MHz con tiempos de mezcla de 800 ms del trisacárido aislado del CPS de *S. fredii* SVQ293. (continua)

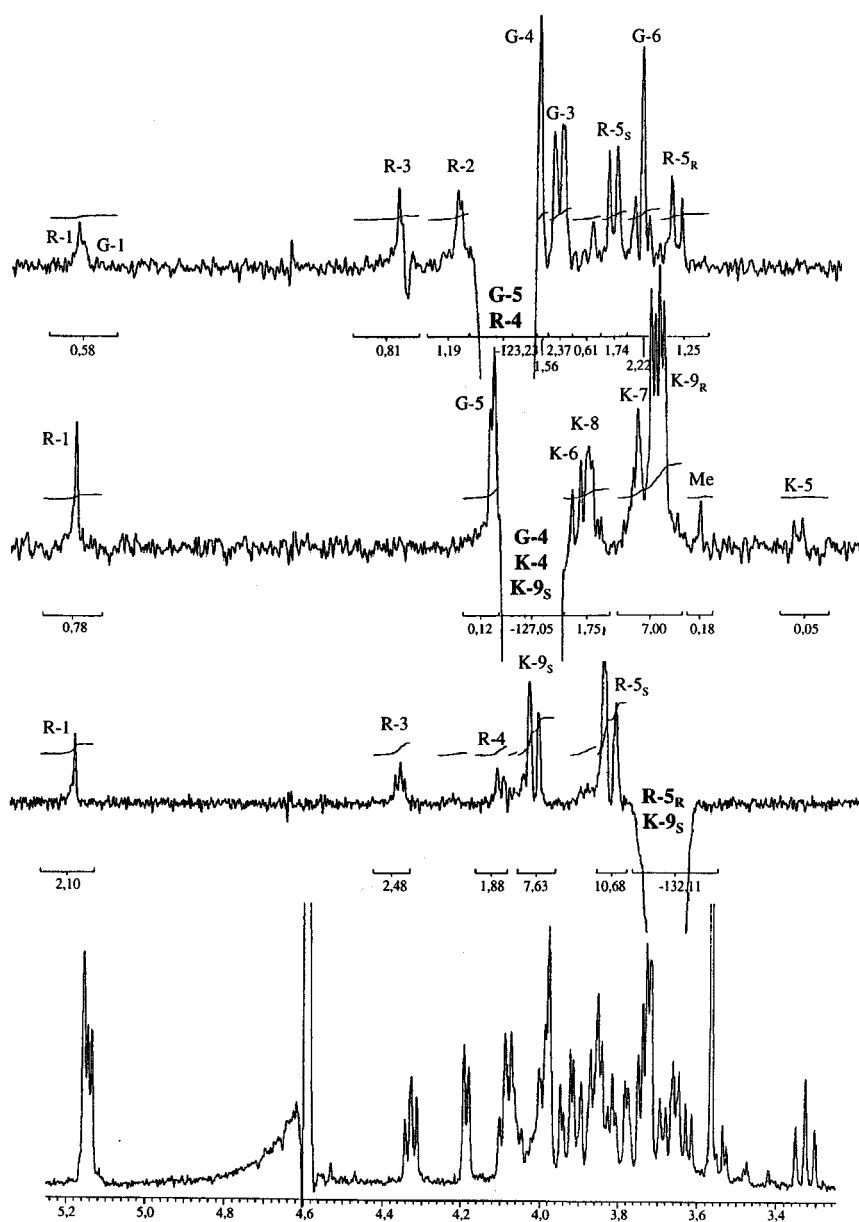


Figura 4.25 (continuación). Espectros 1D-NOESY registrados a 500 MHz con tiempos de mezcla de 800 ms del trisacárido aislado del CPS de *S. fredii* SVQ293.

El cálculo de las distancias de un modo semicuantitativo, se realiza tomando la señal intrarresiduo H-1(Gal)/H-2(Gal) como referencia. Así, los NOE se asignan inicialmente como intensos, medios o débiles, y posteriormente cuantificados. Las distancias calculadas en las dinámicas moleculares, junto con las calculadas experimentalmente se muestran en la Tabla 4.6. Se puede observar una buena concordancia, a pesar de la diferencia de anomería en el Kdn.

Par H/H	MD	Exper.
H-1(Gal)/H-2(Rib)	2,80	2,7
H-1(Gal)/H-1(Rib)	2,92	-
H-5(Gal)/H-2(Rib)	2,89	2,7
H-1(Rib)/H-4(Rib)	3,39	3,2
H-1(Rib)/H-2(Rib)	3,05	2,9
H-2(Rib)/H-3(Rib)	2,42	2,3
H-3(Rib)/H-5 _R (Rib)	3,10	2,6
H-3(Rib)/H-5 _S (Rib)	3,00	2,9
H-9 _R (Kdn)/H-1(Rib)	2,54	2,7
H-9 _S (Kdn)/H-1(Rib)	3,05	3,0

Tabla 4.6. Distancias protón-protón, medidas en Å, calculadas mediante dinámicas moleculares y obtenidas experimentalmente a partir de experimentos NOE.

No se obtienen distancias protón-protón inferiores a 4 Å, deducidas mediante cálculos de dinámica molecular, que no se vean reflejadas en los datos experimentales.

Analizando los resultados experimentales y computacionales, parece ser que hay una gran libertad conformacional para los ángulos de torsión de los enlaces glicosídicos. En consecuencia, la naturaleza del sitio receptor puede modular el comportamiento conformacional de esta molécula.

Por último, en la Figura 4.26 se muestra una de las posibles conformaciones que puede adoptar el polisacárido capsular en disolución.

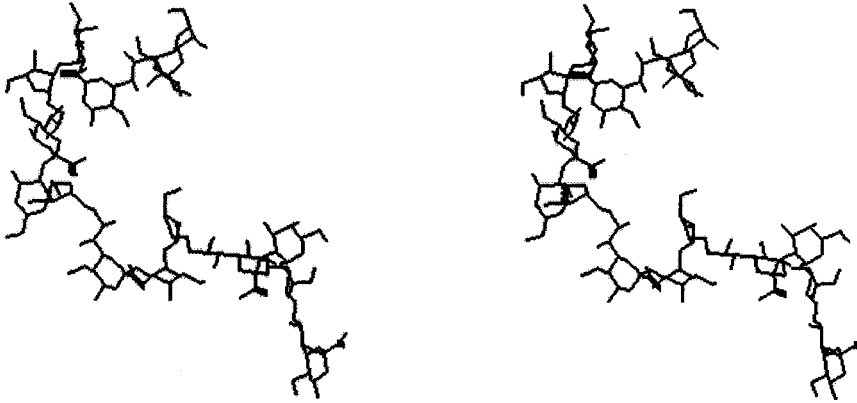


Figura 4.26. Imagen de una de las posibles conformaciones que puede adoptar el polisacárido capsular aislado de *S. fredii* en disolución.

**5. RELACIÓN ESTRUCTURA-CARACTERÍSTICAS
SIMBIÓTICAS**

5.1. RELACIÓN ESTRUCTURA-CARACTERÍSTICAS SIMBIÓTICAS.

Se han descrito recientemente las estructuras de los polisacáridos capsulares de diferentes cepas de *Sinorhizobium fredii* y *Sinorhizobium meliloti*.^{26,83,84,116} Se observan variaciones estructurales tanto entre las dos especies como entre cepas, aunque la estructura parece conservar un motivo estructural que consiste en una unidad de repetición disacarídica compuesta de un azúcar, de naturaleza variable, unido a un 1-carboxi-2-ceto-3-desoxiazúcar (Kdx).¹¹⁷ Este azúcar es Kdo en las cepas de *S. fredii*, y derivados del ácido nonulosónico en *S. meliloti* y *Rhizobium* sp. NGR234.^{83,84,117} En el estudio de la estructura del polisacárido capsular de la cepa HH103 de *S. fredii* se observa que dicho polisacárido está constituido por un homopolisacárido en el que el enlace glicosídico se da entre el OH hemiacetálico y el grupo hidroxilo de una cadena lateral de 3-hidroxi-2-oxibutiramida, con lo que las unidades de repetición en realidad están conectadas a través de dos enlaces: uno hemiacetálico y otro amídico.

El monómero está estructuralmente ligado a los azúcares del tipo Kdx referidos anteriormente, especialmente a los de *S. meliloti* AK631 y *Rhizobium* sp. NGR234. Las especies *S. fredii* y *S. meliloti* están muy relacionadas;¹¹⁸ incluso algunas cepas de *S. fredii* son capaces de establecer una nodulación efectiva con cultivares de alfalfa, y, aunque *Rhizobium* sp. NGR234 no nodula en soja, esta bacteria, cuando lleva el plásmido simbiótico USDA191 de *S. fredii*, puede formar nódulos fijadores de nitrógeno.

Todos los CPS descritos de *S. meliloti* contienen grupos *N*-acetilo. Sin embargo, esto no se da en las cepas de *S. fredii* excepto en HH303.⁸³ Aquí se muestra que el CPS de *S. fredii* HH103 también contiene grupos acetamidos. Es interesante constatar que ambas cepas, HH303 y HH103 tienen una especificidad diferente a las de otras cepas de *S. fredii*: pueden nodular, y fijar nitrógeno, con cultivares de soja americana. La unidad estructural Azúcar-Kdx se ha propuesto a partir de un estudio comparativo de los CPS de *S. meliloti*, *Rhizobium* sp NGR234 (que no nodulan con soja), y las cepas de *S. fredii* USDA201, USDA205, USDA208 y USDA257 (que forman nódulos con las variedades asiáticas de soja, pero no con la mayoría de las americanas^{119,120}). En contraste, las cepas HH103 y HH303 son capaces de nodular las variedades americanas y son las únicas cepas descritas hasta ahora que no producen un CPS con la unidad estructural derivada de las anteriores. Aunque el número de cepas de *S. fredii* investigado es demasiado pequeño para obtener una conclusión consistente, hay otros indicios de que los

polisacáridos capsulares puedan jugar un papel en la especificidad bacteria-huésped: por ejemplo, las mutaciones en los genes *noWXBTUV* de *S. fredii* USDA257 dan lugar en una extensión del rango de hospedadores de esta cepa, para incluir diferentes cultivares de soja americanas que normalmente no son infectadas por esta cepa. Los mutantes resultantes muestran claras diferencias en sus LPS y CPS.¹¹⁷

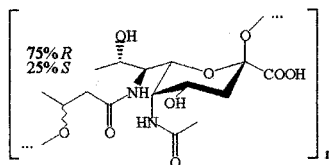
Por otra parte, la estructura del polisacárido capsular del mutante SVQ293 (un derivado de *S. fredii* HH103 que tiene una inserción del transposón Tn5, forma una colonia más mucosa que la cepa nativa, requiere tiamina para crecer en medios mínimos y forma nódulos en soja que fijan muy poco nitrógeno) está constituida por un trisacárido de repetición, lo que no se ajusta a la estructura de consenso citada anteriormente. La bacteria parece presentar la capacidad intrínseca de formar otro tipo de polisacárido capsular muy diferente estructuralmente del encontrado en la cepa nativa. Esta situación se parece a la descrita para *S. meliloti* Rm 1021 (también llamado Rm2011), en el que se pueden producir dos tipos de exopolisacárido completamente diferentes: el EPS I o succinoglicana, producido por la variedad silvestre, y el EPS II o galactoglucana, producido por algunos mutantes.¹²¹ Aparentemente, el CPS compuesto por el derivado del ácido pseudamínico es desplazado por el nuevo CPS, probablemente debido a un efecto pleiotrópico de la mutación.

La presencia de un polisacárido capsular de naturaleza ácida podría ser un hecho común en un amplio espectro de bacterias simbiotes y patógenas de plantas. Sin embargo, como se ha visto, el polisacárido capsular de HH103 no se detecta fácilmente por las técnicas de electroforesis que se emplean habitualmente. Este hecho avisa de la posibilidad de que no se estén detectando ciertos tipos de polisacáridos capsulares en estas especies.

6. CONCLUSIONES

6.1. CONCLUSIONES

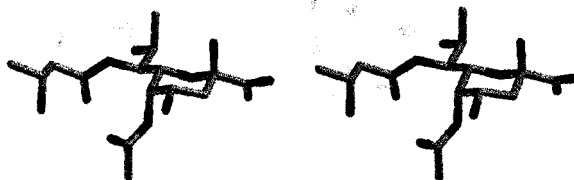
1. Se ha estudiado la estructura del polisacárido capsular de *Sinorhizobium fredii* HH103. Se han utilizado CGL-EM, análisis por metilación, MALDI-TOF, TAF, EI-EM de alta resolución y ^1H y ^{13}C -RMN (junto con los experimentos COSY, HSQC, 2D-HSQC-TOCSY). El polisacárido es un homopolímero formado por el monosacárido de repetición ácido 5-acetamido-3,5,7,9-tetradesoxi-7-(3-hidroxi-butiramido)-L-glicero-L-mano-nonulosónico (ácido pseudamínico):



La configuración absoluta del sustituyente 3-hidroxi-butiramido es 75% *R* y 25% *S*.

Es de destacar que es la primera vez que se describe la estructura de un homopolisacárido constituido por esta unidad de repetición y que el enlace entre las diferentes unidades se lleva a cabo a través de un enlace glicosídico y un enlace amídico.

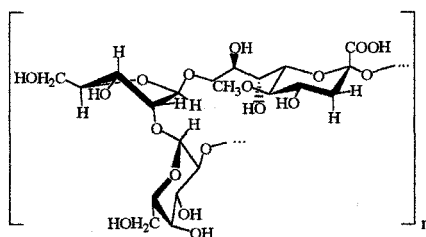
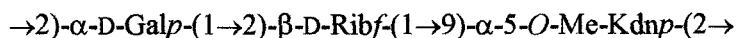
2. Se ha realizado el estudio de modelado molecular en disolución del monosacárido de repetición y del polisacárido capsular de *S. fredii* HH103. No se ha encontrado una conformación única en el monosacárido, sino que existe un equilibrio conformacional cuya conformación mayoritaria es:



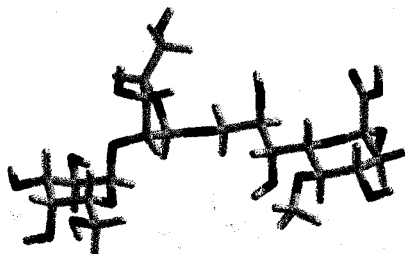
En el caso del polisacárido se encuentran dos conformaciones, que dependen de la distribución *R*, *S* del sustituyente 3-hidroxi-butiramido, que están de acuerdo con los datos experimentales. La estructura que

muestra más concordancia con los datos experimentales corresponde a una distribución homogénea de ambas configuraciones *R*, *S* a lo largo del polisacárido.

3. Se ha estudiado la estructura del polisacárido capsular de *Sinorhizobium fredii* SVQ293, que es un mutante de la cepa nativa de *S. fredii* HH103 que tiene una inserción del transposón Tn5. Se ha utilizado CGL-EM, análisis por metilación, FAB y ^1H y ^{13}C -RMN (junto con los experimentos COSY, HSQC, TOCSY y NOESY). El polisacárido está formado por el siguiente trisacárido de repetición:



4. Se ha llevado a cabo el estudio de modelado molecular en disolución del trisacárido de repetición anterior. La conformación más estable calculada, que coincide con los datos experimentales, es la siguiente:



5. Las estructuras de los polisacáridos capsulares de *S. fredii* HH103 y su mutante *S. fredii* SVQ293, que son cepas que nodulan en las variedades americanas de soja, no se ajusta a la estructura general propuesta para los polisacáridos capsulares de otras cepas de *S. fredii* que forman nódulos con las variedades asiáticas de soja, pero no con la mayoría de las americanas.
-

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- H. Hellriegel y H. Wilfarth, "Beilageheft zu des Zeitschrift des Vereins f.d. Rübenzucker-Industrie d. Deutschen Reiches" (1888) 1-234.
 - 2.- P. Lerouge, P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J. C. Promé y J. Dénarié, *Nature*, **344** (1990) 781-784.
 - 3.- P. Roche, F. Debellé, F. Maillet, P. Lerouge, C. Faucher, G. Truchet, J. Dénarié y J.-C. Promé, *Cell*, **67** (1991) 1131-1143.
 - 4.- R. W. Carlson, J. Sanjuan, U. R. Bhat, J. Glushka, H. P. Spaink, A. H. M. Wijffjes, A. N. N. van Brussel, T. J. W. Stokkermans, N. K. Peters y G. Stacey, *J. Biol. Chem.*; **268** (1993) 18372-18381.
 - 5.- B. L. Reuhs, R. W. Carlson y J. S. Kim, *J. Bacteriol.*, **175** (1993) 3570-3580.
 - 6.- L. S. Forsberg y B. L. Reush, *J. Bacteriol.*, **179** (1997) 5366-5371.
 - 7.- B. L. Reuhs, D. P. Geller, J. S. Kim, J. E. Fox, V. S. K. Kolli y S. G. Pueppke, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (1998) 4930-4938.
 - 8.- B. L. Reuhs, J. S. Kim, A. Badgett y R. W. Carlson, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **7**, (1994) 240-247.
 - 9.- H. H. Keyser, B. B. Bohlool, T. S. Hu y D. F. Weber, *Science*, **215** (1982) 1631-1632.
 - 10.- P. de Lajudie, A. Willems, B. Port, D. Dewettinck, G. Maestrojuan, M. Neyra, M. D. Collins, B. Dreyfus, K. Kersters y M. Gillis, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44** (1994) 715-733.
 - 11.- S. F. Dowdle y B. B. Bohlool, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50** (1985) 1171-1176.
 - 12.- D. N. Rodríguez-Navarro, J. E. Ruiz-Sainz, A. M. Buendía-Clavería, C. Santamaría, P. A. Balatti, H. B. Krishnan y S. G. Pueppke, *System. Appl. Microbiol.*, **19** (1996) 240-248.
-

- 13.- R. V. Masterson, P. R. Russel y A. G. Atherly, *J. Bacteriol.*, **152** (1982) 928-931.
 - 14.- M. D. Stowers y A. R. J. Eaglesham, *Plant and Soil*, **77** (1984) 3-14.
 - 15.- A. M. Buendía-Clavería, D. N. Rodríguez-Navarro, C. Santamaría Linaza, J. E. Ruiz-Sainz, F. Temprano-Vera, *System. Appl. Microbiol.*, **17** (1994) 155-160.
 - 16.- G. Franco-Rodríguez, "*Estructura de Oligosacáridos producidos por Bacterias del Género Rhizobium*", Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1997).
 - 17.- O. Westphal, U. Westphal y T. Sommer, "Microbiology - 1997", Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C. (1977) 221-238
 - 18.- W. T. J. Morgan, *Method. Carbohydr. Chem.*, **5** (1965) 80-82.
 - 19.- G. A. Adams, *Can. J. Chem.*, **45** (1967) 422.
 - 20.- O. Westphal y K. Jann, *Method. Carbohydr. Chem.*, **5** (1965) 83-91.
 - 21.- C. Galanos, O. Lüderitz y O. Westphal, *Eur. J. Biochem.*, **9** (1969) 245.
 - 22.- R. W. Carlson, R. E. Sanders, C. Napoli y P. Albersheim, *Plant Physiol.*, **62** (1978) 912-917.
 - 23.- R.W. Carlson, F. Garci, D. Noel y R.I. Hollingsworth, *Carbohydr. Res.*, **195** (1989) 101-110.
 - 24.- Pigman y Horton, "The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry", Academic Press, **1B**, 1980, p. 1454.
 - 25.- C. François, R.D. Marshall y A. Neuberger, *Biochem. J.*, **83** (1962) 335.
 - 26.- B. L. Reuhs, R. W. Carlson y J. S. Kim, *J. Bacteriol.*, **175** (1993) 3570-3580.
 - 27.- R. Köplin, G. Wang, B. Hötte, U. B. Priefer y A. Pühler, *J. Bacteriol.*, **175** (1993) 7786-7792.
 - 28.- A. J. Lesse, A. A. Campagnari, W. E. Bittner, M. A. Apicella, *J. Immunol. Methods*, **126** (1990) 109-117.
-

- 29.- R. Kittelberger y F. Hilbink, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **26** (1993) 81-86.
 - 30.- J. Corzo, R. Pérez-Galdona, M. León-Barrios, A. M. Gutiérrez-Navarro, *Electrophoresis*, **12** (1991) 439-441.
 - 31.- C. M. Tsai, C. E. Frasch, *Anal. Biochem.*, **119** (1982) 115-118.
 - 32.- M.F. Chaplin, *Anal. Biochem.*, **123** (1982) 336-341.
 - 33.- J.P. Kammerling, G.J. Gerwig, J.F.G. Vliegthart y R.J. Clamp, *Biochem. J.*, **151** (1975) 491-495.
 - 34.- O.S. Chizhov, N.V. Molodtsov y N.K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.*, **4** (1967) 273-276.
 - 35.- J. Kärkkäinen y R. Vihko, *Carbohydr. Res.*, **10** (1969) 113-120.
 - 36.- G.J. Gerwig, J.P. Kamerling y J.F.G. Vliegthart, *Carbohydr. Res.*, **62** (1978) 349-357.
 - 37.- K. Leontein, B. Lindberg y J. Lönngren, *Carbohydr. Res.*, **62** (1978) 359-362.
 - 38.- B. Lindberg, "Methods in Enzimology". Editado por V. Ginsburg, vol. 28, parte B, Academic Press, New York, 1973., 178-195.
 - 39.- E.L. Hirst y E. Percival, *Methods in Carbohydr. Chem.*, **2** (1963) 145.
 - 40.- W.N. Haworth, *J. Chem. Soc.*, **107** (1915) 8.
 - 41.- T. Purdie y J.C. Irvine, *J. Chem. Soc.*, **83** (1903) 1021.
 - 42.- R. Kuhn, H. Trischmann y I. Low, *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.*, **67** (1955) 32.
 - 43.- S.I. Hakomori, *J. Biochem.*, **55** (1964) 205.
 - 44.- I. Ciucanu y F. Kerek, *Carbohydr. Res.*, **131** (1984) 209-217.
 - 45.- A. Tacken, H. Brade, F. M. Unger y D. Charon, *Carbohydr. Res.*, **149** (1986) 263-277.
-

-
- 46.- T. J. Waeghe, A. G. Darvill, M. McNeil y P. Albersheim, *Carbohydr. Res.*, **123** (1983) 281-304.
- 47.- J. Lönngren y S. Svensson, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **29** (1974) 41.
- 48.- M.-S. Kuo y A.J. Mort, *Carbohydr. Res.*, **145** (1986) 247-265.
- 49.- A. B. Blakeney, P. J. Harris, R. J. Henry y B. A. Stone, *Carbohydr. Res.*, **113** (1983) 29-299.
- 50.- P.-E. Jansson, L. Kenne, H. Liedgren, B. Lindberg y J. Lönngren, *Chem. Commun. Univ. Stockolm*, **1** (1976); *Chem. Abstr.*, **87** (1977) 136-153.
- 51.- H. Björndal, B. Lindberg y S. Svensson, *Carbohydr. Res.*, **5** (1967) 433-440.
- 52.- D.P. Sweet, R.M. Shapiro y P. Albersheim, *Carbohydr. Res.*, **40** (1975) 217-225.
- 53.- M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick y A.N. Tyler, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1981) 325-327.
- 54.- D.H. Williams, C. Bradley, G. Bojesen. S. Santikarn y L.C.E. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.*, **103** (1981) 5700-5704.
- 55.- K.L. Rinehart, Jr., L.A. Gaudio, M.L. Moore, R.C. Pandey, J.C. Cook, Jr., M. Barber, R.D. Sedgwick, R.S. Bordoli, A.N. Tyler y B.N. Green, *J. Am. Chem. Soc.*, **103** (1981) 6517-6520.
- 56.- L.S. Forsberg, A. Dell, D.J. Walton y C.E. Ballou, *J. Biol. Chem.*, **257** (1982) 3555-3563.
- 57.- L. Esteban, "La Espectrometría de Masas en Imágenes". ACK Editores (1993).
- 58.- K. A. Grannath y B. E. Kvist, *J. Chromatog.*, **28** (1967) 69.
- 59.- D. J. States, R. A. Haberkorn y D. J. Ruben, *J. Magn. Reson.*, **48** (1982) 286-292.
- 60.- E. Kupce y R. Freeman, *J. Magn. Reson.*, **106** (1995) 168-181.
- 61.- C. Roumentand, D. Canet, N. Mahieu y T. Toma, *J. Magn. Res.*, **106** (1994) 168-181.
-

- 62.- L. Braunschweiler y R.R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, **53** (1983) 521-527.
 - 63.- P. Hanfland, H. Egge, U. Dabrowski, S. Jhun, D. Roelcke y J. Dabrowski, *Biochemistry*, **20** (1981) 5310.
 - 64.- K. Bock y C. Pedersen, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **41** (1983) 27.
 - 65.- R. Barker, H.A. Nuñez, P. Rosevor y A.S. Serianni, *Methods in Enzymol.*, **83** (1982) 58-69.
 - 66.- G. Bondenhausen y D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.*, **69** (1980) 185-189.
 - 67.- T. Parella, F. Sánchez-Ferrando y A. Virgili, *J. Magn. Reson.*, **126** (1997) 274-277.
 - 68.- A. Bax, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.*, **108** (1986) 2093-2094.
 - 69.- D. Boudot, C. Roumestand, F. To y D. Canet, *J. Magn. Reson.*, **83** (1989) 428-433.
 - 70.- D. Boudot, C. Roumestand, F. To y D. Canet, *J. Magn. Res.*, **90** (1990) 221-227.
 - 71.- I. Tvaroska y T. Bleha, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **47** (1989) 45-123.
 - 72.- J. W. Brown y B. D. Wladkowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **118** (1996) 1190-1193.
 - 73.- O. Hassel y B. Ottar, *Acta Chem. Scand.*, **1** (1947) 929.
 - 74.- C. Altona y C. A. G. Haasnoot, *Org. Magn. Reson.*, **36** (1980) 2783.
 - 75.- M. Martín Pastor, "Estructura y dinámica de oligosacáridos mediante RMN y cálculos de mecánica y dinámica molecular", Tesis Doctoral, Madrid (1997).
 - 76.- D. Bundle, H. Baumann, J. R. Brisson, S. M. Cagne, A. Zdanov y M. Cygler, *Biochemistry*, **33** (1994) 5183-5192.
 - 77.- H. Kogelberg y T. J. Rutherford, *Glycobiology*, **4** (1994) 49-57.
 - 78.- G. Wildmalm y R. M. Venable, *Biopolymers*, **34** (1994) 1079-1088.
 - 79.- A. Imberty, K. D. Hardman, J. P. Carver y S. Perez, *Glycobiology*, **1** (1991) 456.
 - 80.- N. L. Allinger, Y. H. Yuh y J. H. Lii, *J. Am. Chem. Soc.*, **111** (1989) 8551.
-

- 81.- F. Mohamadi, N. G. I. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, C. Canfield, G. Ghang, T. Hendrickson y W. C. Still, *J. Comput. Chem.*, **11** (1990) 440.
- 82.- Beringer, J. E., *J. Gen. Microbiol.*, **84**, (1974) 188-198.
- 83.- B. L. Reuhs, D. G. Geller, J. S. Kim, J. F. Fox, V. S. K. Kolli y S. G. Pueppke, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (1998) 4930-4938.
- 84.- L. S. Forsberg y B. L. Reuhs, *J. Bacteriol.*, **179** (1997) 5366-5371.
- 85.- E. V. Vinogradov, A. S. Shashkov, Y. A. Knirel, N. K. Kochetkov, J. Dabrowski, H. Grosskurth, E. S. Stanislavsky y E. V. Kholodkova, *Carbohydr. Res.*, **231** (1992) 1-11.
- 86.- Y. A. Knirel, E. V. Vinogradov, A. S. Shashkov, B. A. Dimitriev, N. K. Kochetkov, E. S. Stanislavsky y G. M. Mashilova, *Eur. J. Biochem.*, **163** (1987) 627-637.
- 87.- K. K. Mock, M. Davey y J. S. Cottrell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177** (1991) 644-651.
- 88.- L. Battisti, J. C. Lara y J. A. Leigh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89** (1992) 5625-5629.
- 89.- J. M. Beau, R. Shauer, J. Haverkamp, L. Dorland, J. F. G. Vliegthart y P. Sina, *Carbohydr. Res.*; **82** (1980) 125-129.
- 90.- Y. A. Knirel, E. T. Rietschel, R. Marre y U. Zähringer, *Eur. J. Biochem.*, **221** (1994) 239-245.
- 91.- Y. A. Knirel, E. V. Vinogradov, A. S. Shashkov, N. K. Kochetkov, V. L. L'vov y B. A. Dimitriev, *Carbohydr. Res.*, **141** (1985) C1-C3.
- 92.- Y. A. Knirel, N. A. Kocharova, A. S. Shashkov y N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.*, **145** (1986) C1-C4.
- 93.- Y. A. Knirel, A. Kocharova, A. S. Shashkov, B. A. Dimitriev, N. K. Kochetkov, E. S. Stanislavsky y G. M. Mashilova, *Eur. J. Biochem.*, **163** (1987) 639-652.
- 94.- L. Kenne, B. Linberg, E. Schweda, B. Gustafsson y T. Holme, *Carbohydr. Res.*, **180** (1988) 285-294.

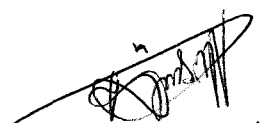



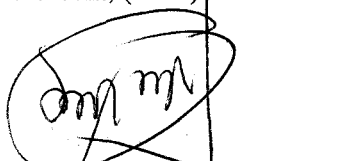
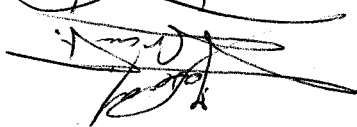
* 5 0 1 2 3 3 1 1 4 *

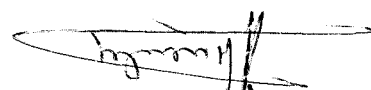

FQU I T/733

-
- 95.- Y. A. Knirel, H. Moll, J. H. Helbig y U. Zähringer, *Eur. J. Biochem.*, **221** (1994) 239-245.
- 96.- S. B. Engelsen, C. Herve du Penhoat y S. Perez, *J. Phys. Chem.*, **99**, 13334 (1995).
- 97.- N. L. MOhamadi, N. G. I. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, C. Canfield, G. Chang, T. Hendrickson y W. C. Still, *J. Comput. Chem.*, **11**, 440 (1990).
- 98.- J. Ruiz-Cabello, G. W. Vuister, C. T. W. Moonen, P. van Gelderen, J. S. Cohen y P. C. M. van Zihl, *J. Magn. Reson.*, **100**, 282 (1992).
- 99.- A. Kumar, R. R. Ernst y K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1 (1980).
- 100.- A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, J. M. Lee, C. D. Warren y R. W. Jeanloz, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 811 (1984).
- 101.- T. L. Hwang y A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3157 (1992).
- 102.- K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T. L. Hwang y J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 4199 (1995).
- 103.- R. W. Carlson, *J. Bacteriol.*, **158** (1984) 1012-1017.
- 104.- R. W. Carlson y S. K. Bhagyalakshmi, *Carbohydr. Res.*, **231** (1992) 205-219.
- 105.- Y. Mononen, *Carbohydr. Res.*, **88** (1981) 39-50.
- 106.- K. Bock, C. Pedersen y H. Pedersen, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **42** (1984) 193-225.
- 107.- G. Strecker, J. M. Wieruszkeski, J. Montreuil, *Biochem. J.*, **287** (1992) 905-909.
- 108.- S. J. Angyal, *Carbohydr. Res.*, **77** (1979) 37-50.
- 109.- M. Iwasaki, S. Inone y F. A. Troy, *J. Biol. Chem.*, **265** (1990) 2596-2602.
- 110.- Y. A. Knirel, N. A. Kocharova, A. S. Shaskov, N. K. Kochetkov, V. A. Mamontova y T. F. Soloveva, *Carbohydr. Res.*, **188** (1989) 145-155.
- 111.- K. Bock y J. Duus, *J. Carbohydr. Chem.*, **13** (1994) 513.
-

- 112.- A. D. French, J. D. Brady (Eds) "Computer modelling of carbohydrate molecules", ACS Symp. Ser., **430** (1990).
- 113.- R. U. Lemieux, K. Bock, L. T. J. Delbaere, S. Koto, V. S. Rao, *Can. J. Chem.*, **58** (1980) 631.
- 114.- G. D. Wu, A. S. Serianni y R. Barker, *J. Org. Chem.*, **48** (1983) 1750-1757.
- 115.- K. Bock y J. Duus, *J. Carbohydr. Chem.*, **13** (1994) 513-543.
- 116.- B. L. Reuhs, J. S. Kim y A. G. Matthyse, *J. Bacteriol.*, **179** (1997) 5372-5379.
- 117.- E. L. Kannenberg, B. L. Reuhs, L. S. Forberg y R. W. Carlson (H.P. Spaink et al, Eds), "The Rhizobiaceae", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1998) 119-154.
- 118.- P. De Lajudie, A. Willems, B. Pot, D. Dewettinck, G. Mestrojuañ, M. Neyra, M. D. Collins, B. Dreyfus, K. Kesters y M. Gillis, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44** (1994) 715-733.
- 119.- H. H. Keyser, B. B. Bohool, T. S. Hu y D. F. Weber, *Science*, **215** (1982) 1631-1632.
- 120.- A. M. Buendía-Clavería y J. E. Ruíz-Sainz, *Physiol. Plant.*, **64** (1985) 507-512.
- 121.- A. Becker y A. Pühler (H. P. Spaink et al, Eds.), "The Rhizobiaceae", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1998) 97-118.

Sobrescrito "Cm Laudo"

per unanimitat

Miguel Ángel Rodríguez Carralero
 Estudios de estructura de los Poliacidos
 Capítulos de Simposios
 frentes