



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Caracterització genètica i química del nucli del LPS de *Serratia marcescens* N28b

Núria Piqué i Clusella



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

**Universitat de Barcelona**  
**Departament de Microbiologia**  
**Facultat de Farmàcia**

**Caracterització genètica i  
química del nucli del LPS de  
*Serratia marcescens* N28b**

**Núria Piqué i Clusella**  
**2000**

**Programa de Doctorat: Microbiologia Aplicada**

**Bienni: 1995-1997**

**Tesis**  
**2000/Piq**

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701098584



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Divisió de Ciències de la Salut  
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries  
Facultat de Farmàcia

**Caracterització genètica i química del nucli del LPS de  
*Serratia marcescens* N28b**

Memòria presentada per  
**Núria Piqué i Clusella** per obtenir  
al grau de  
**Doctora en Farmàcia.**

Barcelona, març del 2000

Núria Piqué i Clusella

Programa de Doctorat: Microbiologia Aplicada

Bienni: 1995-1997



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Divisió de Ciències de la Salut  
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries  
Facultat de Farmàcia

**Dr. Miquel Regué i Queralt**, Professor del Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries de la Facultat de Farmàcia

**Certifica:**

Que Núria Piqué i Clusella ha realitzat sota la meva direcció el treball que porta per títol "Caracterització genètica i química del nucli del LPS de *Serratia marcescens* N28b"

Considero que la memòria presentada compleix els requisits formals i conceptuals per a ser defensada en front del Tribunal corresponent:

Barcelona, març del 2000

Dr. Miquel Regué i Queralt

<b>INTRODUCCIÓ</b> -----	7
1. Introducció-----	9
2. Biologia de l'endotoxina-----	12
2.1 Molècules d'unió al LPS-----	12
2.2 Dianes cel·lulars del LPS-----	14
3. Química del lipopolisacàrid-----	17
3.1 Estructura general del lipopolisacàrid-----	17
3.2 Estructura química de l'antigen O-----	20
3.2.1 <i>Escherichia coli</i> -----	21
3.2.1 <i>Salmonella enterica</i> -----	22
3.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> -----	23
3.2.3 <i>Serratia marcescens</i> -----	24
3.2.4 <i>Shigella spp</i> -----	26
3.2.5 <i>Yersinia spp</i> -----	27
3.2.6 <i>Legionella pneumophila</i> -----	27
3.2.7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -----	28
3.2.8 <i>Vibrio cholerae</i> -----	28
3.3 Relació estructura-activitat en l'antigen O-----	29
3.4 Estructura química del nucli del LPS-----	29
3.4.1 Introducció-----	29
3.4.2 El nucli del LPS en la família <i>Enterobacteriaceae</i> -----	32
3.4.2.1 <i>Escherichia coli</i> -----	32
3.4.2.2 <i>Salmonella enterica</i> -----	34
3.4.2.3 <i>Shigella spp</i> -----	37
3.4.2.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i> -----	37
3.4.2.5 <i>Proteus spp</i> -----	39
3.4.2.6 <i>Yersinia spp</i> -----	39
3.4.2.7 <i>Citrobacter</i> -----	41
3.4.3 El nucli del LPS en la família <i>Vibrionaceae</i> -----	41
3.4.3.1 <i>Vibrio cholerae</i> -----	41
3.4.3.2 <i>Aeromonas spp</i> -----	42
3.4.4 El nucli del LPS en la família <i>Neisseriaceae</i> -----	44
3.4.4.1 <i>Neisseria spp</i> -----	44
3.4.4.2 <i>Acinetobacter spp</i> -----	45
3.4.5 El nucli del LPS en la família <i>Chlamydiaceae</i> -----	45
3.4.5.1 <i>Chlamydia spp</i> -----	45
3.4.6 El nucli del LPS en la família <i>Pastereullaceae</i> -----	46
3.4.6.1 <i>Haemophilus spp</i> -----	46
3.4.7 El nucli del LPS en la família <i>Pseudomonadaceae</i> -----	47
3.4.7.1 <i>Pseudomonas spp</i> -----	47
3.4.7.2 <i>Xanthomonas spp</i> -----	48
3.4.8 El nucli del LPS en la família <i>Rhizobiaceae</i> -----	48
3.4.8.1 <i>Rhizobium spp</i> -----	48
3.4.9 El nucli del LPS en la família <i>Legionellaceae</i> -----	48
3.4.9.1 <i>Legionella spp</i> -----	48
3.4.10 El nucli del LPS en bacteries fototròfiques-----	49
3.5 Relació estructura-activitat en el nucli del LPS-----	49
3.6 Estructura del lípid A-----	51
3.7 Relació estructura-activitat en el lípid A-----	55
4. Biosíntesi del lípid A-----	56
4.1 Formació de la UDP-GlcNAc-----	56
4.2 Acilació de la UDP-GlcNAc-----	57
4.3 Eliminació del grup acetil en posició 2-----	57
4.4 Reacció d'acilació en posició 2-----	58
4.5 Formació del lípid X-----	58

4.6 Formació del disacàrid-----	58
4.7 Formació del lípid IV <sub>A</sub> -----	59
4.8 Acilació final-----	60
5. Biosíntesi del nucli del lipopolisacàrid-----	62
5.1 Introducció-----	62
5.2 Biosíntesi del Kdo-----	62
5.3 Transferència de Kdo al lípid IV <sub>A</sub> -----	63
5.4 Biosíntesi de la regió de les heptoses-----	64
5.4.1 Síntesi i activació de l'heptosa-----	64
5.4.2 Transferència d'ADP-L,D-Hep al KdoI-----	65
5.4.3 Transferència de l'HepII-----	65
5.4.4 Transferència de l'HepIII-----	66
5.4.5 Reaccions de fosforilació-----	67
5.5 Biosíntesi del nucli extern-----	68
5.5.1 Transferència de la GlcI al nucli intern-----	69
5.5.2 Transferència de Gal al residu de GlcI-----	69
5.5.3 Transferència d'un residu de Gal a la GlcI en <i>Salmonella</i> -----	69
5.5.4 Transferència del residu de GlcII en <i>Salmonella</i> -----	70
5.5.5 Addició d'un residu de GlcNAc lateral a la GlcII en <i>Salmonella</i> -----	70
5.5.6 Addició de la GlcII en <i>E. coli</i> K-12-----	70
5.5.7 Addició de la GlcIII en <i>E. coli</i> K-12-----	70
5.5.8 Transferència de l'HepIV en <i>E. coli</i> K-12-----	71
5.5.9 Transferència de GlcNAc a l'HepIV en <i>E. coli</i> K-12-----	71
5.5.10 Transferència de residus laterals en <i>E. coli</i> R1, R3 i R4-----	71
5.5.11 Formació d'estructures de nucli alternatives (LOS)-----	72
5.6 Unió de l'antigen O al nucli-----	72
5.7 Determinants genètics de la biosíntesi del nucli del LPS-----	73
6. Biosíntesi de l'antigen O-----	75
6.1 Biosíntesi de monosacàrids activats-----	75
6.2 Inici de la biosíntesi de l'antigen O-----	76
6.2.1 Antigen O WbaP depenents-----	76
6.2.2 Antigen O WecA depenents-----	77
6.3 Biosíntesi de les unitats de repetició-----	78
6.4 Translocació de les unitats de repetició i polimerització en antigens heteropolisacàridics-----	79
6.5 Regulació de la polimerització de l'antigen O-----	80
6.6 Unió de l'antigen O al nucli-lípida-----	81
6.7 Translocació dels antigens homopolisacàridics-----	81
6.8 Translocació de l'antigen O en <i>S. enterica</i> Borreze-----	81
7. La bacteriocina 28b de <i>Serratia marcescens</i> i el LPS-----	82
<b>OBJECTIUS</b> -----	85
<b>MATERIAL I MÈTODES</b> -----	89
1. Soques bacterianes utilitzades-----	91
2. Plasmidis i còsmids recombinants utilitzats-----	92
3. Medis de cultiu i antibiòtics-----	93
3.1 Medis líquids-----	93
3.2 Medis sòlids-----	94
3.3 Antibiòtics i altres additius-----	94
4. Producció d'extractes crus de bacteriocina. Titulació-----	95
4.1 Mètode d'extracció de la bacteriocina mitjançant l'obtenció de proteïnes totals-----	95

4.2	Titulació de l'activitat bacteriocinogènica	95
5.	Assaig de sensibilitat/resistència a la bacteriocina	96
5.1	Assaig qualitatiu ( <i>Cross-streak layer test</i> )	96
5.2	Assaig quantitatiu	96
6.	Electroforesi en gels de poliacrilamida SDS-PAGE	97
6.1	Gels de poliacrilamida SDS-PAGE. Gels de LPS	97
6.1.1	Preparació de les mostres	97
6.1.2	Preparació dels gels	98
6.1.3	Tinció	98
6.2	Gels de poliacrilamida SDS-PAGE-Tricina. Gels de nucli de LPS	99
6.2.1	Preparació de les mostres	99
6.2.2	Gels i tinció	100
7.	Aïllament de bacteriòfags	100
7.1	Mostreig	100
7.2	Enriquiment	100
7.3	Obtenció de l'estoc de bacteriòfags	101
7.4	Assaig qualitatiu	101
7.5	Assaig quantitatiu	101
7.6	Assaig de sensibilitat/resistència	102
7.7	Obtenció de mutants per resistència a fags	102
8.	Tècniques de genètica molecular	103
8.1	Aïllament i purificació de l'ADN plasmídic	103
8.2	Fenolització de l'ADN	103
8.3	Precipitació de l'ADN	104
8.4	Quantificació de l'ADN	104
8.5	Reaccions enzimàtiques	104
8.5.1	Restriccions senzilles	105
8.5.2	Restriccions dobles	105
8.5.3	Restriccions parcials	105
8.5.4	Reaccions de defosforilació	105
8.5.5	Reacció de lligació	106
8.5.6	Modificació dels extrems	106
8.6	Electroforesi d'ADN en gels d'agarosa	106
8.7	Purificació d'ADN a partir de gels d'agarosa	107
8.8	Obtenció de sondes d'ADN. Detecció de fragments d'ADN. Tècnica de Southern	108
8.9	Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	109
8.10	Disseny de cebadors específics	111
8.11	Seqüenciació de l'ADN	111
8.12	Software per a l'anàlisi de seqüències	112
8.13	Tècniques de transferència d'ADN	114
8.13.1	Transformació per cèl.lules supercompetents	114
8.13.2	Transformació per electroporació	115
8.13.3	Conjugació	115
9.	Mètodes d'anàlisi de la molècula de LPS	116
9.1	Mètodes d'extracció de LPS	116
9.1.1	Extracció per a LPS de tipus S (fenol-aigua)	116
9.1.2	Extracció per a LPS de tipus R (PCP)	118
9.1.3	Extracció de LPS a partir de membranes totals	119
9.2	Purificació del LPS	120
9.3	Mètodes d'anàlisi colorimètrica del LPS	121
9.3.1	Determinació de Kdo	121
9.3.2	Determinació de glucosamina amb el carboni anomèric lliure	122
9.3.3	Determinació de glucosamina total	122
9.3.4	Determinació de fofat total	123
9.3.5	Determinació de fosfat inorgànic	123

9.4	Mètodes de degradació del LPS-----	124
9.4.1	Hidròlisi amb àcid acètic-----	124
9.4.2	Hidrazinolisi-----	124
9.4.3	Tractament amb HF (Eliminació de grups fosfat)-----	125
9.5	Cromatografia per gel filtració-----	125
9.5.1	Columna de Sephadex G-50-----	125
9.5.2	Columna de Sephadex G-10-----	126
9.5.3	Columna de Superdex 75-----	126
9.5.4	Columna de BIO-Gel P-4-----	126
9.6	Cromatografia en capa fina-----	126
9.7	Cromatografia d'intercanvi iònic (DEAE)-----	128
9.8	Cromatografia d'intercanvi iònic d'alta resolució (HPAEC)-----	128
9.9	Cromatografia de gasos-----	130
9.9.1	Mètode de derivatització de monosacàrids a alditol derivats per a la determinació de sucres neutres-----	130
9.9.2	Mètode de derivatització de monosacàrids a alditol derivats per a la determinació d'aminosucres-----	131
9.9.3	Mètode de derivatització de monosacàrids a alditol derivats per a la determinació d'àcids urònics-----	132
9.10	Cromatografia de gasos acoblada a Espectrometria de masses (GC-MS)-----	133
9.10.1	Anàlisi per GC-MS de monosacàrids metilats i acetilats parcialment-----	134
9.11	Espectrometria de masses-----	134
9.9.4	MALDI-MS-----	134
9.9.5	Electrospray (ESI)-----	135
9.12	Ressonància magnètica nuclear (RMN)-----	135
	<b>RESULTATS</b> -----	<b>137</b>
1.	Obtenció del còsmid recombinant cosFGR2-----	139
1.1	Fenotips conferits pel còsmid cosFGR2-----	139
1.2	Estudi dels sucres neutres per Cromatografia de gasos presents en el LPS de les soques NM554 supercos i NM554 cosFGR2-----	141
1.3	El còsmid cosFGR2 conté una regió homòloga a la regió <i>waa</i> d' <i>E. coli</i> -----	141
2.	Estratègies de seqüenciació i anàlisi de la seqüència-----	143
2.1	Subclonatge i seqüenciació de l'insert del plàsmid pSKF41-----	143
2.2	L'operó <i>waaA</i> conté tres gens en <i>Serratia marcescens</i> -----	144
2.1.1	Característiques del gen <i>waaA</i> -----	145
2.1.2	Característiques del gen <i>waaE</i> -----	145
2.1.3	Característiques del gen <i>kdtB</i> -----	148
2.2	Característiques del gen <i>waaQ</i> -----	149
2.3	Característiques del gen <i>waaB</i> -----	150
2.4	Seqüenciació de la regió distal al cluster <i>waa</i> . Anàlisi de la seqüència-----	152
2.4.1	El gen <i>fpg</i> -----	153
2.4.2	Els gens <i>rpmG</i> i <i>rpmB</i> -----	154
2.4.3	El gen <i>radC</i> -----	156
2.4.4	Els gens <i>dfp</i> , <i>dut</i> i <i>tk</i> -----	157
2.5	Obtenció del clon (cosR11) que es superposa al cosFGR2-----	159
2.5.1	Reacció de PCR amb cebadors dissenyats utilitzant el cosFGR2 com a motllo-----	159
2.5.2	Subclonatge del còsmid cosR11: obtenció del plàsmid subR11-----	161
2.5.3	Estratègies de seqüenciació-----	162
2.5.4	Anàlisi de les seqüències-----	163
2.5.4.1	Espai intergènic entre <i>ΔwaaF</i> i el gen <i>waaQ</i> -----	164
2.5.4.2	Característiques del gen <i>waaQII</i> -----	164
2.5.4.3	Característiques del gen <i>waaG</i> -----	166



3	El gen <i>waaG</i> complementa un mutant R de <i>S. marcescens</i> 2170-----	169
3.1	Aïllament de bacteriòfags específics sobre <i>S. marcescens</i> N28b i 2170 O-----	169
3.2	Obtenció de mutants resistents als bacteriòfags-----	170
3.3	Obtenció del mutant R de <i>Serratia marcescens</i> 2170 4.2 M <sub>3</sub> -----	171
3.4	Caracterització del mutant per complementació amb diferents plàsmids-----	173
4	Identificació dels gens <i>waa</i> de <i>S. marcescens</i> responsables de la modificació del LPS en <i>E. coli</i> -----	175
4.1	Construcció de subclons-----	175
4.2	Fenotips conferits pels subclons en <i>E. coli</i> -----	177
4.2.1	Fenotips de resistència a la bacteriocina i de mobilitat en gels de poliàcrilamida SDS-PAGE. Estudis de composició-----	177
4.2.2	Estudis fenotípics en la soca NM554 que transporta dos plàsmids-----	181
4.3	Anàlisi mutacional del plàsmid pNP9-----	182
5	Modificacions produïdes pel gen <i>waaE</i> de <i>S. marcescens</i> en el LPS d' <i>E. coli</i> i de <i>Salmonella</i> -----	185
5.1	Efecte produït sobre mutants de <i>Salmonella</i> -----	185
5.1.1	Anàlisi química del LPS de la soca recombinant de <i>Salmonella</i> -----	186
5.2	Anàlisi química del LPS de les soques NM554 pWSK i NM554 pWSK1848-----	188
5.2.1	Determinació colorimètrica del contingut en Kdo, glucosamina i fosfat----	189
5.2.2	Determinació per Cromatografia de gasos del contingut en sucres neutres i àcids urònics-----	189
5.2.3	O-desacilació del LPS i anàlisi per MALDI-TOFF-----	190
5.2.4	Anàlisi per ESI-----	193
5.2.5	Anàlisi dels monosacàrids permetilats per Cromatografia de Gasos acoblada a Espectrometria de masses-----	194
5.2.6	Anàlisi dels LPS per HPAEC-----	195
5.2.7	Anàlisi del pic diferencial present en el LPS de la soca que transporta el gen <i>waaE</i> -----	196
5.2.8	Relació entre estructura i fenotips-----	197
6	Anàlisi química del nucli del LPS de <i>Serratia marcescens</i> -----	199
6.1	Característiques del LPS extret-----	199
6.1.1	Composició quantitativa del LPS sencer-----	200
6.2	Hidròlisi del LPS amb àcid acètic. Separació de les diferents fraccions-----	201
6.3	Caracterització per Cromatografia de Gasos de les fraccions poli i oligosacàridiques-----	203
6.4	Estudi de la primera fracció (NP09A)-----	204
6.5	Estudi de l'oligosacàrid corresponent al nucli del LPS. Separació per HPAEC-----	205
6.6	Anàlisi quantitativa de les fraccions que componen el nucli del LPS-----	206
6.7	Anàlisi per Espectrometria de Masses de les fraccions del nucli-----	207
6.8	Anàlisi per RMN-----	208
6.8.1	Anàlisi de la fracció A-----	211
6.8.2	Anàlisi de la fracció B-----	213
6.8.3	Anàlisi de la fracció C-----	213
6.8.4	Anàlisi de la fracció D-----	214

## DISCUSSIÓ

1	El cluster <i>waa</i> de <i>Serratia marcescens</i> . Comparació amb altres <i>Enterobacteriaceae</i> ----	217
2	El gen <i>waaE</i> -----	219
3	Fenotip de resistència a la bacteriocina 28b-----	220
4	Composició del nucli de <i>Serratia marcescens</i> . Comparació amb altres <i>Enterobacteriaceae</i> -----	222

<b>CONCLUSIONS</b> -----	231
--------------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFIA</b> -----	235
<b>ANNEX</b> -----	253
1 Annex I-----	255
2 Annex II-----	266

# Introducció

---

# 1. INTRODUCCIÓ

Les bactèries Gram negatives, que inclouen alguns patògens humans com ara *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Chlamydia pneumoniae*, expressen a la seva superfície diverses estructures amfifiliques incloent-hi antigens capsulars, lipoproteïnes, l'antigen comú de les enterobactèries (ECA) i els lipopolisacàrids (LPS). Dintre d'aquestes macromolècules, els LPS constitueixen un grup de gran rellevància tant a nivell microbiològic, immunològic i mèdic.

Els Lipopolisacàrids (LPS) constitueixen macromolècules amfifiliques situades en la membrana externa de les bactèries Gram negatives (Raetz C.,1990 i Rietschel ET.,1996). Els lipopolisacàrids participen en les funcions fisiològiques de la membrana de les bactèries i són essencials pel seu creixement i supervivència (Rietschel ET.,Brade L., Lindner B., Zähringer,1992). Els LPS constitueixen, alhora, el lloc d'actuació primari per la interacció amb antibacterians i components del sistema immune de l'hoste.

Una vegada alliberat de la superfície bacteriana o bé en forma aïllada, el LPS provoca una gran varietat d'activitats biològiques quan s'aplica a animals, humans o *in vitro*. Els lipopolisacàrids juguen un paper important en la patogenicitat i en la manifestació de les infeccions provocades per bactèries Gram negatives. Els lipopolisacàrids s'anomenen també endotoxines (Westphal O, *et al*, 1977) i constitueixen un dels agents més potents a l'hora d'induir reaccions inflamatòries locals o generalitzades tant en humans com en animals d'experimentació.

En les bactèries Gram negatives, la composició de la matriu lipídica de la membrana externa és extraordinàriament asimètrica respecte a l'estructura química i a les càrregues dels lípids que la componen. Així, la capa externa està constituïda per LPS i la capa interna, per una barreja de fosfolípids (Nikaido *et al.*, 1985). En *Escherichia coli* la capa externa està formada aproximadament per un 75% de LPS i un 25% de proteïnes transmembrana. (Figura 1)

Des d'un punt de vista químic, la molècula de LPS està formada per un heteropolisacàrid de característiques hidrofíliques unit covalentment a una part hidrofòbica anomenada lípidA, que és el responsable d'ancorar la molècula de LPS en la membrana externa. La part polisacàridica consisteix en la cadena O específica i en el nucli constituït per un oligosacàrid. El nucli es divideix al mateix temps en nucli intern i nucli extern. La cadena O específica constitueix l'antigen O que és la part més externa de la membrana externa i és, a més, l'antigen superficial dominant en les bactèries gram negatives. El lípid A està compost per un disacàrid de  $\beta$ -

glucosaminil-(1→6)- $\alpha$ -D-glucosamina fosforilat en les posicions 1 i 4' que uneix (en el cas de les *Enterobacteriaceae*) sis o set residus d'àcids grassos hidroxilats, units tant per enllaços ester com per enllaços amida. Per tant, les principals característiques que distingeixen les endotoxines dels lípids de membrana externa són, per una banda, la presència de grups hidroxil en posició 3 i els grups fosfats no substituïts en el lípid A i, en alguns casos, també en la regió sacarídica.

El lípid A lliure expressa les mateixes activitats característiques del LPS, tals com la pirogenicitat i la letalitat. Això indica, doncs, que el lípid A representa el "principi endotòxic" del LPS (Zähringer U, *et al.*, 1994).

Tant la funció com l'activitat de les endotoxines estan vinculades a aspectes de membrana. La funció de les endotoxines està relacionada amb la seva presència com a constituents majoritaris de la membrana externa de les bacteries Gram negatives. L'activitat està vinculada a la interacció amb la membrana cel·lular de l'hoste.

Els aïllaments clínics de les bacteries Gram negatives normalment posseeixen antigen O i s'anomenen "llises" (S, de l'anglès *Smooth*), a causa de la seva morfologia colonial (Mäkelä, P.H. *et al.*, 1984 ). Les soques que no posseeixen antigen O , incloent-hi totes les soques de laboratori d'*Escherichia coli* K-12, es descriuen com a rugoses (R, de l'anglès *Rough* ). En els dos casos, el LPS s'obté per extracció amb fenol-aigua (Westphal, O., 1952 ) o bé a través de fenol-cloroform-éter de petroli (Galanos, C., 1969 ) i en els dos casos també el LPS pot ser separat en gel d'electroforesi SDS-PAGE (Goldman, R.C., 1980). Aquest procediment resulta especialment útil per tal de determinar el número i la distribució de les repeticions de l'antigen O . En el cas dels LPS que no posseeixen antigen O aquest procediment permet separar parcialment les diferents espècies moleculars presents al nucli que difereixen en el número d'unitats de monosacàrid (Lesse, A. J. *et al.*, 1990). Les bandes individuals que es resolen no han de ser necessàriament homogènies.

Donada la seva naturalesa amfifílica, la microheterogenicitat i la limitada solubilitat, és difícil dur a terme anàlisis estructurals de la molècula de LPS intacta. A més, les molècules de LPS formen agregats tant en dissolvents polars com apolars (Rietschel, E.T., 1984 ) les propietats físiques dels quals encara no s'han caracteritzat per complet.

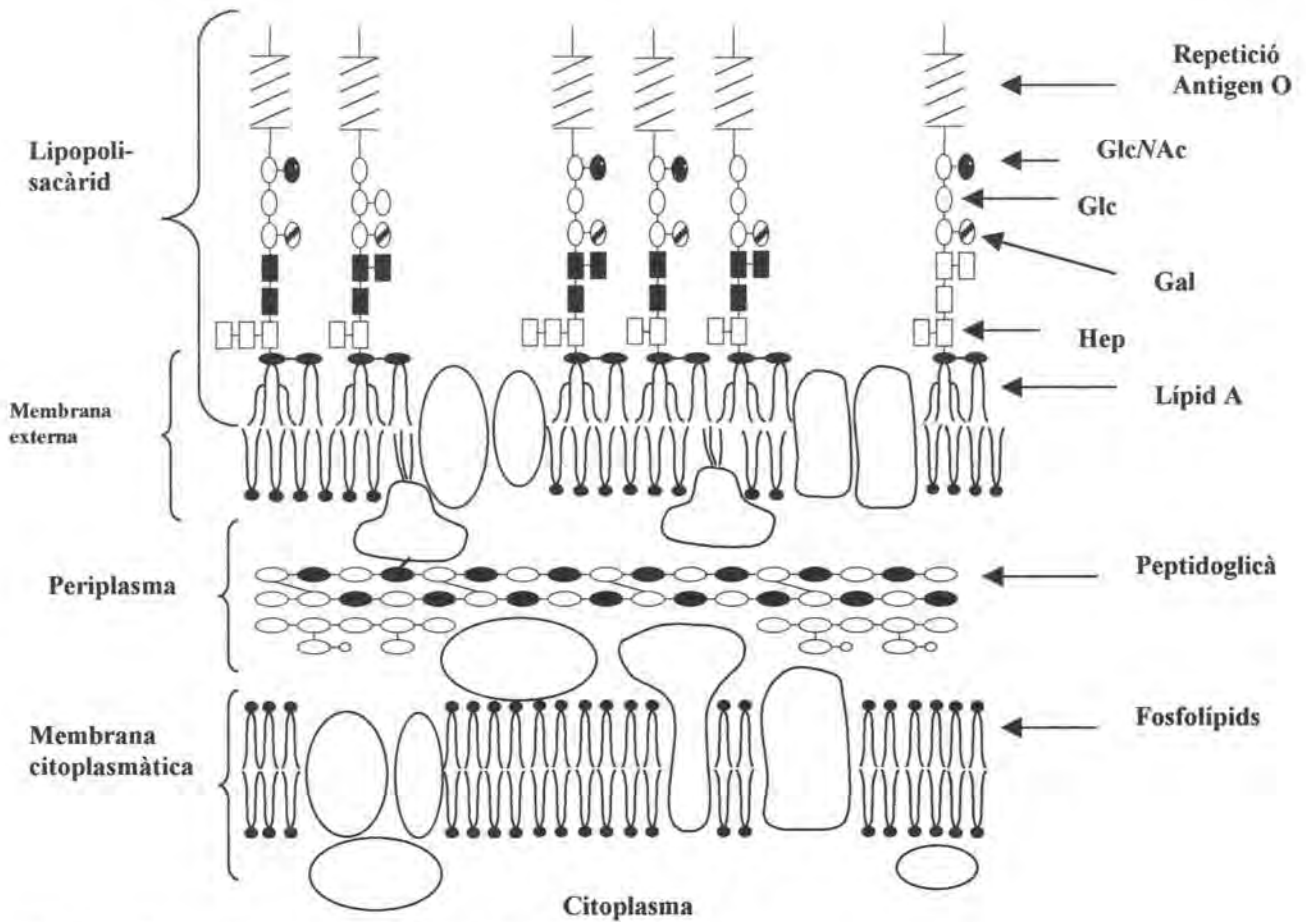


Figura 1. Organització de la membrana en *Escherichia coli* K-12.

Donat l'ampli espectre d'activitats, fisiològiques i patològiques, i el seu paper tan important en les bacteries, el LPS ha estat estudiat en molts laboratoris usant aproximacions genètiques, biològiques, immunològiques, químiques i físiques. Els models que es coneixen millor fins al moment són els corresponents a *Escherichia coli* i *Salmonella enterica*. Durant la dècada dels vuitanta i dels noranta s'han dut el terme el major número d'estudis sobre el LPS i comprenen els següents camps:

- Estudi del paper de les endotoxines en la reacció inflamatòria induïda per bacteries Gram negatives.
- Identificació del principi endotòxic, elucidació de la seva estructura i síntesi química.
- Estudis *in vivo* dels mecanismes de l'activitat endotòxica.
- Estudis sobre la interacció en els primers passos entre l'endotoxina i la cèl·lula hoste.
- Determinació genètica i aproximació a la biosíntesi del LPS.

## 2. BIOLOGIA DE L'ENDOTOXINA

Els mecanismes involucrats en l'activitat biològica de l'endotoxina es coneixen àmpliament ( Rietschel, E.T., 1996). Les bacteries Gram negatives alliberen l'endotoxina com a LPS lliure o bé acomplexat amb la proteïna de membrana externa OmpA (Morrison, D. C., 1987 ) quan es multipliquen, quan eliminen fragments de la membrana o quan moren sota l'exposició d'antibiòtics o del complement. La presència d'endotoxina circulant indueix en l'organisme hoste la producció de mediadors bioactius, responsables últims dels efectes observats durant l'endotoxèmia. El lípid A constitueix l'element essencial perquè aquests efectes tinguin lloc. El LPS (o també el lípid A), després d'associar-se a determinats factors del sèrum, pot ser neutralitzat o bé interaccionar amb receptors expressats per cèl.lules diana per al LPS, com ara granulòcits, limfòcits i, en particular, monòcits o macròfags. En resposta al LPS, aquestes cèl.lules formen i secreten mediadors endògens dotats de bioactivitats intrínseques que, en últim terme, indueixen els efectes típics de les endotoxines, que potencialment poden conduir al quadre clínic de xoc sèptic.

### 2.1 Molècules d'unió al LPS

Entre els factors humorals que interactuen amb el LPS destaquen les Lipoproteïnes d'alta densitat (HDL), que són capaces, a l'igual que les lipoproteïnes de baixa densitat, d'atenuar els efectes del LPS (Freudenberg,1980). Presenten propietats semblats la proteïna BPI (*Bactericidal permeability-increasin protein*) i la proteïna sCD14, forma soluble del receptor CD14 que uneix LPS. Quant a l'expressió de l'endotoxicitat, cal destacar la proteïna del sèrum LBP (*LPS binding protein*), la qual augmenta dràsticament l'activitat del LPS i del lípid A (Schumann,1990).

La proteïna LBP es sintetitza als hepatòcits i és secretada al torrent sanguini com a proteïna glicosilada de 58 kDa. La concentració normal de LBP en un sèrum normal és de 14-22 µg/mL, podent arribar fins a 200µg/mL després d'una inducció de 24 hores. La seqüència del gen que codifica per la LBP, tant en humans com en conills, indica que existeix un domini en la regió N-terminal que uneix LPS. Aquesta regió es caracteritza per l'acumul d'aminoàcids carregats positivament i expressa propietats hidrofòbiques. La proteïna LBP posseix un 44% de similitud de seqüència amb la proteïna humana BPI.

Un domini d'unió al LPS semblant està present en la proteïna ENP, present en l'hemolimf de *Limulus polyphemus* (Hoess A., 1993 ).

L'activitat biològica de la proteïna LBP es basa en la seva capacitat per transportar lípids carregats negativament com ara fosfatidilserina i el LPS. La proteïna LBP interacciona amb els agregats de LPS per alliberar molècules úniques de LPS o petits agregats i transportar-los cap al sistema de membrana de les dianes cel.lulars. La proteïna LBP s'ha d'entendre com un amplificador biològic, que permet a l'hoste detectar petites quantitats de LPS, indicant la invasió per bacteries Gram negatives. L'hoste, per tant, utilitza els complexos LPS/LBP per activar el seu sistema de defensa i afrontar, així, la invasió del microorganisme.

S'ha demostrat que la proteïna LBP no només transfereix LPS als receptors CD14 sinó també a les proteïnes HDL, neutralitzant per tant l'efecte del LPS. Donat, però, que ratolins deficients en LBP són resistents al LPS, sembla que l'efecte augmentador preval sobre l'efecte neutralitzador. El paper del receptor CD14 com a receptor del LPS va ser descobert l'any 1990 (Wright *et al.*, 1990 ). Es va observar que la proteïna CD14 servia com a lloc d'unió al LPS unit a la proteïna LBP. La unió del LPS als CD14 té lloc a través del lípid A.

La proteïna CD14 no és una proteïna transmembrana sinó que està unida a la superfície cel.lular a través de la proteïna GPI. Donat que aquest tipus d'unió a la membrana no permet la transducció del senyal directament, el mecanisme pel qual es produeix l'activació a través de la unió del complexe LPS/LBP als CD14 encara no es coneix. S'ha suggerit que les molècules de LPS són conduïdes a les cèl.lules diana a través de la proteïna LBP i allà s'associen als receptors CD14, el qual podria mediar la interacció del LPS amb un segon receptor, desconegut encara, que sigui capaç de transduir el senyal fins a l'interior cel.lular. Per altra banda, s'ha observat que les proteïnes CD11c i CD18 poden actuar com a receptors de l'endotoxina i són capaços de transduir el senyal en absència de CD14.

La proteïna CD14 també existeix com a forma soluble (sCD14). sCD14 és capaç d'interaccionar directament amb el LPS. El complexe sCD14-LPS s'uneix a cèl.lules que no posseeixen CD14 en les seves membranes (les cèl.lules endotelials) activant-les per la producció de citokines (Arditi, 1993 i Loppnow, 1995 ).

Els monòcits poden ser activats també per altres immunomoduladors d'origen bacterià com ara el peptidoglicà, el lipoarabinomanà, etc. En aquests casos, l'activació es dona per via de la proteïna mCD14.

Per altra banda, els requeriments estructurals exactes per la interacció amb la proteïna mCD14, l'activació cel.lular i la secreció de citokines encara no es coneix. Alguns estudis han demostrat que altres immunomoduladors com ara el peptidoglicà o el lipoarabinomanà activen els monòcits



a través de la interacció amb mCD14. Sembla que els residus en la configuració D-gluco o D-mano podrien estar-hi involucrats (J. M. Cavaillon, 1995 ).

## ***2.2 Dianes cel.lulars del LPS***

Les cèl.lules diana més importants de l'endotoxina són components del Sistema immune cel.lular. Les cèl.lules de defensa de la majoria d'organismes són capaces de reconèixer petites quantitats de LPS, identificant així la invasió per microorganismes.

Quatre tipus cel.lulars diferents poden reconèixer el LPS : leucòcits polimorfonuclears (PMN), limfòcits B i T, monòcits o macròfags i cèl.lules vasculars (cèl.lules endotelials o cèl.lules de la musculatura llisa). Les formes de resposta també són diferents: fagocitosi, diferenciació, proliferació o secreció de mediadors.

Els leucòcits polimorfonuclears (PMN) fagociten bacteries i fragments de membrana bacteriana, incloent-hi el LPS. La seva capacitat fagocitària està incrementada pel LPS. Així, la propietat del LPS per incrementar la capacitat fagocitària posa de relleu la importància del LPS en els primers passos inespecífics del sistema de defensa de l'hoste. A més, els PMN contenen proteïnes policatiòniques que, com la BPI, són capaces d'interaccionar amb el LPS. Així, els PMN, activats pel LPS, es poden unir a cèl.lules endotelials, causant danys al teixit i penetrant a través de la paret dels vasos sanguinis als teixits. Aquest procés contribueix substancialment a les reaccions inflamatòries induïdes per l'endotoxina.

Els limfòcits B, per la seva banda, són estimulats pel LPS, produint proliferació, diferenciació i secreció d'anticossos. Aquesta activació policlonal es considera com un dels primers mecanismes de defensa de l'hoste envers els microorganismes patògens. També els limfòcits T (TH1) són activats pel LPS, proliferant i secretant limfoquines. En particular, secreten interferó  $\gamma$  (IFN).

Els monòcits i els macròfags tissulars s'activen a través del LPS produint una gran varietat de mediadors bioactius de tipus proteic com ara: interleucina IL-1, IL-6, IL-10, IL-12; factor inhibidor de la migració dels macròfags i factor de necrosi tumoral  $\alpha$  (TNF). Moltes cèl.lules de l'hoste contenen receptors per aquests mediadors i són capaces de respondre, per exemple, a través de quimiotaxi, apoptosi, etc. Si les quantitats secretades d'aquests mediadors són baixes es produeix l'eliminació i la inactivació dels microorganismes. Si hi ha sobreproducció, però, aquests mediadors esdevenen un perill per l'hoste causant dany a les cèl.lules i als òrgans. Per tant, pot desembocar en un xoc irreversible.

A més, els macròfags en ser estimulats pel LPS produeixen espècies reduïdes de l'oxigen (anió superòxid, peròxid d'hidrogen, radicals hidroxí, etc.) , metabolits bioactius de l'àcid araquidònic (prostaglandines, tromboxà, leucotriens), de l'àcid linoleic i PAF (Factor activador de plaquetes).

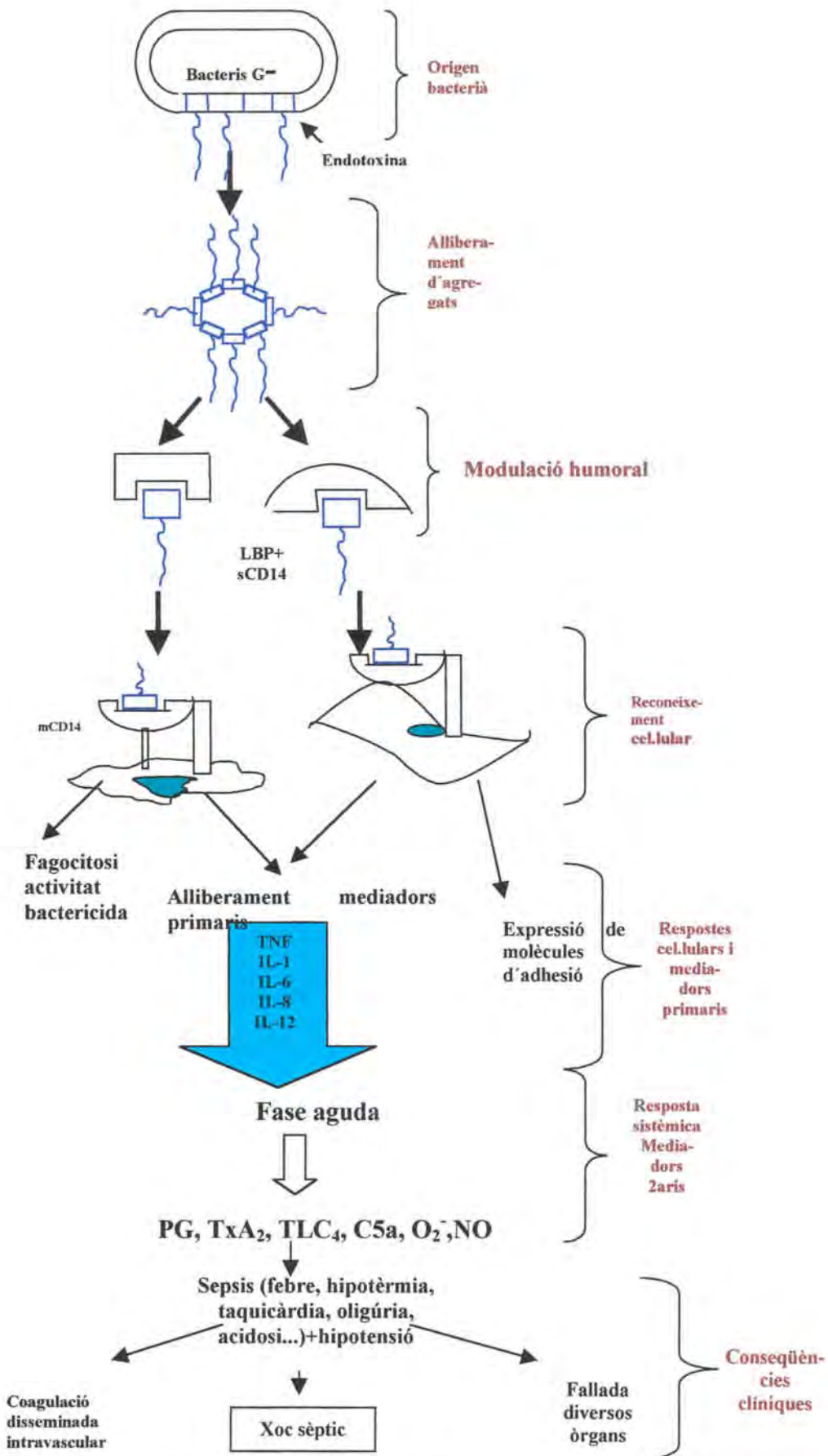
Finalment, les cèl.lules vasculars, com ara les cèl.lules endotelials o les cèl.lules musculars llises, tenen la capacitat de produir, sota l'estímul del LPS, mediadors de tipus proteic com ara les citoquines IL-1, IL-6 i IL-8. Aquestes cèl.lules produeixen, fins i tot, altres tipus de mediadors que inclouen la prostaciclina, òxid nítric, PAF i interferons . Per altra banda, el LPS també és capaç d'induir l'expressió de molècules d'adhesió, que donen lloc a l'adhesió dels PMN.

Els esdeveniments moleculars generats *in vivo* després de la injecció d'endotoxina o després de ser alliberat de la bactèria es resumeixen en la Figura 2.1.

La porció de LPS que no pot ser detoxificada pels components humorals (per exemple, BPI, o HDL) o per components cel.lulars de l'hoste (per exemple, PMN) interacciona amb les proteïnes LBP i/o sCD14. A conseqüència d'aquesta interacció, s'activen les dianes cel.lulars, que comprenen monòcits/macròfags, cèl.lules endotelials, granulòcits i limfòcits, produint l'alliberament de mediadors endògens o l'expressió de molècules d'adhesió.

Mediadors com TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN $\gamma$  són capaços d'activar les cèl.lules susceptibles (aquelles que expressen receptors per les citoquines), les quals produeixen mediadors secundaris com ara el PAF, LT, PG, espècies reduïdes de l'oxigen, òxid nítric i proteases (elastases i colagenasa), que indueixen l'adherència cel.lular i fan que les cèl.lules de defensa es congreguin en el lloc de la infecció.

Figura 2.1. Via humoral i cel·lular involucrada en el xoc sèptic induït per l'endotoxina.



Si la cascada de la reacció inflamatòria es manté en una àrea limitada, produeix efectes beneficiosos perquè ajuda a activar el sistema de defensa i a destruir els microorganismes invasors. En cas contrari, si hi ha una sobreproducció d'aquests mediadors i són alliberats al torrent sanguini, es pot produir una reacció inflamatòria sistèmica i situacions clínicament compromeses com ara el xoc sèptic.

Finalment, l'hoste pot reequilibrar aquesta hiperesposta amb la formació de mediadors antiflogístics com ara IL-10, TGF $\beta$  i PGE2. La hiperinflamació, per tant, pot anar seguida per una fase d'hiporesposta del Sistema immune en la qual la bactèria, a causa de l'absència de citoquines, pot multiplicar-se i mantenir la seva capacitat per induir reaccions tòxiques. El xoc sèptic, per tant, es pot considerar com el resultat d'un cercle viciós en què s'alterna la sobre i la sub producció de mediadors, més que com la conseqüència d'una cascada unidireccional.

### 3. QUÍMICA DEL LIPOPOLISACÀRID

#### 3.1 Estructura general del Lipopolisacàrid

La molècula del Lipopolisacàrid de la majoria de bactèries Gram negatives segueix el mateix principi estructural. Tal com es pot observar en la Figura 3.1, consisteix en una part polisacàridica unida covalentment a una porció lipídica, anomenada lípid A.

En el cas clàssic de la família de les *Enterobacteriaceae*, en les soques salvatges, el polisacàrid consisteix en dues regions: la fracció polisacàridica corresponent a l'antigen O, constituïda per la repetició d'una unitat bàsica, i la fracció oligosacàridica corresponent al nucli del Lipopolisacàrid. El nucli es pot dividir, alhora, en nucli intern i nucli extern. Aquestes tres regions es diferencien entre elles per la seva estructura química, el grau de conservació estructural, els principis de biosíntesi i els gens que codifiquen per la seva biosíntesi.

El lípid A de la família de les *Enterobacteriaceae* així com d'altres bactèries Gram negatives consisteix en un disacàrid de  $\beta$ -glucosaminil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-glucosamina fosforilat en les posicions 1 i 4' [4'-P-GlcN-(1 $\rightarrow$ 6)-GlcN-1 $\rightarrow$ P] que uneix cadenes d'àcids grassos a través d'enllaços ester i amida. La presència dels àcids grassos en el lípid A sembla ser essencial per l'anclatge de la molècula en la capa externa de la membrana externa. Per tant, el LPS es situa on habitualment es troben els fosfolípids en les membranes biològiques.

L'oligosacàrid corresponent al nucli i l'antigen O constitueixen la porció polisacàridica del lipopolisacàrid.

La variació en el número de repeticions en l'antigen O constitueix un dels motius de variabilitat en el LPS. Aquesta variabilitat es pot observar en analitzar mostres de LPS en gels de poliacrilamida i dodecil sulfat sòdic (SDS) o deoxicolat visualitzats amb tinció de nitrat de plata. S'observen llavors una sèrie de bandes de diferents pesos moleculars. Aquestes bandes corresponen a molècules de LPS que es diferencien en el número de repeticions de la unitat bàsica de l'antigen O. Les distàncies entre les bandes caracteritzen el tamany (i, per tant, el número de residus) de les unitats de repetició.

La mida de la unitat de repetició pot variar en funció de les diferents espècies i serotipus. Pot variar des d'un monosacàrid (per exemple, en el cas de *Legionella pneumophila* O:1) fins a vuit monosacàrids (en el cas de *Hafnia alvei*) (Katzenellenbogen, 1992). Fins a un total de 60 monosacàrids diferents s'han identificat com a constituents. A això, cal afegir-hi les modificacions per acilació, esterificació, fosforilació, eterificació i amidació, que contribueixen a incrementar la variabilitat d'aquestes estructures.

Alguns grups de bacteries Gram negatives han perdut la capacitat per produir parts de la cadena polisacàridica de LPS. La pèrdua de l'antigen O produeix un canvi de fenotip quan es fa créixer la bactèria en plaques d'agar i s'observa la morfologia de les colònies. Així, es pot distingir entre colònies llises si produeixen el nucli i l'antigen O complet. El LPS, en aquest cas, s'anomena de tipus S. Quan es sintetitza una sola repetició, el fenotip s'anomena semirugós i el LPS és de tipus SR. La pèrdua de l'antigen produeix el fenotip rugós i el LPS és de tipus R. En aquest cas, el nucli es pot trobar complet o incomplet.

La polidiversitat en l'antigen O està controlada genèticament. En els LPS de tipus S, el número de repeticions varia considerablement. Per *E.coli* O:111, el grau de polimerització s'ha determinat per anàlisis químiques i per gels de SDS-PAGE i s'ha trobat que pot variar de 1 a 40 repeticions. En el cas del LPS de tipus RS, amb una sola repetició, es troben *S. enterica* Typhimurium mutant SH777, *E.coli* O:111, *Shigella sonnei* phase I PHI2, *V.cholerae* O:139.

En *S.enterica*, el número de repeticions pot variar de 1 a 30. Malgrat tot, el LPS provinent de les *Enterobacteriaceae* pot contenir poblacions de molècules sense antigen O.

El mecanisme de regulació que controla la relació entre LPS de tipus R o S, encara no està ben establert. Per tant, la família *Enterobacteriaceae* i altres bacteries Gram negatives, poden tenir al mateix temps LPS de tipus R (lípid A i nucli) i LPS de tipus S (lípid A, nucli i antigen O).

Donat que els LPS de tipus R només hi ha nucli com a fracció polisacàridica, el contingut de lípid A del LPS de tipus R és més elevat que en el cas del LPS de tipus S. Per tant, quan es duu a terme el procés d'hidròlisi amb àcid acètic, en què es trenca la unió del lípid A amb la fracció polisacàridica, i després es corre a través d'una cromatografia per gel-filtració, s'obté la fracció corresponent a l'antigen més nucli i una fracció de tamany inferior corresponent a les formes R, és a dir corresponent al nucli del LPS. La fracció del nucli del LPS correspon a un conjunt d'oligosacàrids de diferent mida. L'heterogenicitat d'estructures que s'aïllen corresponents al nucli indica que en el procés de biosíntesi del nucli no sempre s'uneixen tots els residus. Es desconeixen encara els mecanismes de regulació de la biosíntesi del nucli que podrien explicar aquesta diversitat.

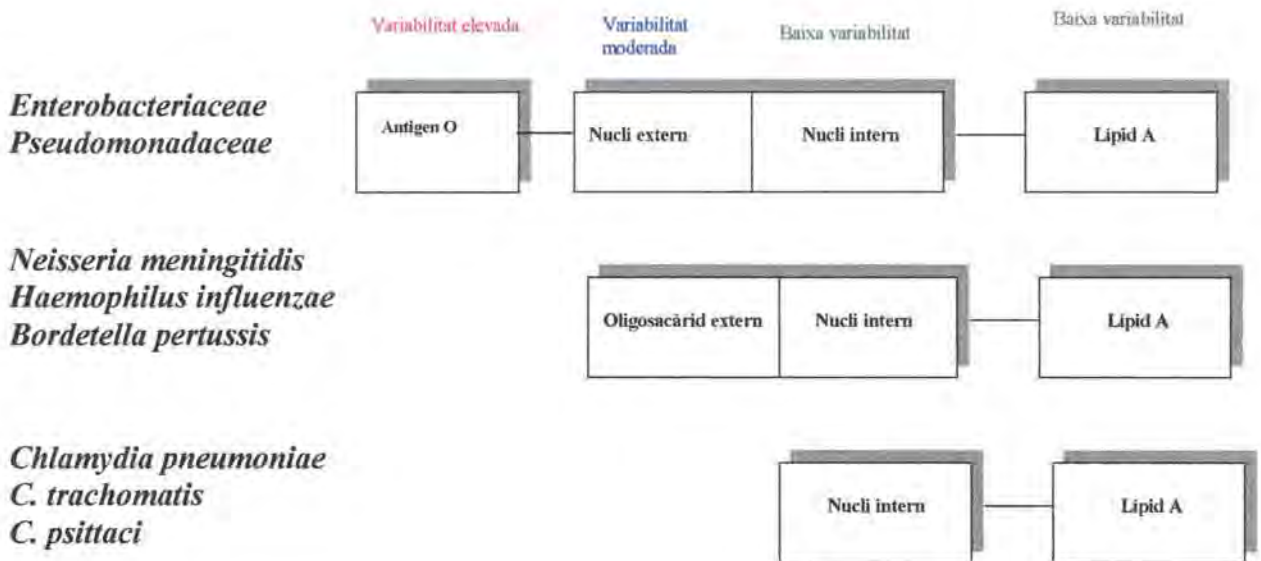
Tal i com es mostra a la figura 2, algunes bactèries, entre les quals s'inclouen patògens de la mucosa, expressen un LPS que està mancat d'antigen O. Entre aquestes bactèries, s'hi troben importants patògens com ara *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* i *Chlamydia* spp. En el cas de *Chlamydia* spp, el LPS consisteix només en lípid A i un nucli constituït per àcid 3-deoxi-D-manno-octulopiranosònic (Kdo).

Entre tots els gèneres de bactèries Gram negatives, la família *Enterobacteriaceae* i algunes espècies patògenes són les que s'han estudiat més extensament.

Des d'un punt de vista serològic es poden classificar les bactèries segons l'especificitat en els antigens O, K i H, que corresponen a diferents estructures d'antigen O, polisacàrids capsulars (CPS) i proteïnes flagel·lars, respectivament.

Alguns esquemes fets en *E.coli* (Ørskov, 1984), *Salmonella* (Kauffmann-White) i *Pseudomonas* (Habs, Fischer, Lanyi i IATS) cobreixen totes les espècies patògenes dels respectius gèneres i s'amplien constantment per nous serotips. A més, els progressos duts a terme en el camp microbiològic, bioquímic i genètic, així com en el camp químic i immunològic, milloren aquests esquemes constantment.

**Figura 3.1** Esquema de l'arquitectura del LPS de diverses bactèries Gram negatives.



### 3.2 ESTRUCTURA QUÍMICA DE L'ANTIGEN O

L'estructura de l'antigen O pot determinar la immunogenicitat de l'organisme i la sensibilitat al sèrum. Juntament amb l'antigen capsular, adhesines i toxines, l'antigen O determina la patogenicitat de l'organisme.

### 3.2.1 *Escherichia coli*

Les malalties associades a *E.coli* comprenen un ampli espectre de manifestacions clíniques. En països subdesenvolupats, *E. coli* representa la causa principal d'infeccions intestinals associades a una alta morbiditat i mortalitat en nens. En canvi, en països desenvolupats *E.coli* causa sovint infeccions extraintestinals de tipus nosocomial.

Actualment, les infeccions intestinals associades a *E.coli* es classifiquen en 4 grups: Enterotoxigèniques (ETEC), Enteroinvasives (EIEC), Enteropatogèniques (EPEC) i Enterohemorràgiques (EHEC). Entre les infeccions extraintestinals, *E.coli* és l'agent etiològic més freqüent en infeccions del tracte urinari, meningitis neonatal i bacterèmia.

Per tal de diferenciar entre *E.coli* intestinal i extraintestinal, s'ha dut a terme un serotipat basat en l'antigen O, l'antigen capsular K i l'antigen flagel·lar H. L'antigen O actua sovint com un potent immunogen induint títols alts d'anticossos específics.

Existeixen més de 150 serotips diferents en *E.coli*, els quals presenten diferents estructures d'antigen O. Alguns serotips, com ara el O:1, O:9 i O:20 estan dividits alhora en subgrups. La diferenciació per serotipat està basada en les diferències estructurals en l'antigen O i en les modificacions degudes a substituents O-alquil, O-acil, N-acil i fosfodièsters. La majoria d'antigen O estan constituïts per hexosaminoglicans tal i com es mostra en la Taula 3.1.

**Taula 3.1.** Estructura de les unitats de repeticició dels diferents serotips d'*E. coli*.

SEROTIP	ESTRUCTURA	REF.
O:7	$\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Quip4NAc-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$	L'vov, 1989
O:8	$3\text{-O-Me-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow [3)\text{-}\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow ]_n$	Jansson, 1985
O:9	$\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow [2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow ]_n$ n = 2 per <i>E.coli</i> O:9 n = 2 per <i>E.coli</i> O:9	Knirel, 1985
O:16	$\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Galf-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow$ 2   OAc	Jann, 1994 Stevenson, 1994
O:16 ( <i>E.coli</i> K-12)	$\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Galf-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNKAc-(1}\rightarrow$ 2   OAc 6 ↑ 1 α-D-Glcp	Stevenson, 1994
O:111	$\alpha\text{-Colp}$ 1 ↓ 6 $\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalpNAc-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$ 3 ↑ 1 α-Colp	Eklund, 1987



Hi ha, però, excepcions com ara els serotips O:8 i O:9, que constitueixen homopolímers no ramificats de D-Man, contenint només enllaços  $\alpha$ -(1→2) i  $\alpha$ -(1→3). Cal destacar que el serotip O:8 està metilat en la manosa terminal. La importància biològica de la O-metilació encara no està aclarida. Els serotips O:8 i O:9, en combinació amb antigens capsulars definits, es troben sovint en soques ETEC, agents causals de diarrees endèmiques (Ørskov, 1984).

Els serotips O:7 i O:16 corresponen als microorganismes que causen meningitis neonatal. A més, però, *E. coli* O:7 causa infeccions en el tracte urinari i bacterèmia. Malgrat això, no s'han trobat relacions estructurals ni de funció entre els dos serotips que expliquin la freqüència en què es troben causant infeccions extraintestinals.

### 3.2.2 *Salmonella enterica*

*Salmonellae* representa un grup divers de microorganismes intestinals dels vertebrats.

*S. enterica* serovar A (Paratyphi), B (Typhimurium) i D (Enteritidis i Typhi) posseeixen una cadena principal glicosídica comuna com a antigen O i es diferencien únicament pels substituents (Taula 3.2). El serovar A expressa 3,6-dideoxi- $\alpha$ -D-ribo-hexosa (paratosa, Par), el serovar B expressa 3,6-dideoxi- $\alpha$ -D-xilo-hexosa (abequosa, Abe) i el serovar D expressa 3,6-dideoxi- $\alpha$ -D-arabino-hexosa (tivelosa, Tyv). Totes les 3,6-dideoxi-hexoses (D-ddHex) estan unides a la D-Man de la cadena principal per enllaç (1→3). En el cas dels serovars A i B, la D-Gal de la cadena principal està substituïda per D-Glc.

Mentre que la majoria d'antigens O de *S. enterica* estan codificats genèticament pel cluster *whb* en el cromosoma, el serotip O:54 de *S. enterica* serovar Borreze necessita funcions que es troben codificades en un plàsmid. L'estructura d'aquest antigen consisteix en un homopolímer de D-ManNAc que alterna les unions (1→3) amb les (1→4).

**Taula 3.2** Estructura de les unitats de repetició de l'antigen O en *S. enterica*.

SEROVAR	ESTRUCTURA	REFERÈNCIA
	$  \begin{array}{ccc}  [-\rightarrow 2)-\alpha\text{-D-Manp}-(1\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Galp}-(1\rightarrow)_n & & \\  \begin{array}{ccc}  3 & & X \\  \uparrow & & \uparrow \\  1 & & 1 \\  \alpha\text{-D-ddHex} & & \alpha\text{-D-Glcp}  \end{array}  \end{array}  $	
	$  \begin{array}{ccc}  \alpha\text{-D-ddHex}^a & & X  \end{array}  $	
Paratyphi (A)	Par 4	Lüderitz, 1966
Typhimurium (B)	Abe 4 o 6	Kenne, 1983 Reeves, 1994
Typhimurium (B)	Abe, 2-O-Ac-Abe 4	Kenne, 1983 Reeves, 1994
Typhimurium (B)	Abe o 2-O-Ac-Abe 6	Kenne, 1983 Lüderitz, 1966 Reeves, 1994
Enteritidis (D1)	Tyv sense Glc	Kenne, 1983 Galanos, 1983
Typhi (D1)	Tyv 4	Jann, 1984 Lüderitz, 1966
Borzeze (O:54)	$-\rightarrow 3)-\beta\text{-D-ManpNAc}-(1\rightarrow 4)-\beta\text{-D-ManpNAc}-(1$	Keenleyside, 1994

### 3.2.3 *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* representa un patogen oportunista que pot causar septicèmia, pneumònia i infeccions del tracte urinari en humans. Els seu LPS constitueix un important factor de virulència i pertany a un complex tòxic format, a més, per CPS i proteïnes. Aquest complex s'allibera durant la infecció i causa danys característics als teixits del sistema respiratori.

Químicament, l'antigen O dels serotips més importants (O:1, O:2 i O:8) conté unitats de repetició senzilles constituïdes per Galp i D-Galf així com per D-GlcpNAc i D-Galf tal i com es mostra a la Taula 3.3. El Galactà I representa un polisacàrid regular constituït per D-Galf i D-Galp i es troba en els serotips O:1, O:2 i O:8. El Galactà II, per contra, està constituït exclusivament per residus de D-Galp units per enllaç (1→3). En els serotips O:8, O:2(2a,2e) i O:2(2a,2e,2h) el Galactà I es troba parcialment O-acetilat. En el serotip O:8, l'acetilació es dona en els grups hidroxil en posició 2 i 6 del residu de D-Galf. Els serogrupos O:2(2a,2e) i O:9

posseeixen el mateix polímer ramificat de Galactà ( una ramificació per cada dues unitats de repetició del Galactà I). El Galactà en el serotip O:2(2a,2e,2h) posseeix una ramificació per una unitat de repetició de Galactà I. Aquests exemples mostren com les bacteries poden variar la seva cadena d'antigen O a través de petites modificacions, donant lloc a nous serotips.

**Taula 3.3** Estructura de les unitats de repetició de l'antigen O de *Klebsiella pneumoniae*.

SEROTIP	ESTRUCTURA	REF.
O:1	D-Galactà I [ $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3) $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ ] i D-Galactà II [ $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3) $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ ]	Kol, 1992 Kelly, 1993 Whitfield, 1991
O:8	D-Galactà II	Kol, 1992 Kelly, 1993 Whitfield, 1991
O:2a ,2b	D-Galactà I i un substiuent desconegut responsable de la reactivitat 2b	Whitfield, 1992
O:2a,2c	D-Galactà I i $\rightarrow 5$ )- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$	Whitfield, 1992
O:2 (2a,2e) O:9	$\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3) $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3) $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2 ↑ 1 $\alpha$ -D-Galp	Maclean, 1993 Whitfield, 1992
O:2 (2a, 2e, 2h)	3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3) $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2 ↑ 1 $\alpha$ -D-Galp (67%)	Whitfield, 1992

### 3.2.4 *Serratia marcescens*

En *Serratia marcescens* s'han identificat les estructures primàries per 29 serotips diferents. La majoria d'estructures d'aquests serotips van ser descrites per Wilkinson en la dècada dels vuitanta. L'últim serotip, O:29, va ser descrit per Holst l'any 1997.

El tamany de les unitats de repetició pot variar d'un a set residus. Els monosacàrids que les componen solen ser força comuns: pentoses, hexoses, 6-deoxi-hexoses, N-acetilaminosucres i àcids urònics. També hi ha grups O-acetil (serotips O:4, O:5, O:6, O:7 i O:14) i àcid pirúvic i làctic (O:4 i O:18, respectivament). Tant polímers neutres (O:1, O:4, O:10, O:16, O:27 i O:28) com polímers àcids (O:2, O:6, O:13, O:23) procedents d'extractes de LPS han estat caracteritzats. Alguns serotips de *S. marcescens* (O:2, O:4, O:13, O:15) expressen tant polímers neutres com polímers àcids. Es creu que els polímers àcids deriven de l'antigen capsular K (Aucken, 1997 ). *S. marcescens* O:16 expressa dos polímers neutres, el D-Galactà (idèntic al D-Galactà de *K. pneumoniae* O:1) i un homopolímer de D-Ribf (Oxley, 1989 ).

La variació en l'especificitat a través de l'expressió de dos tipus de cadenes d'antigen O és força inusual i s'ha identificat també en el LPS de *Burkholderia* (Cox,1995) i *Acinetobacter* (Haseley, 1997).

La soca *Serratia marcescens* N28b, utilitzada en aquest treball, pertany al serotip O4, l'estructura del qual va ser descrit per Oxley i Wilkinson l'any 1988. En la Taula 3.4 es resumeixen les diferents estructures per a cada un dels serotips.

**Taula 3.4** Estructura de les unitats de repetició de l'antigen O de *Serratia marcescens*.

SEROTIP	ESTRUCTURA	REF.	
O1	$\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)-\beta\text{-D-GlcNAc-(1}\rightarrow$	Furn i Wilkinson, 1985.	
O2 O3	$\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-GlcNAc-(1}\rightarrow 4)-\beta\text{-D-ManNAc-(1}\rightarrow$	Oxley i Wilkinson, 1992.	
O4	OAc ↓ 2	$\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Glc-(1}\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow$	Oxley i Wilkinson, 1988.
O5	OAc ↓ 2	$\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Glc-(1}\rightarrow$	Oxley i Wilkinson, 1988.
O6 O7	OAc ↓ 2	$\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Glc-(1}\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow$	Brigden, 1985 Oxley i Wilkinson, 1988.
O8	$\beta\text{-D-GlcNAc}$ 1 ↓ 3	$\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Glc-(1}\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Gal-(1}\rightarrow 3)-\beta\text{-D-GlcNAc-(1}\rightarrow$	Oxley i Wilkinson, 1986.
O9		$\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)-\beta\text{-D-GalNAc-(1}\rightarrow$	Oxley i Wilkinson, 1987.
O10	$\alpha\text{-D-Glc}$ 1 ↓ 4	$\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-GlcNAc-(1}\rightarrow 2)-\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 2)-\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow$	Oxley i Wilkinson, 1989.
O12 O14		$\rightarrow 2)-\beta\text{-D-Ribf-(1}\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-GalpNAc-(1}\rightarrow$	Brigden, 1985 Bridgen i Wilkinson, 1983.
O15		$\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)-\beta\text{-D-GalNAc-(1}\rightarrow$	Oxley i Wilkinson, 1988.
O16		$\rightarrow 2)-\beta\text{-D-Ribf-(1}\rightarrow$	Oxley i Wilkinson, 1989.
O16* (+O20)		$\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Gal-(1}\rightarrow$	Oxley i Wilkinson, 1989.

O17	→3)-α-L-Rha-(1→3)-β-D-GlcNAc-(1→	Oxley i Wilkinson, 1990.
O18	→6)-α-D-GlcNAc-(1→2)-α-L-Rha-(1→2)-α-L-Rha-(1→2)-α-L-Rha-(1→	Oxley i Wilkinson, 1989.
O19	→4)-α-L-Rha-(1→3)-β-D-GlcNAc-(1→	Oxley i Wilkinson, 1990.
O21	→4)-α-D-Glc-(1→4)-β-D-ManNAc-(1→	Oxley i Wilkinson, 1991.
O22	→3)-α-D-GlcNAc-(1→2)-α-L-Rha-(1→2)-α-L-Rha-(1→2)-α-L-Rha-(1→	Oxley i Wilkinson, 1990.
O23	→4)-α-L-Rha-(1→4)-β-D-GalNAc-(1→	Oxley i Wilkinson, 1990.
O24	$\begin{array}{c} \alpha\text{-D-Gal} \\   \\ \downarrow \\ 4 \\ \rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-D-Gal-(1}\rightarrow \end{array}$	Oxley i Wilkinson, 1989.
O26	→3)-α-L-Rha-(1→3)-β-D-GalNAc-(1→	Aucken, 1995.
O27	→4)-α-D-Glc-(1→3)-α-L-Rha-(1→	Oxley i Wilkinson, 1991.
O28	3)-β-D-Man-(1→2)-α-D-Man-(1→2)-α-D-Man-(1→	Oxley i Wilkinson, 1991.
O29	→6)-α-D-GlcNAc-(1→2)-α-L-Rha-(1→2)-α-L-Rha-(1→2)-α-L-Rha-(1→	Holst, 1997.

\*dos polisacàrids neutres identificats en la soca IP687 pertanyent al serotip O16.

### 3.2.5 *Shigella spp*

Dintre del gènere de *Shigella*, s'han identificat més de 42 serotips, 14 per *Shigella flexneri*, 12 per *Shigella dysenteriae*, 15 per *Shigella boydii* i un per *Shigella sonnei*.

Les diferents estructures es caracteritzen per posseir aminusucres, hexoses comunes i àcids urònics en la unitat de repetició. La cadena en *Shigella flexneri* posseeix una cadena principal formada per (L-Rha)<sub>3</sub>-D-GlcNAc. La variació en els serotips és deguda a diferents ramificacions amb una o dues unitats de D-Glc i a la O-Acetilació.

En *Shigella dysenteriae*, en canvi, no se segueixen regles tan senzilles. Això indica que hi ha una diversitat genètica més gran en aquesta espècie. En *Shigella sonnei* es troben sucres poc comuns com ara 2,4-diamino-2,4,6-trideoxi-D-galactosa (D-FucNAc<sub>4N</sub>).

En general, però, tant en *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* i *Shigella spp*, l'accessibilitat a precursors de biosíntesi disponibles constitueix una de les bases per crear, en aquestes espècies, una diversitat estructural i serològica en l'antigen O.

### 3.2.6 *Yersinia spp*

El gènere *Yersinia* comprèn patògens humans com ara *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* i *Yersinia pseudotuberculosis*.

Serològicament, *Yersinia enterocolitica* ha estat subdividida en 34 serotips diferents. El serotip O:3 es caracteritza per un homopolímer de 6-deoxi- $\beta$ -L-altropiranososa (L-6d-Alt) (Taula 3.5)

El serotip O:9 expressa un homopolímer amb una unitat de repetició composta per un sol monosacàrid de 4-*N*-formil-D-perosamina (4,6-dideoxi-4-formamido- $\alpha$ -D-manosa). Aquesta estructura s'ha trobat també en l'antigen O de *Vibrio cholerae*. Comú a altres serotips (O:4, O:32, O:5, O:27, O:8 i O:10) és la presència d'un o més deoxisucres, indicant un paper important en les modificacions hidrofíliques/hidrofòbiques de l'antigen O.

L'antigen O en *Yersinia pseudotuberculosis* consisteix en un polímer neutre i ramificat de hexosamina amb unitats de repetició de quatre a cinc monòmers.

**Taula 3.5** Estructura de les unitats de repetició de l'antigen O en *Yersinia enterocolitica*.

SEROTIP	ESTRUCTURA	REF.
<i>Y. enterocolitica</i> O:1	$\rightarrow 2$ )- $\beta$ -6d-Alt-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -L-6d-Alt-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -L-6d-Alt-(1 $\rightarrow$	Gorshkova, 1985
<i>Y. enterocolitica</i> O:3	$\rightarrow 2$ )- $\beta$ -6d-Alt-(1 $\rightarrow$	Gorshkova, 1985

### 3.2.7 *Legionella pneumophila*

El gènere *Legionella* comprèn més de 40 espècies, les quals s'han inclòs en 61 serogrupos. La majoria no són patògens per l'home. *Legionella pneumophila*, però, és l'agent etiològic del leginèl·losi. *Legionella pneumophila* expressa només LPS de tipus S, amb bandes molt juntes, el que indica que les unitats de repetició són molt petites.

El serotip O:1 conté un homopolímer format per àcid 5-acetamidino-7-acetamido-8-O-acetil-3,5,7,9-tetradeoxi-L-glicero-D-galacto-nonulosònic. D'aquesta molècula cal destacar que no conté grups hidroxils lliures. Això confereix propietats hidrofòbiques a aquest polímer, que podrien estar involucrades en la patogenicitat de *Legionella pneumophila* a través de l'adherència a macròfags alveolars en la fase inicial de la infecció. També s'ha vist que si el grup O-acetil en posició 8 no està present, la reactivitat serològica front anticossos poli i monoclonals disminueix.

### 3.2.8 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* constitueix un dels agents causals de complicacions sèptiques postoperatòries i postraumàtiques. Causa pneumònia en pacients amb fibrosi quística i està associat a infeccions de la còrnia.

L'estructura de l'antigen O de molts serotips de *P. aeruginosa* segueix algunes regles. Els components típics de l'antigen O de *P. aeruginosa* són aminosucre acídics (mono- i diaminosucre) i aminosucre acídics (GalNA, ManNA). Les unitats de repetició contenen de 2 a 4 residus. Habitualment, l'antigen O conté modificacions per altres substituents (acetil, formil, hidroxibutiril).

Algunes soques de *P. aeruginosa* coexpressen dues formes diferents de LPS, que s'anomenen bandes A (LPS de tipus A) i bandes B (LPS de tipus B), segons el seu patró de bandes en anàlisi per SDS-PAGE. El LPS de tipus B conté un heteropolímer amb les característiques descrites anteriorment. El LPS de tipus A conté un homopolímer format per un trisacàrid de D-Rha amb enllaços (1→2), (1→3) i (1→3) (Taula 3.6). Donada la freqüència d'aparició aquest polímer es considera un antigen comú a la majoria de serotips.

**Taula 3.6** Estructura de les unitats de repetició de l'antigen O en *Pseudomonas aeruginosa*.

SEROTIP	ESTRUCTURA	REF.
Antigen comú de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	→3)-α-D-Rha-(1→3)-α-D-Rha-(1→2)-α-D-Rha-(1→	Rivera, 1989 Lam, 1989
<i>P. aeruginosa</i> O:5	→4)-β-D-ManNAc3NA-(1→4)-β-D-ManNAc3NAcA-(1→3)-α-D-FucNAc-(1→	Knirel, 1988

### 3.2.9 *Vibrio cholerae*

*Vibrio cholerae* és un importat patògen humà que causa diarrea i està associat a una alta mortalitat, especialment en països del tercer món.

En base a les diferències estructurals de l'antigen O, *V. cholerae* es classifica en O:1 i no-O:1. El grup O:1 es subdivideix en dos grans grups (Ogawa i Inaba) i el grup no-O:1 es subdivideix en O:2 i O:155. Està establert que *V. cholerae* O:1 expressa tres factors antigènics: el factor A, el factor B d'Ogawa i el factor C d'Inaba. Per tant, el grup Ogawa posseeix la fórmula antigènica AB i el grup Inaba, la fórmula AC.

L'antigen O dels grups Ogawa i Inaba són homopolimers constituïts per (1→2)-D-perosamina N-acetilada amb àcid 3-deoxi-L-glicero-tetrònic (Taula 3.7). En el cas d'Ogawa, l'extrem no reductor està metilat. Les bases estructurals que expliquen la reactivitat creuada entre els dos grups es fonamenten en la presència del factor A.

**Taula 3.7** Estructura de les repeticions de l'antigen en *V. cholerae*.

SEROTIP	ESTRUCTURA	REFERÈNCIA
O:1 Ogawa	3-O-Me- $\alpha$ -D-Rhap4NR-(1→[2]- $\alpha$ -D-Rhap4NR(1)] <sub>n</sub> → R=CH <sub>2</sub> OH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> OH(S)-CO-	Kenne, 1982 Guhathakurta, 1986
O:1 Inaba	$\alpha$ -D-Rhap4NR-(1→[2]- $\alpha$ -D-Rhap4NR(1)] <sub>n</sub> → R= CH <sub>2</sub> OH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> OH(S)-CO-	Kenne, 1982 Isshiki, 1995

### 3.3 Relació estructura-activitat en l'antigen O

L'antigen O determina les especificitats serològiques del LPS i constitueix un receptor per bacteriòfags. En molts casos, el bacteriòfag no reconeix solament una estructura determinada sinó que també una determinada conformació de la unitat de repetició (Linberg, A. A., 1983).

La conformació de l'antigen O també és importat en l'activació del complement i en la virulència de la bactèria. El LPS activa la via alternativa del complement C' a través de l'antigen O. Tot i això, l'eficiència de l'activació és depenent de l'estructura de les unitats de repetició. Anticossos, enzims i proteïnes del complement interaccionen específicament amb regions definides de l'antigen O. Per comprendre millor aquesta interacció, la conformació tridimensional de l'antigen O s'hauria d'elucidar en cada cas.

### 3.4 Estructura química del nucli del LPS

#### 3.4.1 Introducció

El nucli del LPS és un heterooligosacàrid sense unitats de repetició. L'oligosacàrid pertanyent al nucli, unit al lípid A, està present en totes les bactèries Gram negatives estudiades fins al moment.

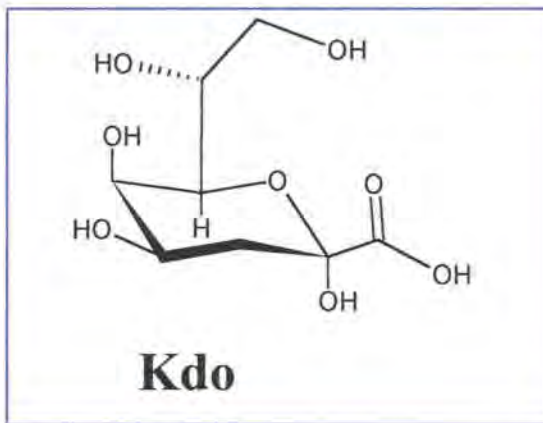


Tot i que s'ha observat que els mutants R són menys patògens que la soca parental S de la qual provenen, existeixen soques salvatges amb morfologia R altament patògenes per l'home. És el cas de *Bordetella pertussis*, *Bacteroides fragilis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Acinetobacter calcoaceticus* i la família *Chlamydiaceae*.

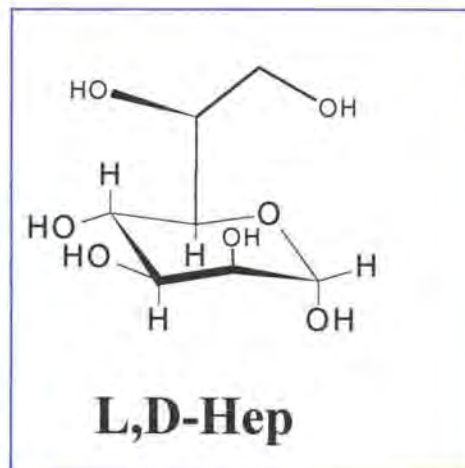
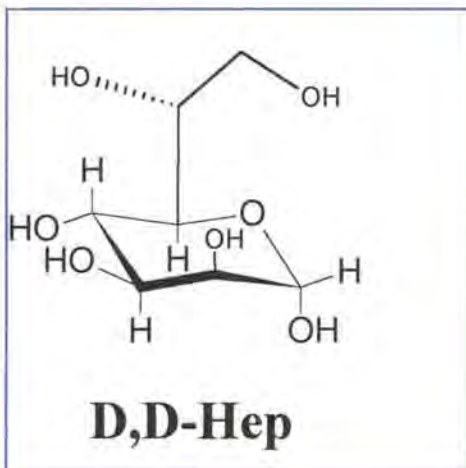
L'anàlisi de l'estructura del nucli del lipopolisacàrid de diferents bactèries és important per descobrir diferències en l'activitat biològica, especialment quant a les propietats immunològiques.

Una característica química del nucli és la presència de dos sucres:

**-àcid 3-deoxi-D-mano-octulopiranosònic (Kdo):**



**-Heptopiranososa.** Pot trobar-se en la configuració *L-glicero-D-mano* (L,D-Hepp) i *D-glicero-D-mano* (D,D-Hepp)



La D,D-Hep es considera un precursor de la L,D-Hep. La L,D-Hep es troba en la part proximal al lípid A que, especialment en *Enterobacteriaceae*, s'ha anomenat *nucli intern*. El *nucli extern*, en contrast, conté bàsicament hexoses.

Les unions del Kdo són extremadament sensibles a la hidròlisi àcida. S'ha trobat Kdo en tots els LPS, com a mínim una unitat unida al lípid A en el nucli intern. Les heptoses, però, no s'han trobat en tots els LPS. Normalment es troben adjacents al Kdo, tot i que també es troben a vegades en parts més distals del nucli i, fins i tot, en l'antigen O.

La variabilitat estructural del nucli entre espècies de la família de les *Enterobacteriaceae* és limitada. Així, en *Salmonella* només s'han identificat dos tipus diferents de nucli i en *E. coli*, cinc tipus diferents. En el grup de *Proteus* i gèneres relacionats i en *Citrobacter* s'han identificat cinc i quatre tipus de nucli, respectivament.

Les diferències estructurals entre els diferents nuclis són degudes principalment a la regió del nucli extern, mentre que el nucli intern està molt més conservat estructuralment. Donat que alguns bacteriòfags s'uneixen a la regió de l'antigen O i del nucli durant la infecció, és relativament senzill seleccionar mutants R amb estructures de LPS truncades. Així, és possible construir una classificació de subestructures de LPS, anomenades quimiotips. En molts casos aquests mutants no estan caracteritzats genèticament.

Comparat amb altres components del LPS, no es coneix molt sobre l'activitat i la funció del nucli extern. Tot i així, s'ha vist que el nucli extern està involucrat en les següents funcions/activitats:

- determina les especificitats del nucli.
- actua com a receptor del fags.
- està involucrat en la unió a limfòcits (Jirillo, 1990 ).

Quant al nucli intern, s'ha demostrat que la regió del Kdo té un gran importància per les activitats biològiques i les funcions de la molècula del LPS que, entre d'altres, són:

- conté l'epítot comú per anticossos i factors del sèrum ( Brade, 1987; Rozalski, 1989; Brade, 1985 ).
- modula l'activitat biològica del lípid A (Lüderitz, 1989 ). Mentre que està establert que el lípid A és essencial pels efectes endotòxics *in vivo* ( per exemple, la pirogenicitat, letalitat, etc.), el grau de bioactivitat del lípid A pot estar modulad per la fracció polisacàridica , en concret pel nucli intern. Per exemple, l'alliberament d'interleukina I i leucotrié C4 per cèl.lules mononuclears no es duu a terme pel lípid A si no conté fracció polisacàridica. Aquesta inducció sí que es produeix en mutants Re (contenen només lípidA i Kdo).

•és essencial per la viabilitat de la bactèria (Osborn, M. J, 1979 i Vaara, M *et al.*, 1979 ).

A continuació, es descriuen les estructures del nucli del LPS de diverses famílies i gèneres. Entre aquestes estructures, les que es coneixen millor pertanyen a les *Enterobacteriaceae* i, en concret, a *E. coli* i *Salmonella*.

### **3.4.2 El nucli del LPS en la família Enterobacteriaceae**

#### **3.4.2.1 Escherichia coli**

*E. coli* constitueix una de les espècies bacterianes més ben estudiades en termes bioquímics, (d'estructura química dels polisacàrids i proteïnes) microbiològics i genètics. La majoria dels estudis genètics han estat fets amb la soca K-12. Fenotípicament, *E. coli* K-12 és un soca amb morfologia R i posseeix un nucli complet. S'ha vist que dues mutacions independents es van produir en línies diferents de *E. coli* K-12. Les dues van donar com a resultat la pèrdua de l'antigen O (Liu, 1994 ).

En *E. coli*, s'han identificat cinc estructures diferents de nucli: el de l'*E. coli* K-12 i els oligosacàrids R1, R2, R3 i R4 (Taula 3.8 i Figura 3.2). Dintre dels aïllats clínics, el tipus R1 és el més freqüent (Appelmeik, 1994 ).

L'estructura del nucli intern és comuna a tots ells i està composta per Kdo i L,D-Hep. En *E. coli* K-12 W3100, existeix una substitució parcial en el Kdo II per un tercer residu de Kdo en posició 4 o per L-Rha en posició 5, que pot estar absent en les altres soques (Holst, 1990 i 1991). En el cas de la soca AB1133, que no posseeix L-Rha, el nucli K-12 consisteix en 3 oligosacàrids (OS1, OS2 i OS3), l'estructura dels quals es mostra en la Taula 3.8

L'OS1 representa l'oligosacàrid més petit. OS2 i OS3 contenen l'estructura d'OS1 però estan substituïts. En el cas d'OS2, està substituït pel disacàrid L- $\alpha$ -D-Hepp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ ). Aquests resultats estan d'acord amb els prèviament publicats per J.D. Klena (1992) on es demostrava la presència de tres bandes diferents en anàlisis per SDS-PAGE del LPS de la soca AB1133. En el nucli R2 la D-Gal pot estar present en lloc de la L-Rha.

El nucli extern està compost per 4 o 5 residus de D-Glc i D-Gal combinats de diferents maneres per cada tipus de nucli. El nucli extern per R2 i R3 està substituït per D-GlcNAc. Els nuclis R1 i

R3 estan substituïts per D-GlcNAc en la L<sub>3</sub>D-HepIII del nucli intern. El nucli intern està substituït en la posició 4 de l'HepI i HepII per fosfat i pirofosfoetanolamina.

**Taula 3.8** Estructura dels oligosacàrids del nucli del LPS d'*E. coli*.

QUIMI-OTIPS	ESTRUCTURA	REF.
K-12	<p><i>E. coli</i> W3100, W3110, AB1133</p> $R \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Glcp}(1 \rightarrow 3) - \alpha\text{-D-Glcp}(1 \rightarrow 3) - L\text{-}\alpha\text{-Hepp}(1 \rightarrow 3) - L\text{-}\alpha\text{-D-Hepp}(1 \rightarrow 5) - \alpha\text{-Kdo}$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 6 \\ \uparrow \\ 1 \end{matrix}</math> <p><math>\alpha\text{-D-Galp}</math></p> </div> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 7 \\ \uparrow \\ 1 \end{matrix}</math> <p><math>L\text{-}\alpha\text{-D-Hepp}</math></p> </div> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 4 \\ \uparrow \\ 2 \\ 5 \\ \uparrow \\ 1 \\ R^{1ad} \end{matrix}</math> <p><math>\alpha\text{-Kdo}(2 \rightarrow 4)^a - \alpha\text{-Kdo}</math></p> </div> </div> <p>OS1 R = H                      OS2 R = L-<math>\alpha</math>-Hepp-(1→6)-<math>\alpha</math>-D-Glcp-(1→                      OS3 R = <math>\beta</math>-D-GlcpNAc(1→7) - L-<math>\alpha</math>-Hepp-(1→6)-<math>\alpha</math>-D-Glcp-(1→</p>	Holst, 1991 Pakulski, 1991
R1	$\alpha\text{-D-Galp}(1 \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Galp}(1 \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Glcp}(1 \rightarrow 3) - L\text{-}\alpha\text{-D-Hepp}(1 \rightarrow 3) - L\text{-}\alpha\text{-D-Hepp}(1 \rightarrow 5) - \alpha\text{-Kdo}$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 3 \\ \uparrow \\ 1 \end{matrix}</math> <p><math>\beta\text{-D-Glcp}</math></p> </div> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 7 \\ \uparrow \\ 1 \\ 7 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-GlcpN}^a \end{matrix}</math> <p><math>L\text{-}\alpha\text{-D-Hepp}</math></p> </div> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 4 \\ \uparrow \\ 2 \end{matrix}</math> <p><math>\alpha\text{-Kdo}(2 \rightarrow 4)^a - \alpha\text{-Kdo}</math></p> </div> </div>	Jansson, 1979 Vinogradov, 1999
R2	<p><i>E. coli</i> EH100, F576</p> $\alpha\text{-D-Glcp}(1 \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Glcp}(1 \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Glcp}(1 \rightarrow 3) - L\text{-}\alpha\text{-D-Hepp}(1 \rightarrow 3) - L\text{-}\alpha\text{-D-Hepp}(1 \rightarrow 5) - \alpha\text{-Kdo}$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 2 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-GlcpNAc} \end{matrix}</math> </div> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 6 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-Galp} \end{matrix}</math> </div> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 7 \\ \uparrow \\ 1 \\ L\text{-}\alpha\text{-D-Hepp} \end{matrix}</math> </div> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 4 \\ \uparrow \\ 2 \\ 7 \\ \uparrow \\ 1 \\ R^{2ac} \end{matrix}</math> <p><math>\alpha\text{-Kdo}(2 \rightarrow 4)^a - \alpha\text{-Kdo}</math></p> </div> </div>	Holst, 1989 Jansson, 1979 Hämmerling, 1971
R3	$\alpha\text{-D-Glcp}(1 \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Glcp}(1 \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Galp}(1 \rightarrow 3) - \alpha\text{-D-Glcp}(1 \rightarrow 3) - L\text{-}\alpha\text{-D-Hepp}(1 \rightarrow 3) - L\text{-}\alpha\text{-D-Hepp}(1 \rightarrow 5) - \alpha\text{-Kdo}$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-GlcpNAc} \end{matrix}</math> </div> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 7 \\ \uparrow \\ 1 \\ 7 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-GlcpNAc}^a \end{matrix}</math> <p><math>L\text{-}\alpha\text{-D-Hepp}</math></p> </div> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 4 \\ \uparrow \\ 2 \end{matrix}</math> <p><math>\alpha\text{-Kdo}(2 \rightarrow 4)^a - \alpha\text{-Kdo}</math></p> </div> </div>	Müller-Loennies 1994 Jansson, 1979
R4	$\alpha\text{-D-Galp}(1 \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Galp}(1 \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Glcp}(1 \rightarrow 3) - \alpha\text{-D-Glcp}(1 \rightarrow \text{Nucli intern}^b)$ <div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 4 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Galp} \end{matrix}</math> </div> </div>	Feige, 1977

a: Substitució en quantitats no-estequiomètriques

R<sup>2c</sup>:  $\alpha$ -D-Galp en EH100

b: Estructura encara no elucidada per complet

<sup>d</sup>R<sup>1</sup>:  $\alpha$ -L-Rha en les soques W3100 i W3110

En la Figura 3.2 es mostra un esquema dels diferents quimiotips que s'han identificat en *E. coli*.

### 3.4.2.2 *Salmonella enterica*

*S. enterica* expressa dos oligosacàrids diferents:

- Ra, en el serovar Typhimurium (Minnesota), considerat fins fa poc com l'únic present en totes les *Salmonella*.
- Un nou oligosacàrid pertanyent al serovar Typhimurium (Arizonae IIIa O62), descrit recentment (Olsthoorn, 1998).

El nucli intern de *S. enterica* i *E. coli* està format pels mateixos monosacàrids. En el nucli extern, en canvi, la col.locació de les hexoses és diferent en els dos casos (Taula 3.9)

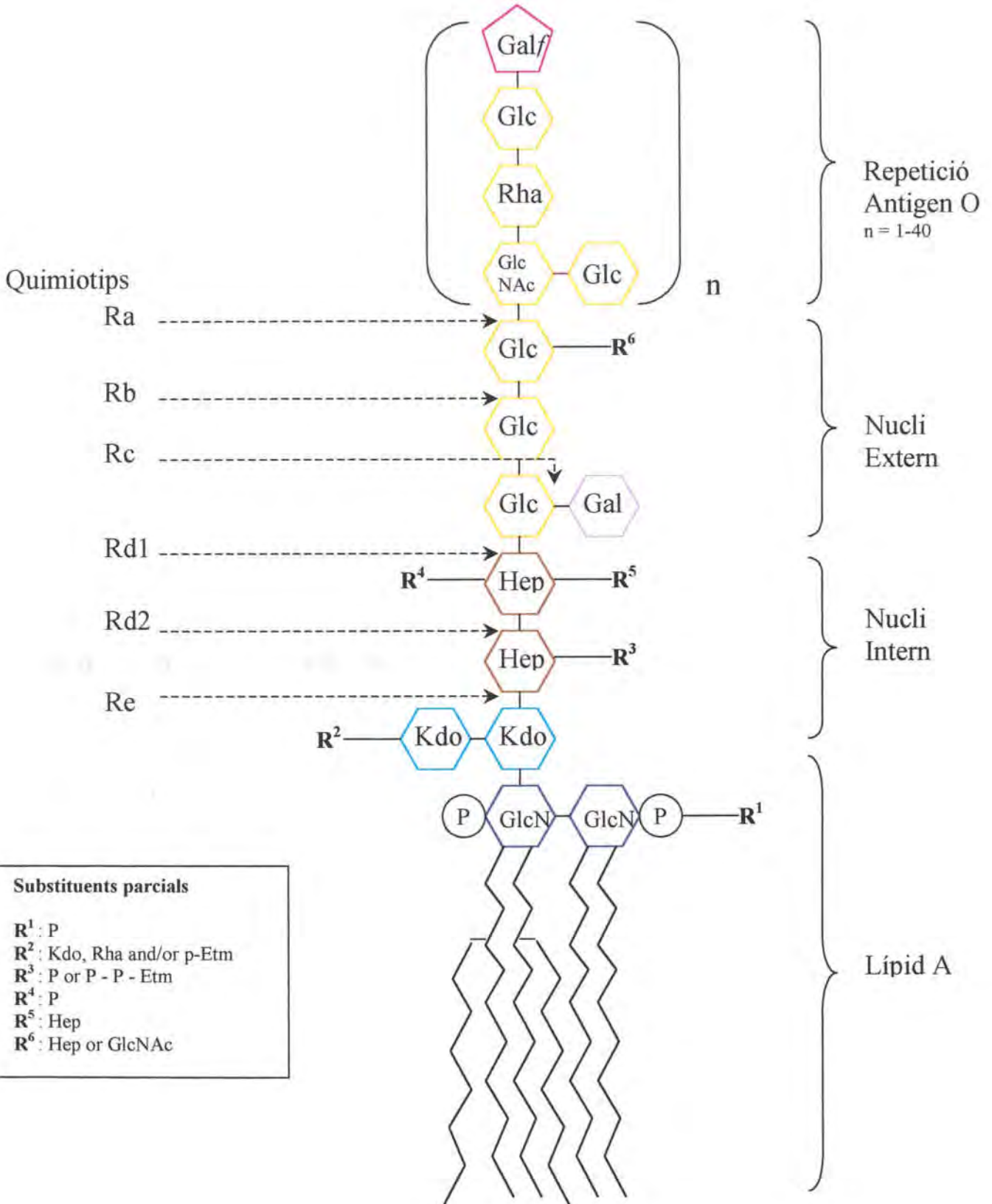
*S. enterica* conté la seqüència  $\alpha$ -D-Glcp-(1→2)- $\alpha$ -D-Galp-(1→3)- $\alpha$ -D-Glcp-(1→, comuna a R3 d'*E. coli*. Aquesta seqüència està substituïda per residus laterals de D-Gal i de D-GlcNAc. Aquestes dues substitucions són comunes a *E. coli* R2. *E. coli* R3 conté només la substitució de GlcNAc. En el nou oligosacàrid descrit en *Salmonella*, la D-GlcNAc no hi és present i en el seu lloc es troba Glcp $\alpha$ (1→2).

La regió del nucli intern també conté fosfats units a les Hep. Fosfat o pirofosfoetanolamina estan units a l'HepI i fosfat està unit a l'HepII.

En *S. enterica* s'ha obtingut una col.lecció de mutants R, la majoria obtinguts per resistència a bacteriòfags. Així, s'ha pogut descriure tota la sèrie de quimiotips a partir de l'estructura del nucli de *Salmonella enterica* Typhimurium sv. Minnesota. S'han descrit dels quimiotips Re, Rd2, Rd1, Rc, Rb3, Rb2, Rb1 i Ra.

En la Figura 3.3 es mostra un esquema del LPS de *Salmonella enterica* Typhimurium sv. Minnesota on s'indiquen els diferents quimiotips.

**Figura 3.2** Representació esquemàtica dels diferents quimiotips descrits en *E. coli*.

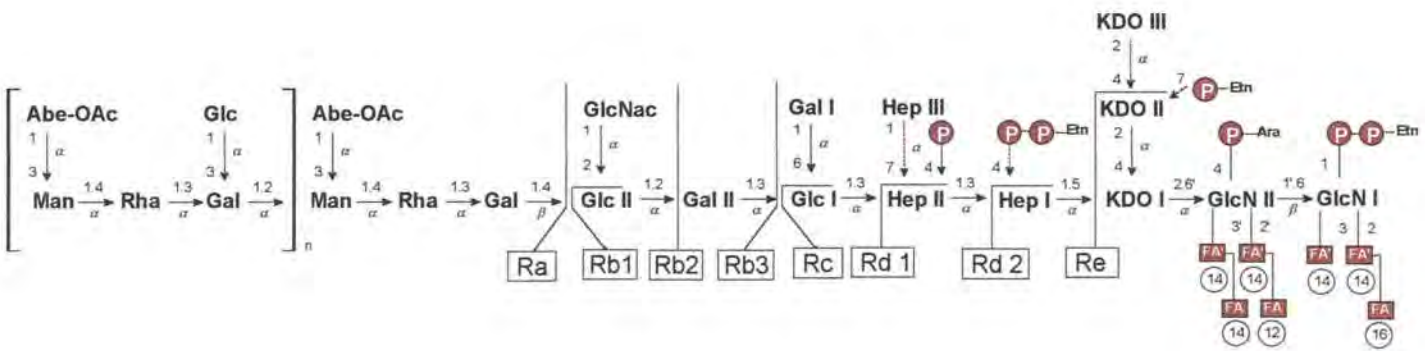


Taula 3.9 Estructura dels nuclis descrits en *Salmonella enterica*.

QUI MI-OTIP	ESTRUCTURA	REF.
Ra	<p><i>S. enterica</i> sv. Minnesota</p> <p>AgO→4)-α-D-Glcp-(1→2)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-Glcp-(1→3)-L-α-D-Hepp-(1→3)-L-α-D-Hepp-(1→5)- α-Kdo</p> <p style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 100px;">2</span> <span style="margin-right: 100px;">6</span> <span style="margin-right: 100px;">7</span> <span>4</span> </p> <p style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 100px;">↑</span> <span style="margin-right: 100px;">↑</span> <span style="margin-right: 100px;">↑</span> <span>↑</span> </p> <p style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 100px;">1</span> <span style="margin-right: 100px;">1</span> <span style="margin-right: 100px;">1</span> <span>2</span> </p> <p style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 100px;">α-D-GlcpNAc</span> <span style="margin-right: 100px;">α-D-Gal</span> <span style="margin-right: 100px;">L-α-D-Hepp</span> <span>α-Kdo-(2→4)<sup>a</sup>- α-Kdo</span> </p>	<p>Jansson, 1981</p> <p>Brade, 1985</p> <p>Tacken, 1986</p> <p>Holst, 1990</p>
Ra	<p><i>S. enterica</i> sv. Arizonae</p> <p>AgO→4)-α-D-Glcp-(1→2)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-Glcp-(1→3)-L-α-D-Hepp-(1→3)-L-α-D-Hepp-(1→5)- α-Kdo</p> <p style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 100px;">2</span> <span style="margin-right: 100px;">6</span> <span style="margin-right: 100px;">7</span> <span>4</span> </p> <p style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 100px;">↑</span> <span style="margin-right: 100px;">↑</span> <span style="margin-right: 100px;">↑</span> <span>↑</span> </p> <p style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 100px;">1</span> <span style="margin-right: 100px;">1</span> <span style="margin-right: 100px;">1</span> <span>2</span> </p> <p style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 100px;">α-D-Glcp</span> <span style="margin-right: 100px;">α-D-Gal</span> <span style="margin-right: 100px;">L-α-D-Hepp</span> <span>α-Kdo-(2→4)<sup>a</sup>- α-Kdo</span> </p>	<p>Olsthoorn, 1998</p>

a= Substitució en quantitats no-estequiomètriques

Figura 3.3 Quimiotips descrits en *S. enterica*. FA=àcids grassos.



### 3.4.2.3 *Shigella* spp

Els oligosacàrids del nucli en *Shigella* spp semblen estar estructuralment conservats. En el cas de *S. sonnei* Phase I PhI3 i *S. flexneri* són idèntics i molt semblants als oligosacàrids d'*E. coli* R1 i R3 (substitució de D-GlcN en la L,D-HepIII) (Taula 3.10). La regió del Kdo encara no s'ha elucidat per complet però es pensa que un segon residu de Kdo podria ser-hi present ja que s'ha detectat la seva presència en *S. sonnei*

**Taula 3.10** Estructura del nucli del LPS en *Shigella*.

ESPÈCIES, TIPUS DE NUCLI	ESTRUCTURA	REF.
	$R^2 \rightarrow 3) - \alpha\text{-D-Glcp}-(1 \rightarrow 3) - \alpha\text{-D-Glcp}-(1 \rightarrow 3) - L - \alpha\text{-D-Hep}-(1 \rightarrow 3) - L - \alpha\text{-D-Hep}-(1 \rightarrow 5) - \alpha\text{-Kdo}$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 2 \\ \uparrow \\ R^1 \end{matrix}</math> </div> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{matrix} 7 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-Glcp}N-(1 \rightarrow 7) - L - \alpha\text{-D-Hep} \end{matrix}</math> </div> </div>	<p>Gamian, 1982</p> <p>Lugowski, 1986</p>
<i>S. sonnei</i> R-type	$R^1 = R^2 = H$	<p>Gamian, 1982</p> <p>Lugowski, 1986</p>
<i>S. sonnei</i> Phase I Ph I1	$R^1 = \alpha\text{-D-Galp}-(1 \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Galp}-(1 \rightarrow$ $R^2 = [ \rightarrow 4) - \alpha\text{-L-AltpNAcA}-(1 \rightarrow 3) - \beta\text{-D-FucpNAc}4N-(1 \rightarrow 3) ]_i \rightarrow 3) - \beta\text{-D-Glcp}-(1 \rightarrow$	<p>Gamian, 1982</p> <p>Lugowski, 1986</p>
<i>S. sonnei</i> Phase I Ph I2	$R^1 = \alpha\text{-D-Galp}-(1 \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Galp}-(1 \rightarrow$ $R^2 = \alpha\text{-L-AltpNAcA}-(1 \rightarrow 3) - \beta\text{-D-FucpNAc}4N-(1 \rightarrow 3) - \beta\text{-D-Glcp}-(1 \rightarrow$	<p>Gamian, 1982</p> <p>Lugowski, 1986</p>
<i>S. sonnei</i> Phase I Ph I3	$R^1 = \alpha\text{-D-Galp}-(1 \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Galp}-(1 \rightarrow$ $R^2 = \beta\text{-D-Glcp}-(1 \rightarrow$	<p>Gamian, 1982</p> <p>Lugowski, 1986</p>
<i>S. flexneri</i>	$R^1 = \alpha\text{-D-Galp}-(1 \rightarrow 2) - \alpha\text{-D-Galp}-(1 \rightarrow$ $R^2 = \beta\text{-D-Glcp}-(1 \rightarrow$	<p>Lugowski, 1986</p>

### 3.4.2.4 *Klebsiella pneumoniae*

S'han identificat dos nucli de *K. pneumoniae*. Un d'ells va ser determinat a partir del serotip O:8 (Severn, 1996) i l'altre a partir del serotip O:1 (Süsskind, 1995). En els dos casos, el LPS que es va analitzar no contenia la fracció polisacàridica corresponent a l'antigen O.



En els dos casos, la regió del nucli intern és idèntica i, com en altres *Enterobacteriaceae*, està constituït per Kdo i 3 residus de L,D-Hep. A diferència, però, d'*E. coli* i *Salmonella*, en posició O-4 de la HepI hi ha el disacàrid  $\beta$ -D-GalpA-(1→6)- $\beta$ -D-Glcp. En el O-3 de la L,D-HepII s'uneix el nucli extern, constituït per:

• $\alpha$ -D-Glcp-(1→4)- $\alpha$ -D-GalpA en *K. pneumoniae* O:8.

•D- $\alpha$ -D-Hepp-(1→2)-D- $\alpha$ -D-Hepp-(1→2)-D- $\alpha$ -D-Hepp-(1→2)-D- $\alpha$ -D-Hepp-(1→6)- $\alpha$ -D-GlcpN-(1→4)- $\alpha$ -D-GalpA en *K. pneumoniae* O:1.

La diferència entre els dos oligosacàrids està en la cadena de D,D-Hep i en la presència de GlcpN en *K. pneumoniae* O:1 (Taula 3.11)

Cal destacar que els nuclis de *K. pneumoniae* no contenen grups fostat. Això dona lloc a especular sobre la funció del residu d'àcid galacturònic com a portador de les càrregues negatives necessàries per les funcions biològiques del LPS com per exemple l'acumulació de cations en la superfície bacteriana.

**Taula 3.11** Estructura del nucli del LPS en *K. pneumoniae* O:8 i O:1.

SEROTIP	ESTRUCTURA	REF.
	$  \begin{array}{ccc}  R \rightarrow 4) - \alpha - D - GalpA - (1 \rightarrow 3) - L - \alpha - D - Hepp - (1 \rightarrow 3) - L - \alpha - D - Hepp - (1 \rightarrow 5) - \alpha - Kdo & & \\  \begin{array}{ccc}  7 & 4 & 4 \\  \uparrow & \uparrow & \uparrow \\  1 & 1 & 2 \\  L - \alpha - D - Hepp & \beta - D - Glcp & Kdo \\  & 6 & \\  & \uparrow & \\  & 1 & \\  & \beta - D - GalpA &   \end{array}  \end{array}  $	
RFK11 (O:8 <sup>-</sup> )	R = $\alpha$ -D-Glcp-(1→	Severn, 1996
R20 (O: 1 <sup>-</sup> )	R = D $\alpha$ D-Hepp-(1→2)-D $\alpha$ D-Hepp-(1→2)-D $\alpha$ D-Hepp-(1→2)- D $\alpha$ D-Hepp-(1→6)- $\alpha$ -D- GlcpN-(1→	Süsskind 1995

### 3.4.2.5 *Proteus spp*

El gènere *Proteus* està format per quatre espècies: *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Proteus myxofaciens* i *Proteus penneri*. La majoria dels estudis estructurals del nucli s'han dut a terme amb *P. mirabilis* (serotipus O3). Recentment s'ha elucidat l'estructura del nucli de *P. mirabilis* serotipus O27 (Vinogradov, 1999) i de *Proteus vulgaris* O2 (Vinogradov, 1999). En aquests estudis s'ha vist que el nucli de *Proteus* difereix bastant al nucli d'*E. coli* i *Salmonella* i seria més similar al de *Klebsiella pneumoniae*. S'ha determinat el nucli complet de *P. mirabilis* R110/1959 (Radziejewska-Lebrecht, 1989 i Vinogradov, 2000). L'estructura re-analitzada d'aquesta soca presenta trets peculiars que no s'havien descrit fins al moment com ara la presència fosfoetanolamina en l'HepII del nucli intern o bé la presència de AraV unida al Kdo (Taula 3.12). Aquestes dues característiques també s'han identificat en el nucli de *Proteus vulgaris* O2. En aquesta soca també destaca la presència d'un tercer residu de L,D-Hep que no pertany al nucli intern. Totes les estructures es mostren en la Taula 3.12. Algunes de les característiques que comparteixen el nucli de *P. mirabilis* i el de *K. pneumoniae* són les següents:

- S'ha vist que el nucli de *Proteus* conté D-GalA com a component característic.
- L'HepI està substituïda en posició O-4 per Glcp amb enllaç  $\beta(1\rightarrow4)$ .
- D,D-Hep hi és present.

### 3.4.2.6 *Yersinia spp*

El nucli del LPS en el gènere *Yersinia* s'ha caracteritzat en *Yersinia enterocolitica* Ye75R (O:3) (Radziejewska-Lebrecht, J, 1994) i en *Yersinia enterocolitica* O:9 (Müller-Loennies, S, 1999) (Taula 3.13)

En els dos casos, l'estructura del nucli és força diferent de l'estructura en *E. coli* i *Salmonella*. L'HepI està substituïda per Glc mitjançant enllaç  $\beta(1\rightarrow4)$  i la D,D-Hep també hi és present.

No s'han identificat residus de fosfat ni de fosfoetanolamina en la regió del nucli intern (Només en el serotipus O:3 s'ha trobat una substitució parcial de fosfat en el nucli extern).

Anàlisis genètiques suggereixen que la regió del nucli extern formada per D,D-Hep podria representar un ancestre d'una unitat de repetició de l'antigen O (donat que l'operó de la biosíntesi del nucli extern presenta homologies amb operons de la biosíntesi d'antígens O d'altres enterobactèries.





Taula 3.14 Estructures del nucli del LPS de *Citrobacter freundii*.

SER.	ESTRUCTURA	REF.
O:4 i O:36	$\beta$ D-GalNAc(1→4)- $\alpha$ D-GalNAc(1→3)- $\beta$ D-GlcNAc(1→4)- $\alpha$ D-Glc(1→2)- $\alpha$ D-Glc(1→3)-L $\alpha$ -D-Hep(1→3)L $\alpha$ -D-Hep(1→5)-Kdo <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">             4 ↑ 1 R-(1→6)-<math>\beta</math>-D-Glc           </div> <div style="text-align: center;">             7 ↑ 1 L-<math>\alpha</math>-Hep           </div> </div>	Romanowska 1988
O:27	$\alpha$ -D-Glc-(1→2)- $\alpha$ -D-Glc-(1→2)- $\alpha$ -D-Gal-(1→3)- $\alpha$ -D-Glc-(1→3)-L- $\alpha$ -D-Hep-(1→3)-L- $\alpha$ -D-Hep-(1→5)-Kdo <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">             3 ↑ 1 <math>\alpha</math>-D-GalNAc           </div> <div style="text-align: center;">             7 ↑ 1 L-<math>\alpha</math>-D-Hep           </div> </div>	Dabroski, 1988
O:23	$\alpha$ -D-Glc-(1→2)- $\alpha$ -D-Gal-(1→2)- $\alpha$ -D-Glc-(1→4)- $\alpha$ -D-Glc-(1→3)-L- $\alpha$ -D-Hep-(1→3)-L- $\alpha$ -D-Hep-(1→5)-Kdo <div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">             7 ↑ 1 L-<math>\alpha</math>-D-Hep 7 ↑ <math>\beta</math>-D-GalA           </div> </div>	Romanowska 1990

R= $\alpha$ -D-Glc en el serotipus O:4 i  $\alpha$ -D-Gal en el serotipus O:36.

3.15 Estructura del nucli del LPS de *V. cholerae* O:1

SER.	ESTRUCTURA	REF.
O:1	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">             L-<math>\alpha</math>-D-Hep 1 ↓ 6           </div> <div style="text-align: center;"> <math>\alpha</math>-D-Glc 1 ↓ 6           </div> </div> $\alpha$ -D-GlcN-(1→7)-L- $\alpha$ -D-Hep-(1→2)-L- $\alpha$ -D-Hep-(1→3)-L- $\alpha$ -D-Hep-(1→5)- $\alpha$ -Kdo <div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">             4 ↑ 1 <math>\beta</math>-D-Fru-(2→6)-<math>\beta</math>-D-Glc           </div> </div>	Vinogradov, 1995

3.4.3.2 *Aeromonas spp*

Es coneixen tres quimiotips pertanyents a *Aeromonas hydrophila* (I, II i III).

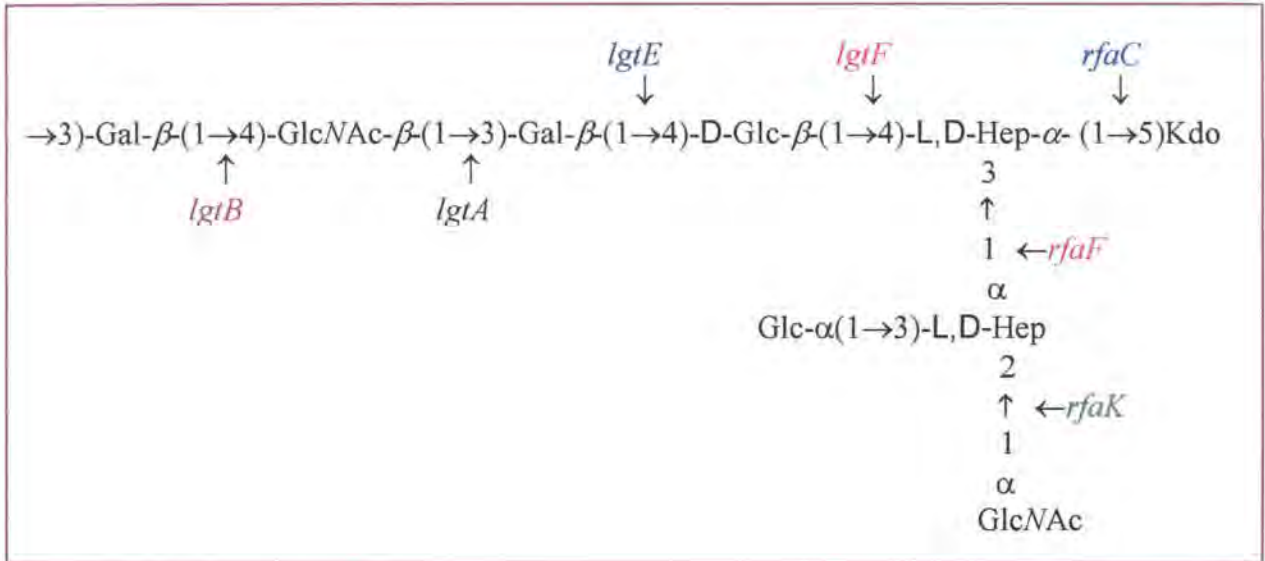
La característica més important de les estructures del nucli d'*Aeromonas salmonicida* i d'*Aeromonas salmonicida salmonicida* és l'existència de Kdo furanòsic substituït en O-6 per HepI (Taula 3.16).

Taula 3.16 Estructures del nucli del LPS d'espècies d'*Aeromonas*.

ESPÈCIE	ESTRUCTURA	REF.
<i>A. hydrophila</i> Quimiotip II	$  \begin{array}{c}  \text{L-}\alpha\text{-D-Hep} \\  1 \\  \uparrow \\  6 \\  \beta\text{-D-Glc-(1}\rightarrow\text{4)-L-}\alpha\text{-D-Hep - (1}\rightarrow\text{2)-L-}\alpha\text{-D-Hep} \\  3 \\  \uparrow \\  1 \\  \alpha\text{-D-GlcN(1}\rightarrow\text{7)-L-}\alpha\text{-D-Hep}  \end{array}  $	Banoub, 1983
<i>A. hydrophila</i> Quimiotip III	$  \begin{array}{c}  \alpha\text{-D-Glc} \\  1 \\  \uparrow \\  6 \\  \beta\text{-D-3,6d-Glc3NAc(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{3)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{2)-L-}\alpha\text{-D-Hep} \\  4 \\  \uparrow \\  1 \\  \alpha\text{-D-Glc}  \end{array}  $	Banoub, 1981
<i>A. hydrophila</i> A6	$  \begin{array}{cc}  \text{D-}\alpha\text{-D-Hep} & \text{L-}\alpha\text{-D-Hep} \\  1 & 1 \\  \uparrow & \uparrow \\  6 & 6 \\  \beta\text{-D-Gal -(1}\rightarrow\text{4)-D-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glc-(1}\rightarrow\text{4)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{2)-L-}\alpha\text{-D-Hep} \\  & 3 \\  & \uparrow \\  & 1 \\  & \alpha\text{-D-GlcN-(1}\rightarrow\text{7)-L-}\alpha\text{-D-Hep}  \end{array}  $	Michon, 1984
<i>A. salmonicida</i>	$\text{L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{2)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{3)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{6)-Kdof}$	Shaw, 1986
<i>A. salmonicida</i> <i>salmonicida</i>	$  \begin{array}{c}  \text{L-}\alpha\text{-D-Hep} \\  1 \\  \uparrow \\  6 \\  \alpha\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-Glc-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-GalNAc(1}\rightarrow\text{4)- L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{2)- L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{3)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{6)-Kdof} \\  4 \\  \uparrow \\  1 \\  \alpha\text{-D-GlcN-(1}\rightarrow\text{7)-L-}\alpha\text{-D-Hep}  \end{array}  $	Shaw, 1990



**Figura 3.4** Esquema de l'estructura del nucli del serotip L2 de *N. meningitidis* i els enzims involucrats en la seva biosíntesi.



### 3.4.4.2 *Acinetobacter spp*

Recentment, s'ha determinat l'estructura del nucli d'*Acinetobacter baumannii* (Vinogradov, E.V.,1998). Per primera vegada, s'ha identificat un tetrasacàrid de Kdo (Kdo $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 5Kdo $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 5(Kdo $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 4)Kdo).

Prèviament s'havia descrit l'estructura del nucli en *Acinetobacter calcoaceticus* en què no hi havia la presència de L,D-Hep ni D,D-Hep. L'oligosacàrid consisteix en D-Glcp i àcid octulosònic (Ko).

### 3.4.5 El LPS en la família *Chlamydiaceae*

#### 3.4.5.1 *Chlamydia spp*

La família *Chlamydiaceae* conté un sol gènere constituït per patògens intracel·lulars obligats que causen malalties agudes i cròniques en animals i humans. *Chlamydia psittaci* infecta animals tot i que les infeccions en humans poden ocasionar pneumònia.



*Chlamydia trachomatis* (serovars de la A a la C) és l'agent causal d'infeccions cròniques oculars que poden acabar en ceguesa. Els serovars que van de la D a la K causen malalties de transmissió sexual en homes (uretritis i prostatitis) i en dones (uretritis, cervicitis i salpingitis desembocant en molts casos en infertilitat).

*Chlamydia pneumoniae* és l'agent causal de pneumònia atípica i recentment ha estat associada a la patogènesi i a les conseqüències clíniques de l'arteriosclerosi.

Donat que *Chlamydia* spp és una bactèria intracel.lular obligada, és difícil obtenir-la en grans quantitats. És per això que les anàlisis estructurals del LPS són limitades. Tot i això, es van poder obtenir grans quantitats de LPS usant una soca recombinant en la qual s'havia clonat el gen de la Kdo transferasa (*waaA*). *Chlamydia* conté una única estructura de LPS formada per un trisacàrid de Kdo:  $\alpha$ -Kdo-(2→8)-  $\alpha$ -Kdo-(2→4)-  $\alpha$ -Kdo. Anticossos monoclonals contra aquest epitop són específics pel gènere. Les propietats serològiques del LPS nadiu són idèntiques tant al LPS recombinant (de-O-acetilat i de-N-acetilat) i al pentasacàrid difosfat obtingut per síntesi química (Holst, 1991).

### **3.4.6 El nucli del LPS en la família Pasteurellaceae.**

#### **3.4.6.1 *Haemophilus* spp**

*Haemophilus influenzae* causa bacterèmia i infeccions invasives, per exemple, meningitis. En soques salvatges d'*H. influenzae* només s'ha trobat LPS de tipus R i, igual que en *Neisseria*, se l'anomena lipooligosacàrid (LOS).

El nucli consisteix en Glc, Gal, Hep i Kdo. Només s'ha trobat un residu de Kdo en el mutant Rd I-69 R d<sup>-</sup> b<sup>+</sup>, que consisteix en una molècula de Kdo unida al lípid A i fosforilada en posicions 4 i 5. L'existència d'aquest mutant suggereix que un únic residu de Kdo fosforilat és suficient per la supervivència de les bactèries Gram negatives.

### 3.4.7 El nucli del LPS en la família *Pseudomonadaceae*

#### 3.4.7.1 *Pseudomonas spp*

El nucli de *Pseudomonas aeruginosa* té unes característiques que no es troben en el LPS de les *Enterobacteriaceae* ni de la majoria de no-*Enterobacteriaceae*.

En totes les soques de *P. aeruginosa* (amb un nucli complet o incomplet) el residu de D-GalN està N-acetilat per D-Ala (Drewry, 1975; Rowe, 1983). El nucli de *P. aeruginosa* PA01 es caracteritza per l'alta concentració de grups fosfat, dels quals només dos s'han localitzat en posició 2 i 4 del residu de L,D-HepI.

Tots els serotips de *P. aeruginosa* tenen en comú una modificació de la L,D-HepII que consisteix en un grup carbamoil en posició 7 (Taula 3.18). Aquesta estructura es va trobar en totes les soques del grup de RNA I que inclou, a més de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* i *P. syringae*. En altres grups de RNA, aquesta substitució sembla que no hi és present.

**Taula 3.18** Estructura del nucli del LPS de *Pseudomonas aeruginosa* O:5 i O:6.

SEROTIP	ESTRUCTURA	REF.
O:5	$  \begin{array}{cccc}  \text{AgO} & & \text{D-Ala} & \\  \downarrow & & \downarrow & \\  4 & & & \\  \alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-GalpN-(1}\rightarrow\text{3)-L-}\alpha\text{-D-Hepp-(1}\rightarrow\text{3)-L-}\alpha\text{-D-Hepp-(1}\rightarrow\text{5)-}\alpha\text{-Kdo} & & & \\  6 & & 3 & 7 & 4 \\  \uparrow & & \uparrow & \uparrow & \uparrow \\  1 & & 1 & \text{CONH}_2 & \alpha\text{-Kdo} \\  \beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-Rha} & & \beta\text{-D-Glcp} & &   \end{array}  $	Beckmann, 1995
O:6	$  \begin{array}{cccc}  \text{AgO} & & \text{D-Ala} & \\  \downarrow & & \downarrow & \\  4 & & & \\  \alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-GalpN-(1}\rightarrow\text{3)-L-}\alpha\text{-D-Hepp-(1}\rightarrow\text{3)-L-}\alpha\text{-D-Hepp-(1}\rightarrow\text{5)-}\alpha\text{-Kdo} & & & \\  6 & & 3 & 7 & 4 \\  \uparrow & & \uparrow & \uparrow & \uparrow \\  1 & & 1 & \text{CONH}_2 & \alpha\text{-Kdo} \\  \alpha\text{-L-Rha} & & \beta\text{-D-Glcp} & &   \end{array}  $	Masoud, 1995

### **3.4.7.2 *Xanthomonas spp***

S'han fet estudis en *Xanthomonas sinensis*. Només una molècula de Kdo es va identificar i no es van detectar heptoses. Una molècula de manosa està unida al Kdo i a un residu de galacturonamida fosfat.

### **3.4.8 El nucli del LPS en la família *Rhizobiaceae*.**

#### **3.4.8.1 *Rhizobium spp***

La família *Rhizobiaceae* està constituïda per bacteries no patògenes que viuen en simbiosi amb plantes lleguminoses en què participen del procés d'assimilació del Nitrogen. En aquestes bacteries s'ha identificat LPS i polisacàrids capsulars en la superfície cel·lular. Sembla que els dos polímers juguen un paper important en l'adhesió a l'hoste.

### **3.4.9 El nucli del LPS en la família *Legionellaceae***

#### **3.4.9.1 *Legionella spp***

El nucli de *Legionella* O:1 ha estat identificat (Knirel, 1995). Es va trobar una sola molècula de Kdo i no es va detectar la presència d'heptoses. El nucli conté una cadena de sis hexoses sense grups fosfat. La part distal del nucli conté tres unitats de deoxisucres: 2 residus de L-Rha (acetilada en posició 2) i un residu de D-QuiNAc (viosamina) (acetilada en posició 4). Per tant, la regió del nucli extern és força hidrofòbic al igual que la cadena d'antigen O.

### **3.4.10 El nucli del LPS en bactèries fototròfiques**

Només s'ha aïllat LPS de les famílies *Rhodospirillaceae*, *Chromatiaceae*, *Chlorobiaceae*. No s'ha trobat LPS en la família *Chlororflexaceae*. Una característica del LPS aïllat en les tres famílies és la presència de sucres metilats. Alguns d'aquests LPS contenen heptoses: D,D-Hep i L,D-Hep en alguns casos i en altres casos només D,D-Hep.

## **3.5 Relació estructura-activitat en el nucli del LPS**

En general, el nucli del LPS no es considera com un factor de virulència *per se*, tot i que en alguns estudis s'ha descrit un possible funció en l'adhesió d'algunes bactèries a cèl.lules hostes (Jacques, 1996).

A banda d'això, el nucli sembla tenir una funció indirecta en la virulència. Per exemple, el nucli intern juga un paper molt important en establir la funció de la membrana externa com a barrera. Aquesta funció podria explicar el grau de conservació estructural present en *E. coli* i en *Salmonella*. La limitada variació estructural del nucli, especialment del nucli intern, en comparació amb l'antigen O, ha generat interès per la possibilitat de crear anticossos contra aquesta diana (Di Padova *et al.*, 1993; Stanislavsky *et al.*, 1997).

El residu de Kdo és essencial per la viabilitat de la bactèria (Osborn, M. J, 1979 i Vaara, M *et al.*, 1979 ).

Les bactèries que tenen algun defecte en la biosíntesi del Kdo no creixen. Per tant, el Kdo és un constituent obligatori del LPS i juga un paper vital per a la bactèria. El fet que segurament no estigui present en cèl.lules de mamífer ha donat lloc a la idea de crear substàncies farmacològiques capaces d'interferir en la biosíntesi i, per tant, donar lloc a un nova classe d'antibiòtics actius contra bactèries Gram negatives en general.

Fins al moment, s'han construït derivats del Kdo que presenten bona activitat antibacteriana *in vitro* (Hammond, 1987 i Goldman, 1987).

La funció del Kdo podria estar associada al seu grup carboxil. La presència de càrregues negatives en el grup carboxil constitueix el lloc d'unió de cations  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Aquestes unions són essencials per la integritat estructural de la membrana externa i, per tant, per la supervivència de la cèl.lula. El grup carboxil sembla també necessari en la immunoreactivitat i en la inducció d'IL-1 per part del LPS (veure apartat 2).

A banda del Kdo, sembla que els fosfats presents en el nucli intern (units a l'HepI i HepII en *E. coli* i *Salmonella*) juguen també un paper molt important en l'estabilitat de la membrana externa. Es creu que aquests grups faciliten les unions entre molècules del LPS adjacents a través de cations divalents o poliamines. També poden facilitar la interacció amb grups carregats positivament pertanyents a proteïnes. Els grups fosfat, a més, eviten la penetració de compostos hidrofòbics a través de la membrana externa (Nikaido N. *et al*, 1985).

La pèrdua dels grups fosfat o la pèrdua de totes les heptoses dona lloc a importants canvis estructurals en la membrana externa. Aquest fenotip s'anomena LPS Rd, de l'anglès *deep rough*. Les soques que presenten aquest fenotip són hipersensibles als compostos hidrofòbics. La presència de grups fosfats sembla que no és l'única forma d'estabilitzar la membrana externa. Tal i com s'ha descrit anteriorment, en molts casos l'absència de grups fosfat està compensada per les càrregues negatives d'altres molècules. En el cas de *Klebsiella pneumoniae*, que tal i com s'ha descrit no presenta fosfat en el nucli intern, les càrregues negatives vindrien donades pels residus de GalA i Kdo.

### 3.6 Estructura del lípid A

L'elucidació final de l'estructura del lípid A es va finalitzar l'any 1983, després que el 1954 Westphal i Lüderitz iniciessin els estudis estructurals del lípid A.

El lípid A representa la fracció lipídica del LPS, unida covalentment a la fracció polisacàridica. És possible separar el lípid A de la fracció polisacàridica a través d'hidròlisi àcida suau (per exemple, amb àcid acètic al 1%). Aquesta hidròlisi trenca preferentment la unió entre el residu de KdoI del nucli intern i el lípid A. El lípid A va ser descobert arran d'investigacions en el LPS de *S. enterica* i *E. coli* i es va caracteritzar com un fosfoglicolípide característic amb una estructura única en la natura.

En la Figura 3.5 es mostra l'estructura del lípid A de quatre bacteries Gram negatives diferents, les quals posseeixen un LPS altament actiu (*E. coli*, *H. influenzae*, *Chromobacterium violaceum*, *N. meningitidis*).

El lípid A està compost per un disacàrid de  $\beta$ -glucosaminil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-glucosamina fosforilat en les posicions 1 i 4' que uneix (en el cas de les *Enterobacteriaceae*) sis o set residus d'àcids grassos hidroxilats en posició 3, units tant per enllaços ester com per enllaços amida. Els àcids grassos que constitueixen el lípid A són àcids grassos saturats de 12 -àcid làuric- a 14 -àcid mirístic- àtoms de Carboni. Això constitueix una de les diferències respecte els àcids grassos dels fosfolípids de membrana, que són insaturats. A més, els àcids grassos que constitueixen el lípid A són de 2 a 6 àtoms de Carboni més curts que els glicerofosfolípids. La presència de les hidroxilacions en posició 3 també constitueix una diferència respecte als glicerofosfolípids.

Els exemples presentats en la Figura 3.5 demostren que el lípid A de diferents orígens conserva una estructura similar. Tot i això, existeixen variacions en el disacàrid, en les característiques dels grups acils i en la substitució dels grups fosfat.

Per exemple, la GlcN pot estar substituïda per 2,3-diamino-2,3-dideoxi-D-glucosa (D-GlcN3N) en el cas de *Campylobacter jejuni*. En *Legionella pneumophila* s'ha descrit el disacàrid GlcN3N-GlcN3N. A més, el lípid A de *L. pneumophila* té com a característica la presència d'àcids grassos de cadena més llarga hidroxilats en la penúltima posició i no en posició 3 com és habitual. Per exemple, hi ha àcid 27-hidroxi-octacosanoic (28:0 (27-OH)), que posseeix una longitud doble del que és habitual. A més, també hi són

presentes altres grups acils poc habituals com per exemple 28:0 (27oxo), 18:0 (3-OH), 20:0 (3-OH), 22:0 (3-OH).

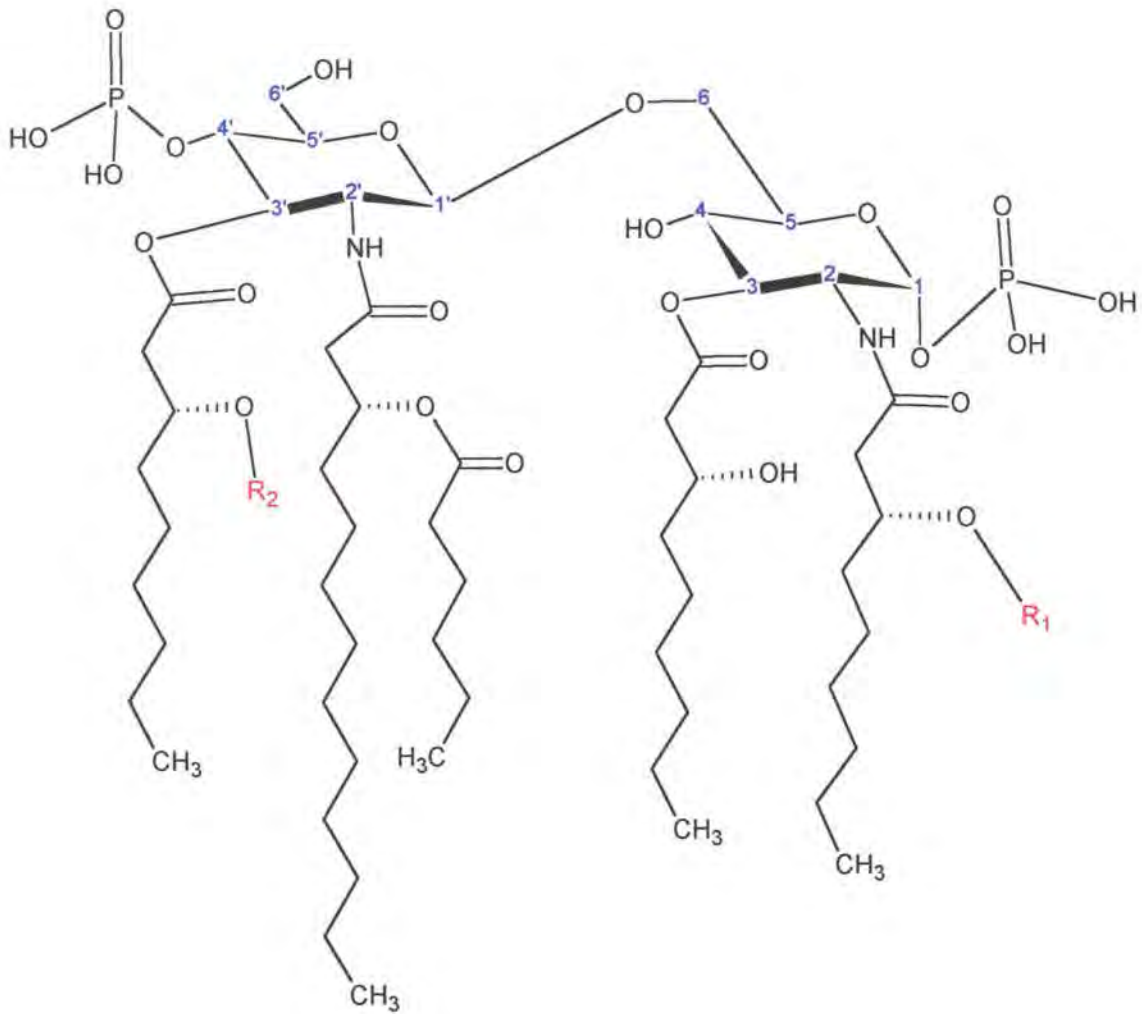
En *Rhodobacter sphaeroides*, el lípid A conté només 5 grups acils i els àcids grassos units per enllaç amida al disacàrid són àcid 3-oxotetradecanoic (Figura 3.6). En aquesta espècie, sorprenentment, també s'ha identificat la presència d'àcids grassos insaturats com a constituents del lípid A. Tant la presència d'àcids grassos amb un grup ceto en posició 3 com la presència d'àcids grassos insaturats constitueix un fet inusual. Aquestes característiques també s'han descrit en *Rhodobacter capsulatus* (Figura 3.6). El lípid A d'aquest gènere té molt interès biològic ja que no posseeix activitat endotòxica sinó que, per contra, s'han trobat propietats antagonistes del LPS.

És bastant freqüent la presència de substituents units als grups fosfats. Alguns d'aquests substituents estan descrits en la Taula 3.19. En general, es tracta de grups carregats i no estan presents en quantitats estequiomètriques. Aquests grups poden ser fosfat (en *E. coli*), aminoetanol (*S. enterica*), aminoetanolfosfat (*N. meningitidis*) i L-AraN (*Proteus mirabilis*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae* i *S. enterica*). Els grups de L-AraN en el cas de *S. enterica* s'han associat a un fenotip de resistència a la Polimixina. L'addició de residus de L-AraN podria estar codificada pel gen *pmrA* i *pmrD* (Roland, 1993 i 1994).

Per altra banda, els grups fosfat poden estar parcialment o totalment absents en el lípid A. Per exemple, en *Bacteroides fragilis* falta el fosfat unit en posició 4. El cas més sorprenent és el de *Rhizobium leguminosarum* bv Phaseoli on els dos fosfats estan absents. Un d'ells és substituït per D- GalA i en l'altre extrem la glucosamina està oxidada en forma d'àcid 2-amino-2-deoxiglucònic. Per tant, hi continuen havent càrregues negatives, però no en forma de grups fosfat.

El lípid A constitueix el principi endotòxic del LPS i representa, juntament amb el nucli intern, la part més conservada del LPS.

Figura 3.5 Estructura química del lípid A de diverses bactèries Gram negatives.



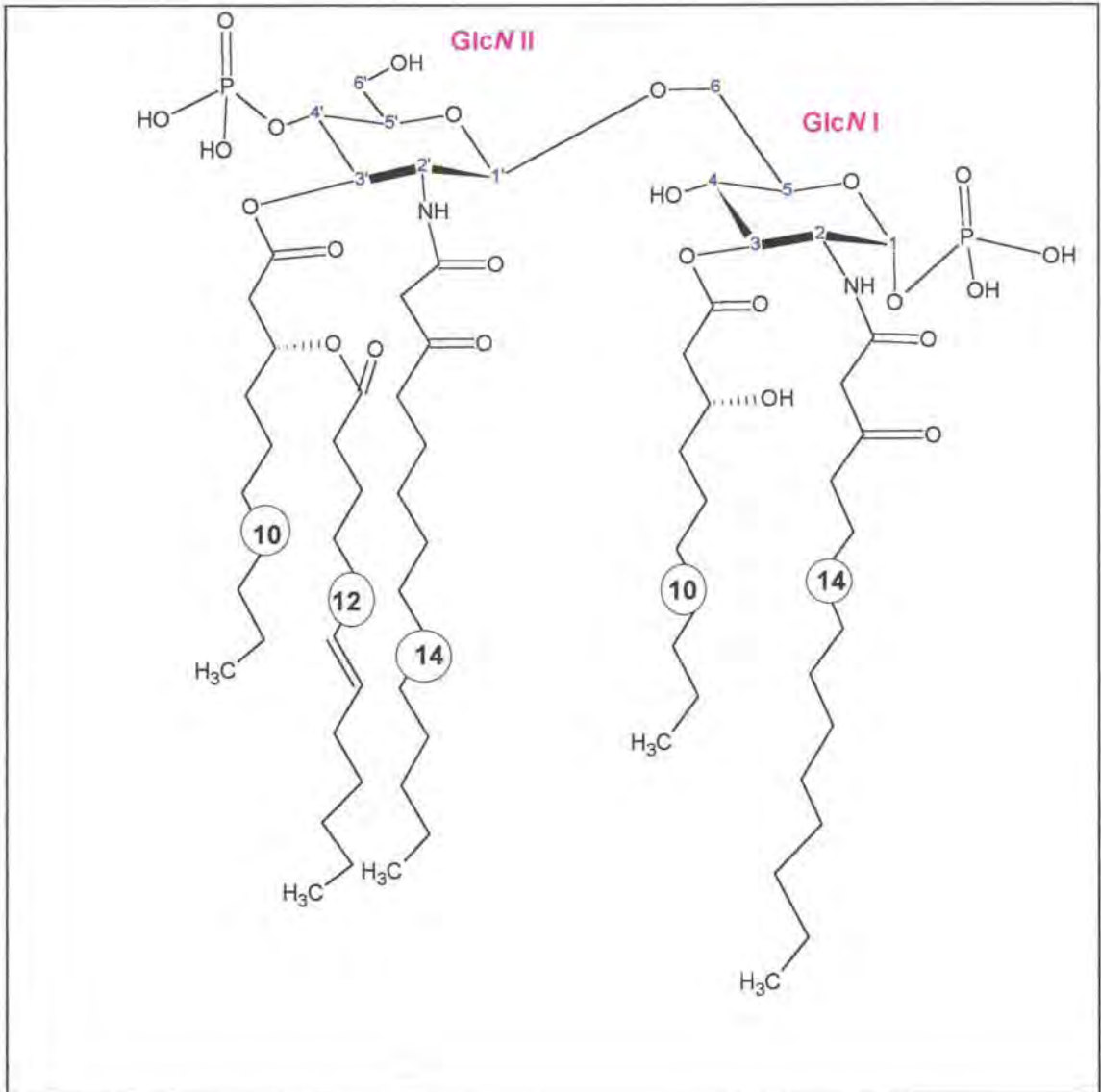
ESPÈCIES BACTERIANES	R1	R2	NÚMERO DE CARBONIS		
			M	N	O
<i>Escherichia coli</i>	H	14:0 <sup>a</sup>	14	14	12
<i>Haemophilus influenzae</i>	H	14:0	14	14	14
<i>Neisseria meningitidis</i>	12:0 <sup>b</sup>	H	14	12	12
<i>Chromobacterium violaceum</i>	12:0	H	12	10	12

14:0<sup>a</sup>= àcid mirístic

12:0<sup>b</sup>= àcid làuric



**Figura 3.6** Estructura del lipidA de *Rhodobacter capsulatus*. Destaca la presència de només 5 grups acil i àcid 3-oxotetradecanoic i àcids grassos insaturats. Aquest lipidA no posseeix activitat endotòxica.



**Taula 3.19** Substituents units als grups fosfat de l'esquelet del lípidA (4'-P-β-D-GlcpN-(1→6)-α-D-Glcp-1-P).

	SUBSTITUENTS		REFERÈNCIA
	C-4'	C-1	
<i>Escherichia coli</i>	--	P <sup>a</sup>	Rietschel,1982
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	L-Arap4N <sup>b,c</sup>	L-Arap4N <sup>c</sup>	Süsskind,
<i>Legionella pneumophila</i>	--	--	Helbig,1995
<i>Neisseria meningitidis</i>	P-EtN <sup>d</sup>	P-EtN	Kulshin, 1992
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	--	--	Kulshin, 1991
<i>Salmonella enterica sv. Minnesota</i>	L-Arap4N	EtNd	Rietschel,1982
<i>Vibrio cholerae</i>	--	P-EtN	Broady, 1981
<i>Yersinia pestis</i>	L-Arap4N	D-Araf <sup>e</sup>	Dalla, 1985

P<sup>a</sup>=substitució de fosfat no-estequiomètrica

<sup>b</sup>L-Arap4N= 4-amino-4-deoxy-L-arabino-pentopiranosà.

c=en el lípid A de serotipus O:3 però no en el lípid A del serotipus O:1.

<sup>d</sup>EtN=2-aminoethanol

<sup>e</sup>D-Araf=D-arabino-pentofuranosa.

### 3.7 Relació estructura-activitat en el lípid A

El lípid A lliure expressa les mateixes activitats característiques del LPS, tals com la pirogenicitat i la letalitat. Això indica, doncs, que el lípid A representa el "principi endotòxic del LPS" (Galanos *et al.*, 1985 ). S'ha trobat també que en espècies no-*Enterobacteriaceae* existeixen variants del lípid A amb una estructura diferent. Per exemple, en *Rhodobacter capsulatus*, el lípid A només posseeix 5 cadenes d'una longitud mitjana de 12 àtoms de carboni (Krauss JH *et al.*, 1989) Moltes d'aquestes variants no presenten activitat biològica però poden actuar com a antagonistes de les molècules actives de LPS o lípid A (Loppnow H *et al.*, 1990 ).

Donat que el LPS i el lípidA són molècules amfifíliques, formen agregats en medis aquosos per sobre una concentració crítica (CAC, concentració crítica d'agregats), la qual depèn de la seva hidrofobicitat i, per tant, de la seva estructura química primària .

L'estructura dels agregats depèn de la conformació de les molècules que el formen que depèn igualment de l'estructura primària i de condicions com la temperatura, el pH, el contingut en aigua i la concentració de cations mono i divalents. La variabilitat en els patrons d'acilació del lípid A i la variabilitat en la composició de sucres dona lloc a un gran polimorfisme estructural, la importància del qual respecte a l'acció biològica de les endotoxines no es coneix perfectament. Tot i això s'han descrit alguns requisits necessaris per la bioactivitat del lípid A. L'activitat endotòxica requereix la presència de dos residus d'hexosamina, dos grups fosfat i sis àcids grassos. Els àcids grassos semblen jugar un paper molt important en la bioactivitat del lípid A. El número d'àcids grassos, la seva localització, la longitud i l'esteroquímica són elements claus.

Les propietats immunoreactives s'han estudiat en front d'anticossos mono i policlonals. Els determinants antigènics s'han localitzat només en la regió hidrofílica del lípid A. L'especificitat dels anticossos és independent del patró d'acilació. Per tant, els àcids grassos no formen part de l'epítot. Tot i això, donat el paper que juguen en la conformació del lípid A, poden modular l'exposició dels determinants antigènics del lípid A. Per altra banda, els grups fosfat són essencials per l'expressió de l'epítot del lípid A.

## 4. BIOSÍNTESI DEL LÍPID A

Dades bioquímiques i genètiques han posat de manifest que la ruta de biosíntesi del lípid A i del nucli intern està formada per reaccions seqüencials en què els intermediaris deriven d'una sèrie de precursors com ara: UDP-GlcNAc, R-3-hidroximiristoil-ACP, ATP, CMP-Kdo, miristoil-ACP i lauroil-ACP.

La sèrie de reaccions seqüencials que es duen a terme es descriuen a continuació i es mostren en la Figura 4.1.

### 4.1 Formació de la UDP-GlcNAc

La UDP-GlcNAc és un precursor clau en la biosíntesi de polisacàrids bacterians de la superfície cel·lular. La UDP-GlcNAc constitueix el donador de residus de GlcN per a la biosíntesi del lípid A, peptidoglicà, antigen O *rfe*-dependent i de l'antigen comú de les

enterobactèries (ECA). La formació d' UDP-GlcNAc està catalitzada per un enzim bifuncional, codificat pel gen *glmU*. L'enzim GlmU catalitza l'acetilació de GlcN-1-P per donar lloc a GlcNAc. Aquest mateix enzim catalitza l'activació de GlcNAc a UDP-GlcNAc.

## 4.2 Acilació de la UDP-GlcNAc

En aquest pas intervé el primer enzim específic de la ruta biosintètica del lípid A. Es tracta d'una aciltransferasa que reconeix el grup hidroxil en posició 3 de la molècula d' UDP-GlcNAc. En *E. coli* l'aciltransferasa és altament selectiva per l'àcid R-3-hidroximirístic (Anderson, 1993 ). Aquest enzim, codificat pel gen *lpxA*, catalitza la unió del àcid R-3-hidroximirístic (que està en forma de miristoil-ACP -*Acyl Carrier Protein*) a l' UDP-GlcNAc donant lloc a UDP-GlcNAc-3-Acil.

La letalitat dels mutants d'*E. coli* defectius en UDP-GlcNAc-aciltransferasa (LpxA) demostren que el lípid A és essencial per a la viabilitat de la bactèria.

A diferència dels enzims per la biosíntesi de glicerofosfolípids ( que normalment estan units a la membrana citoplasmàtica), els enzims de la biosíntesi del lípid A són citoplasmàtics.

L'àcid R-3-hidroximirístic-ACP és un precursor de la biosíntesi d'altres compostos. Si no s'usa per la biosíntesi del lípid A, l'àcid R-3-hidroximirístic es converteix en palmitat-ACP, precursor clau en la biosíntesi de glicerofosfolípids.

Mutacions puntuals en el gen *lpxA* poden ser suprimides pel gen *fabZ*, gen immediatament posterior al gen *lpxA* i que codifica per a una deshidratasa que catalitza el pas d'àcid R-3-hidroximirístic-ACP a palmitat.

## 4.3 Eliminació del grup acetil en posició 2

Aquesta reacció està catalitzada per una desacetilasa específica anomenada LpxC. En aquesta reacció, s'elimina el grup acetil en posició 2 de l' UDP-GlcNAc-3-acil donant lloc a UDP-GlcN-3-acil.

La constant d'equilibri per la reacció d'acetilació de l' UDP-GlcNAc és desfavorable. Això fa suposar que l'àcid 3-R-hidroximirístic és més estable que la molècula d' UDP-GlcNAc-3-Acil. Per tant, la reacció catalitzada per la desacetilasa (LpxC) hauria de ser

un punt de regulació. La *N*-desacetilasa està codificada pel gen *lpxC* (*envA*). Aquest gen va ser descrit per Normark *et al.* el 1969 com una mutació que causa hipersensibilitat a l'Ampicil·lina i un retard en la formació del sept transversal durant la divisió cel·lular. El gen *lpxC* (*envA*) es va seqüenciar l'any 1987, abans que es descobrís la seva funció en la biosíntesi del lípid A. Està situat en el cluster dels gens implicats en la divisió cel·lular (*fisQAZ*) i les proteïnes de secreció (*secA*). A l'igual que el gen *lpxA*, el gen *lpxC* (*envA*) és essencial pel creixement en *E. coli*.

#### **4.4 Reacció d'acilació en posició 2**

Aquesta reacció està catalitzada per una altra aciltransferasa específica (LpxD). Un segon grup acil, procedent de l'àcid R-3-hidroxi-*miristic*-ACP, s'incorpora en posició 2 per generar UDP-2,3-diacil-GlcN.

El gen *lpxD* (*firA*) codifica per a una nova acil transferasa (LpxD). Una mutació en *lpxD* (*firA*) es va detectar l'any 1970, basada en la inversió de la resistència a la Rifampicina (Babinet, 1970). Aquests mutants es van anomenar *ssc* en *S. typhimurium* i *omsA* en *E. coli*.

#### **4.5 Formació del lípid X**

L'UDP-2,3-diacil-GlcN és el substrat de la reacció catalitzada per una pirofosfatasa que trenca l'enllaç pirofosfat donant lloc a 2,3-diacil-GlcN-1-fosfat (lípid X) i UMP.

El lípid X va ser descobert l'any 1979 per M. Nishajama i CRH Rætz com a precursor monosacàridic del lípid A. El 1983 es va determinar l'estructura com a 2,3-diacil-GlcN-1-fosfat (amb les posicions 2 i 3 acilades per àcid R-3-hidroxi-*miristic*). Aquest fet va ser crucial per l'elucidació de la biosíntesi del lípid A.

#### **4.6 Formació del disacàrid**

Aquesta reacció implica la condensació d'una molècula d'UDP-2,3-diacil-GlcN amb una molècula de lípid X per donar di-(2,3-diacil-GlcN)-1-P (disacàrid 1-P en la Figura 4.1). Aquesta reacció està catalitzada per una disacàrid sintasa (LpxB), que és la

responsable de transferir la porció 2,3-diacil-GlcN (del UDP-2,3-diacil-GlcN) a la posició 6 del lípid X generant la unió  $\beta(1' \rightarrow 6)$  que es troba en el lípid A.

Aquest enzim és incapaç de condensar dues molècules d' UDP-2,3-diacil-GlcN directament. Per això, la pirofosfatasa específica constitueix un altre component crític del sistema (Bulawa *et al.*, 1984). La disacàrid sintasa està codificada pel gen *lpxB*, que forma part del mateix operó que els gen *lpxD* i *lpxA* (Figura 4.1). El gen que codifica per la pirofosfatasa és desconegut.

#### 4.7 Formació del lípid IV<sub>A</sub>

Una quinasa específica unida a la membrana catalitza la reacció entre el disacàrid-1-P i ATP donant lloc a la formació del lípid IV<sub>A</sub> (disacàrid 1,4'-di-P) i l'alliberament d'ADP (Figura 4.1).

El lípid IV<sub>A</sub> posseeix algunes de les activitats biològiques de les endotoxines. El gen que codifica per a la 4'-quinasa no es coneix encara. La presència del grup fosfat en posició 4' és un requeriment imprescindible per a la transferència posterior de Kdo a través de l'enzim Kdo-transferasa (*waaA* o *kdtA*), que utilitza CMP-Kdo com a substracte.

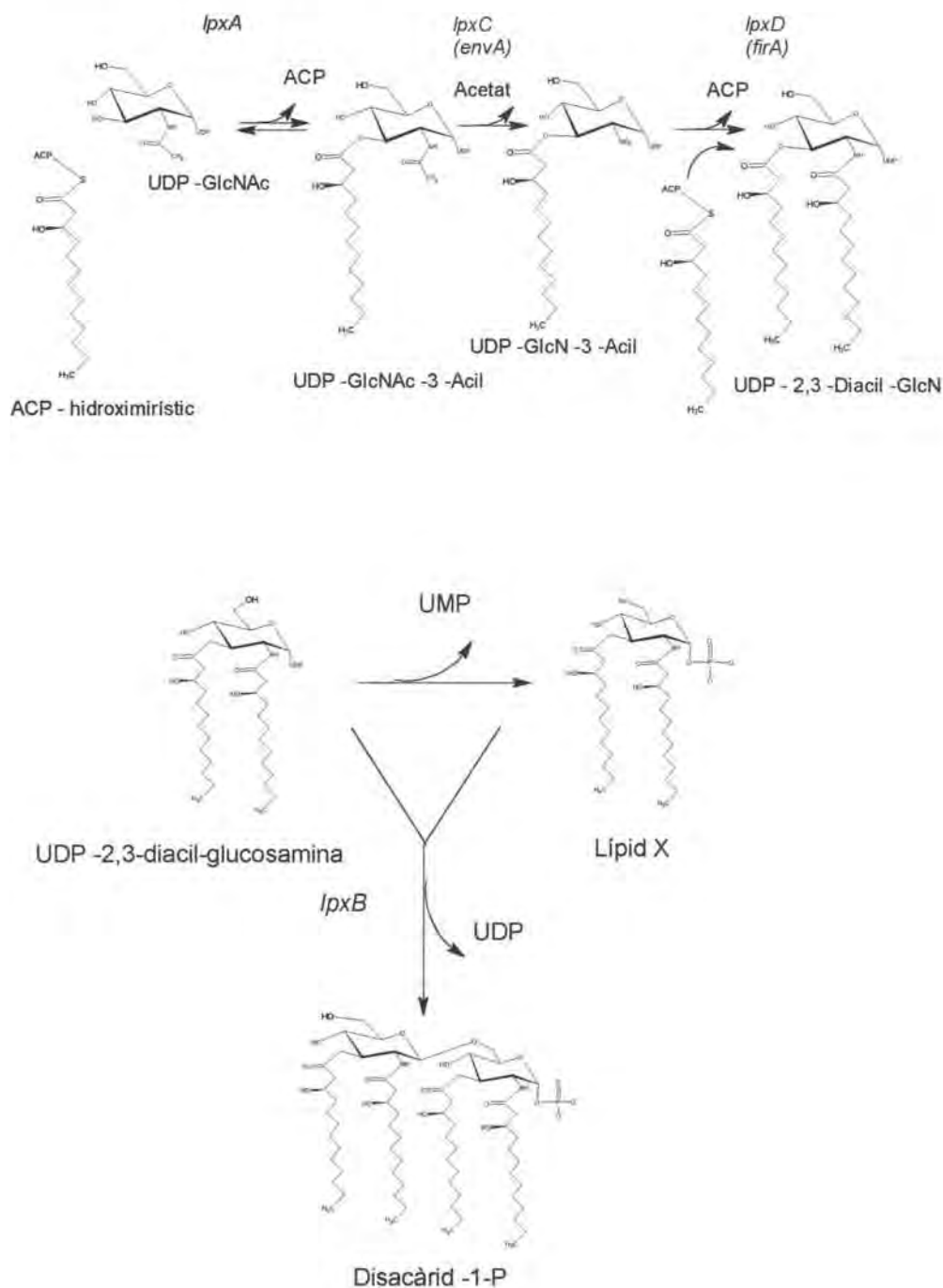
Tal com s'ha descrit en el capítol de l'estructura del lípid A (apartat 3.6), el lípid A de *Rhizobium leguminosarum* i d'algunes bacteries anaeròbiques (*Bacteroides fragilis*) no posseeix el grup fosfat en posició 4'. *R. leguminosarum* posseeix una 4'-quinasa. Aparentment, en *R. leguminosarum* es generen els mateixos intermediaris fosforilats que es troben a *E. coli* i posteriorment es produeix una defosforilació selectiva del Kdo<sub>2</sub>- lípid IV<sub>A</sub> 4'. S'ha demostrat que s'acumulen grans quantitats de lípid IV<sub>A</sub> en mutants deficients en Kdo transferasa o en cultius tractats amb inhibidors de la CMP-Kdo-sintasa. Això demostra el paper del lípid IV<sub>A</sub> com a acceptor de residus de Kdo en cèl.lules vives.

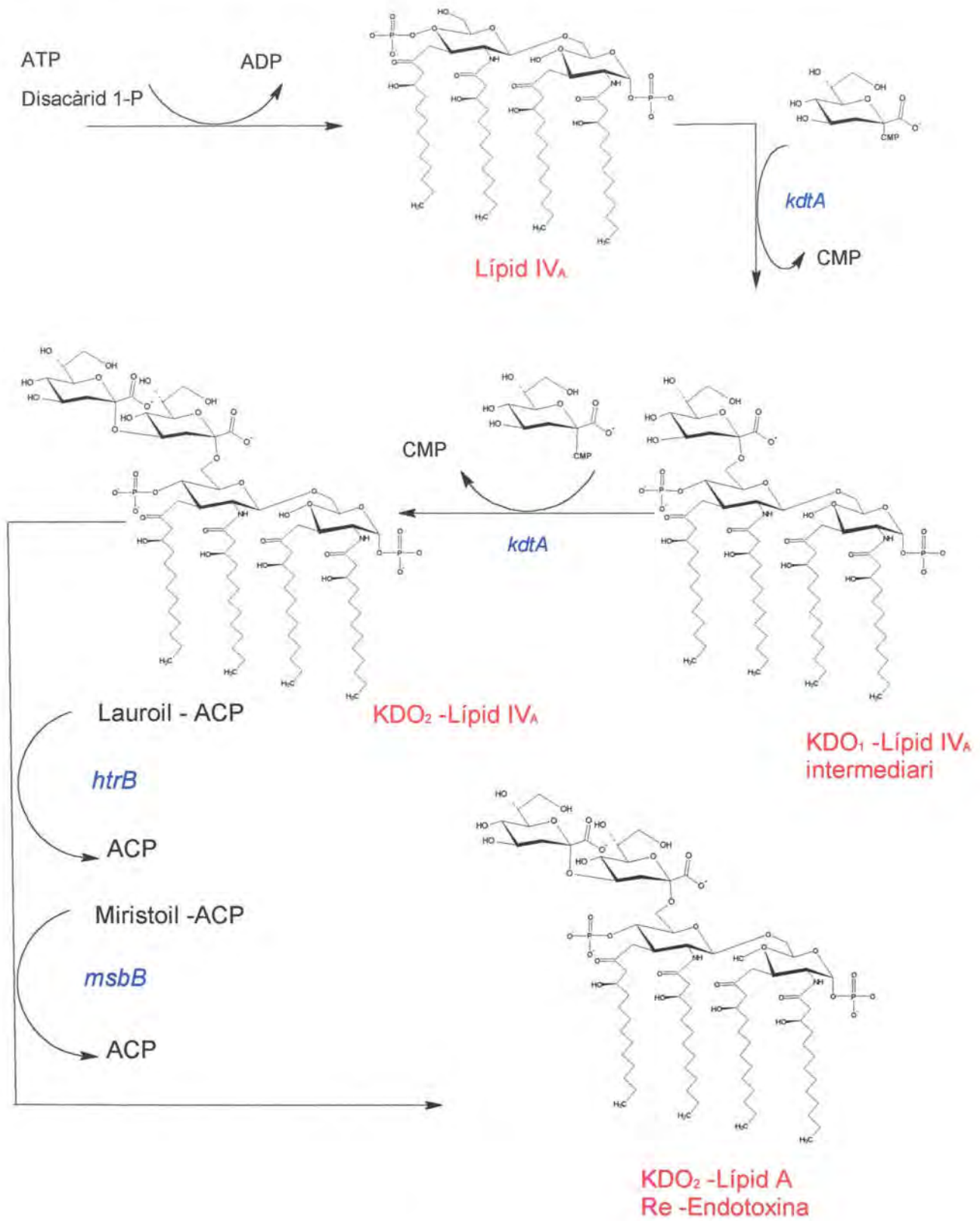
Tal i com s'ha descrit en l'apartat de l'estructura del lípid A, algunes soques d'*E. coli* i *Salmonella* posseeixen 4-aminoarabinosa unida al fosfat en posició 1 del lípid A. En aquestes soques s'ha identificat el locus *pmrA* com a responsable d'aquesta modificació. En general, aquestes modificacions redueixen la càrrega negativa total del lípid A i en alguns casos s'ha associat a la resistència a la Polimixina (Roland, 1994).

### 4.8 Acilació final

En els últims passos de la formació del lípid A s'incorporen dos residus, un d'àcid làuric i un altre d'àcid mirístic al Kdo<sub>2</sub>- lípid IV<sub>A</sub>. La primera acilació està catalitzada per l'enzim HtrB i genera lauroil-Kdo<sub>2</sub>-lípid IV<sub>A</sub>. La segona acilació està catalitzada per l'enzim MsbB i genera Kdo<sub>2</sub>-lípidA. Els residus d'àcid làuric i d'àcid mirístic procedeixen del lauroil-ACP i del miristoil-ACP.

**Figura 4.1** Reaccions de biosíntesi del lípid A.







## **5. BIOSÍNTESI DEL NUCLI DEL LIPOPOLISACÀRID**

### **5.1 Introducció**

Els enzims que generen l'estructura Kdo<sub>2</sub>-lípidA actuen seqüencialment i d'una manera definida. Cada enzim només pot actuar sobre el producte generat per l'enzim previ en la ruta de síntesi. Per exemple, la Kdo transferasa no actua abans que la 4'-quinasa i l'acilació final no té lloc abans de l'adició de Kdo.

L'ordre en la biosíntesi del nucli és menys estricte. Molts dels sucres s'incorporen seqüencialment però d'altres es poden incorporar independentment. Per exemple, l'heptosa es pot unir tant al Kdo<sub>2</sub>-lípidA com al Kdo<sub>2</sub>-lípidIV<sub>A</sub>, independentment de l'acilació final. Sota condicions limitants en la síntesi d'àcids grassos, la regió sencera del nucli es pot unir al Kdo<sub>2</sub>-lípidIV<sub>A</sub>. D'una manera similar, el nucli extern es pot formar encara que la regió de les heptoses no estigui fosforilada.

Aquestes rutes paral·leles en la biosíntesi del nucli donen lloc a la capacitat per generar diversitat d'estructures. Per tant, és interessant analitzar les diferents estructures aïllades sota condicions de creixement diferents o en animals infectats. Aquesta capacitat dels enzims per funcionar en paral·lel pot proveir la bactèria d'un mecanisme per crear diversitat estructural en la seva superfície. Aquesta flexibilitat pot incrementar les possibilitats de supervivència sota circumstàncies adverses o per evadir-se del sistema immune de l'hoste.

### **5.2. Biosíntesi del Kdo**

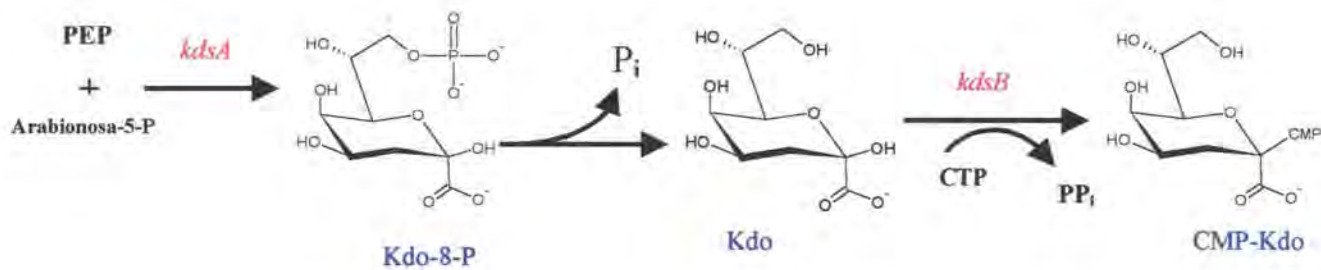
La biosíntesi del Kdo té lloc a través de dues reaccions catalitzades per enzims. En primer lloc, la Kdo-8-fosfat-sintasa, codificada pel gen *kdsA*, catalitza la condensació aldòlica entre D-arabinosa-5-P i l'àcid fosfoenolpirúvic (PEP) per donar lloc a Kdo-8-P. Posteriorment, una fosfatasa específica allibera el Kdo.

Abans de la incorporació del lípid A, el Kdo requereix ser activat a través de CTP. Aquesta reacció està catalitzada per la CMP-Kdo-sintasa, codificada per l'enzim *kdsB* (Figura 5.1)

Els gens *kdsA* i *kdsB* han estat clonats, seqüenciats i s'ha caracteritzat la seva funció en *E. coli* (Strohmaier, 1995 ) i *Chlamydia* (Wylie, 1997 ). S'han identificat els mateixos gens en *H. influenzae*. En tots els casos, la seqüència d'aminoàcids mostra un alt nivell d'identitat. Això indica que la ruta de biosíntesi i activació del Kdo en les bacteries Gram negatives estudiades està conservada.

Els gens *kdsA* i *kdsB* estan separats del cluster *waa* i estan situats en diferents posicions del cromosoma en *E. coli* i en *H. influenzae*. Donat que els productes dels gens estan involucrats en la mateixa ruta biosintètica, cal assumir que els dos gens estan regulats coordinadament. El gen *kdsA* en *E. coli* forma part d'un operó i es cotranscriu amb dues ORF (*open reading frame*) de funció desconeguda.

**Figura 5.1.** Biosíntesi de CMP-Kdo.



### 5.3 Transferència de Kdo al lípidIV<sub>A</sub>

Localitzada en la membrana citoplasmàtica de *S. enterica* Typhimurium, es va trobar una activitat enzimàtica que catalitzava la transferència seqüencial de residus de Kdo des del precursor CMP-Kdo al precursor lípidIV<sub>A</sub> donant lloc a una unió α-(2→6) entre la GlcN i el primer residu de Kdo i un enllaç α-(2→4) entre el segon Kdo i el primer residu de Kdo.

La formació dels dos enllaços glicosídics diferents està catalitzada per un enzim bifuncional (Belunis, 1992) anomenat Kdo-transferasa (KdtA o WaaA). El substrat per a la Kdo-transferasa pot estar acetilat en grau diferent, però ha de complir sempre amb el requeriment estructural del fosfat en posició 4'.

A més, estudis bioquímics en *Chlamydia* ssp (Löbau, 1995 ), que conté el trisacàrid format per Kdo (veure apartat 3.4) suggereixen que la Kdo-transferasa (codificada pel

gen *gseA*) és capaç d'unir tres residus de Kdo al lípidIV<sub>A</sub>. La proteïna KdtA posseeix regions d'homologia amb la proteïna GseA. En *E. coli* K-12 el gen *gseA* pot complementar el mutant condicional *kdtA*<sup>-</sup> i l'expressió del gen *gseA* en *E. coli* dona com a resultat l'adició de tres residus de Kdo en el nucli.

Les proteïnes WaaA de les *Enterobacteriaceae* són gairebé idèntiques quant a pes molecular i punts isoelèctric tot i que si es comparen les seqüències d'aminoàcids de totes les Kdo-transferases s'observa un nivell baix de similitud. En el cas de les Kdo-transferases en el gènere *Chlamydia*, el grau de similitud entre elles és bastant baix, tot i que les tres duen a terme la mateixa funció.

En el cas d'*H. influenzae* i *B. pertussis* (veure apartat 3.4) només un residu de Kdo està present en el LPS. White *et al.* (1993) van caracteritzar una Kdo-transferasa monofuncional.

## 5.4 Biosíntesi de la regió de les heptoses

Els treballs publicats sobre la síntesi enzimàtica de la regió de les heptoses del nucli il·lustren algunes limitacions en aquest camp. Estudis en l'epimerasa i en les heptosiltransferases no han usat el precursor sintètic ADP-L-(o D)-glicero-D-manno-heptosa com a substrat. Tots els treballs han usat extractes d'ADP-heptosa obtinguda a partir de cèl·lules.

### 5.4.1 Síntesi i activació de l'heptosa

Abans de ser transferida al nucli intern, l'ADP-L-glicero-D-manno-heptosa (ADP-L,D-Hep) es sintetitza a partir de pseudoheptulosa-7-fosfat (Sed-7-P) en una reacció formada per 4 passos (Figura 5.2).

En primer lloc, la Sed-7-P es converteix en D-glicero-D-manno-heptosa-7-P (D,D-Hep-7-P) a través d'una fosfoheptosa-isomerasa.

A continuació, una fosfoheptosa mutasa converteix la D,D-Hep-7-P en D,D-Hep-1-P.

En el tercer pas, l'ADP-heptosa-sintasa (RfaE) catalitza la reacció que genera ADP-D,D-Hep. L'ADP-D,D-Hep es converteix en ADP-L,D-Hep a través d'una epimerasa (RfaD o GmhD).

Les soques bacterianes defectives en els enzims que converteixen Sed-7-P en ADP-D,D-Hep produeixen LPS sense heptosa. Les mutacions en el gen de l'epimerasa (*gmhD*) donen lloc a un fenotip que inclou la D,D-Hep en el LPS.

Un número considerable d'anàlegs funcionals i estructurals de les proteïnes RfaE i GmhD s'han trobat en diverses bactèries Gram negatives. Això indica que la ruta de síntesi i activació de l'heptosa està conservada en bactèries poc relacionades. Per exemple, la seqüència d'aminoàcids predita per *gmhD* de *P. aeruginosa* és gairebé idèntica a la d'*E. coli*. El gen *gmhD* de *P. aeruginosa* es va clonar i va complementar una mutació en el gen *gmhD* en *E. coli*. El gen *rfaE* està localitzat a continuació del gen *waaM* en *H. influenzae* i sembla que els dos gens estan co-transcrits. En el cas de *N. gonorrhoeae* es van trobar els gens *rfaE* i *gmhD* adjacents entre ells i podrien formar una unitat transcripcional. En el cas de les *Enterobacteriaceae* el gen *gmhD* està situat en la part terminal esquerra del cluster *waa* (Figura 5.3).

#### **5.4.2 Transferència d'ADP-L,D-Hep al KdoI**

La transferència de l'ADP-L,D-Hep al primer Kdo està catalitzada per l'heptosiltransferasa I, codificada pel gen *waaC* (*rfaC*) en les *Enterobacteriaceae*, formant l'enllaç  $\alpha$ -(1→5). Encara no se sap amb exactitud si la transferència de la primera heptosa es duu a terme abans o després de l'acilació del Kdo<sub>2</sub>-lípidIV<sub>A</sub> o si l'heptosiltransferasa I i les aciltransferases poden actuar la mateix temps en *S. enterica* i en *E. coli* d'acord amb estudis bioquímics realitzats.

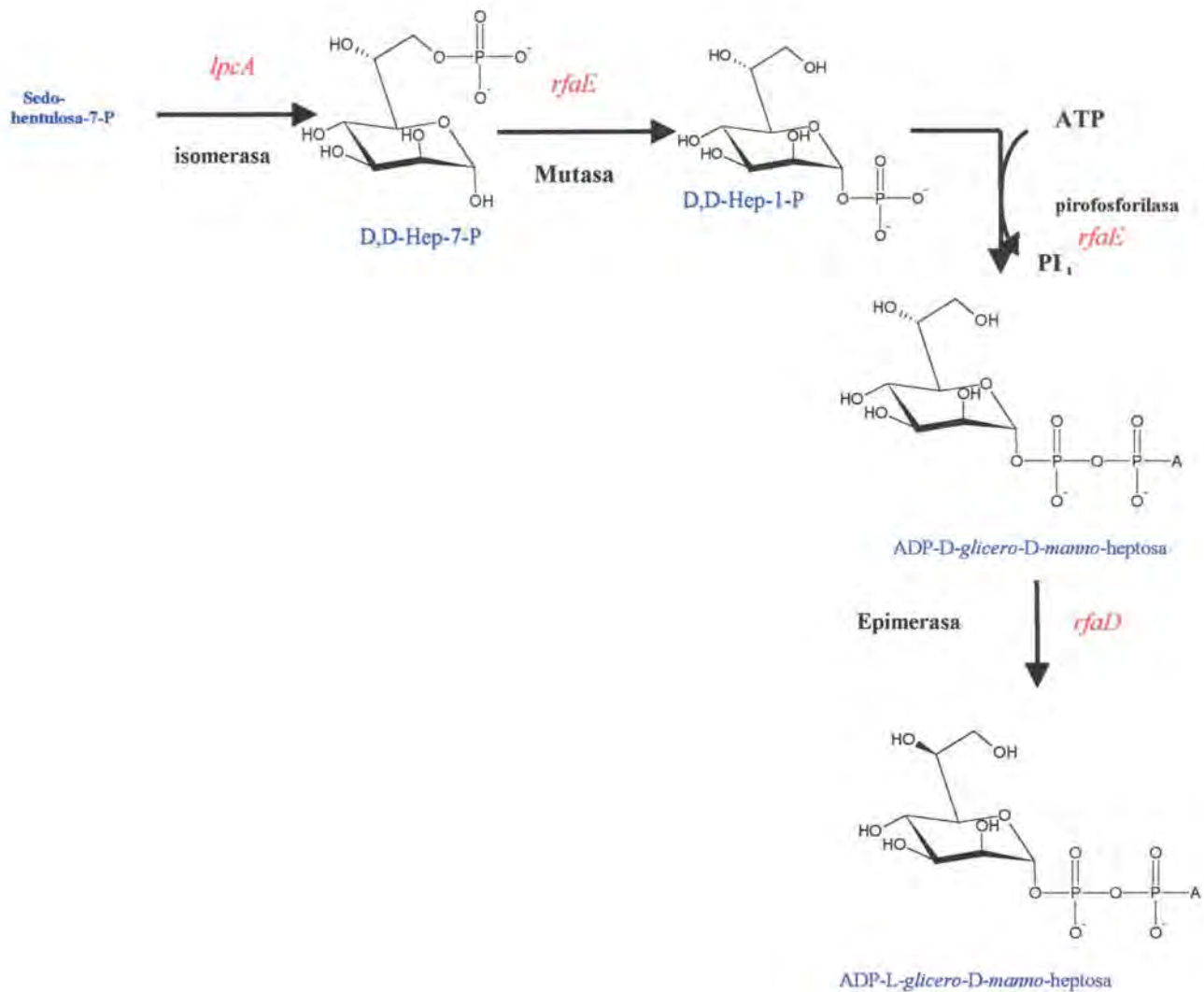
Anàlisis per mutagènesi, assaigs per complementació, clonatge i seqüenciació han posat de manifest que la proteïna WaaC anàloga a *E. coli* i *Salmonella* està present també en *N. gonorrhoeae* (Hood *et al.*, 1996 ), *H. influenzae* (Allen *et al.*, 1996 ), *B. pertussis* (Zhou *et al.*, 1994 ) i *Klebsiella pneumoniae* (Abitiu, tesi doctoral en preparació).

#### **5.4.3 Transferència de l'HepII**

La transferència de la segona heptosa està catalitzada per la proteïna WaaF formant l'enllaç  $\alpha$ (1→3) entre les dues heptoses. El gen que codifica per l'heptosiltransferasa II, *rfaF* o *waaF* s'ha identificat en *E. coli* i *Salmonella* i també en *N. gonorrhoeae*,

*N.meningitidis*, *H. influenzae* i *Klebsiella pneumoniae* (Abitiu, tesi doctoral en preparació).

Figura 5.2 Ruta de biosíntesi proposada per a l'ADP-L-glicero-D-manno-heptosa.



#### 5.4.4 Transferència de l'Hep III

La proteïna WaaQ és la responsable de l'adició del tercer residu d'heptosa a l'HepII a través d'un enllaç  $\alpha(1\rightarrow7)$ .

Mutants en el gen *waaQ* (*rfaQ*) han permès definir un tipus de LPS rugós anomenat lipooligosacàrid (LOS), basant-se amb la similitud amb els lipooligosacàrids d'*Haemophilus* i *Neisseria* (els quals produeixen un LPS sense unitats de repetició com a antigen O i amb un complex oligosacàridic unit al lípid A). Les soques amb

mutacions en el gen *rfaQ* són sensibles als fags U3 i resistents a la Novobiocina i presenten un fenotip Rd.

Les proteïnes WaaC i WaaF posseeixen regions homòlogues i les dues, alhora, posseeixen regions comunes a les proteïnes WaaQ i KdtA. Per tant, aquestes quatre proteïnes podrien pertànyer a la mateixa família de proteïnes relacionades, totes elles implicades en la transferència de Kdo o heptosa. A diferència del KdtA, les proteïnes WaaQ, WaaF i WaaC no posseeixen un domini transmembrana significatiu capaç de servir com a anclatge en la membrana citoplasmàtica.

Les proteïnes WaaC i WaaF en *S. enterica* Typhimurium comparteixen més del 70 % d'identitat amb les proteïnes corresponents en *E. coli* K-12. Una regió propera a l'extrem C-terminal de la proteïna WaaC és gairebé idèntica en els dos organismes. El gen *waaC* clonat en *E. coli* K-12 és capaç de complementar la mutació *waaC* en *S. enterica* Typhimurium.

Els gens *waaDFCL* constitueixen un operó dintre del cluster *waa*, tant en *E. coli* com en *S. enterica* Typhimurium. El gen *waaQ*, en canvi, és el primer del segon operó que conté deu gens (Figura 5.3). Aquest segon operó és adjacent a l'operó *waaDFCL* i es transcriu en direcció oposada (Figura 5.3).

#### **5.4.5 Reaccions de fosforilació**

Les proteïnes WaaP i WaaY semblen ser les responsables de les reaccions de fosforilació del nucli intern, tot i que la seva funció no s'ha demostrat completament.

La reacció de fosforilació a nivell de l'HepI podria venir donada per la proteïna WaaP. El gen que codifica per aquesta proteïna, *waaP*, està situat en *E. coli* i *S. enterica* Typhimurium en el segon operó, el primer gen del qual és el *waaQ* (Figura 5.3).

S'ha observat que un residu de  $\gamma$ -fosfat provinent d'ATP es transfereix a l'HepI. Tot i això, sembla que el gen *waaP* no codifica per a una quinasa. La proteïna WaaP no posseeix regions d'homologia amb quinases ni el lloc consensus d'unió a nucleòtids. Una de les hipòtesis és que la proteïna WaaP podria constituir una subunitat comuna necessària per algunes quinases o bé podria tenir una activitat acoplada a l'activitat quinasa.

Quant a la fosforilació de l'Hep II, sembla que la proteïna WaaY hi estaria involucrada. Aquesta proteïna posseeix un alt nivell de conservació tant en *E. coli* com en *S. enterica* Typhimurium i posseeix els trets característics de les quinases.

La proteïna WaaY posseeix un nivell d'identitat molt baix respecte la proteïna WaaP. En el mutant WaaY s'ha demostrat que l'HepII no està substituïda ni per fosfat ni per pirofosfoetanolamina. Això suggereix que WaaY és l'enzim responsable per la fosforilació de l'HepII.

En el cas de *Klebsiella pneumoniae*, en què l'estructura del nucli està desprovista de grups fosfats, no s'han trobats gens homòlegs al *waaY* i *waaP* (Climent, Tesi doctoral, 2000).

### **5.5 Biosíntesi del nucli extern**

En molts dels passos de la biosíntesi del nucli extern no es disposa de dades bioquímiques provinents de la purificació dels enzims de l'ús d'acceptors i productes de reacció purificats. Només s'han dut a terme estudis bioquímics complets en el cas de la proteïna WaaG en *E. coli* K-12 i les proteïnes WaaB i WaaI en el cas de *Salmonella*.

En general l'assignació de funcions dels gens s'ha dut a terme mitjançant anàlisi estructural del LPS del mutant o bé per estudis de complementació amb els gens clonats.

Els gens *waaGBIJK* estan implicats en la transferència seqüencial de residus de glucosa i galactosa com a sucres activats al nucli intern.

Les mutacions en les rutes de biosíntesi dels precursors activats (per exemple, UDP-Glc o UDP-Gal) afecten a la síntesi del nucli extern. Per exemple, mutants en el gen *pgs* (fosfoglucoisomerasa) i en el gen *galU* (UDP-glucosa pirofosforilasa) són incapaços de sintetitzar UDP-Glc i, per tant, el LPS no conté nucli extern.

Mutants en el gen estructural per a la UDP-galactosa-4-epimerasa (gen *galE*) són incapaços de sintetitzar UDP-galactosa en absència d'una font exògena de galactosa. Per tant, els mutants *galE* generen un LPS Rc, sense cap sucre distal al primer residu de glucosa. Aquest és el fenotip de la soca d'*E. coli* NM554 que s'ha utilitzat en aquesta tesi doctoral (Veure apartat dels resultats).

Els passos que es duen a terme en la biosíntesi del nucli extern es detallen a continuació.

### 5.5.1 Transferència de la GlcI al nucli intern

Tant en *E. coli* K-12 com en *S. enterica* Typhimurium el gen *rfaG* (*waaG*) codifica per a una glucosiltransferasa (heptosil LPS  $\alpha(1\rightarrow3)$ -glucosiltransferasa) que uneix un residu de Glc (GlcI) a partir de UDP-Glc al segon residu d'heptosa (HepII) del nucli intern (Parker *et al*, 1992) formant un enllaç  $\alpha(1\rightarrow3)$ .

Mutacions en el gen *waaG* confereixen un fenotip pleiotròpic que inclou la pèrdua del flagell, pilis, fimbries o supressió de l'expressió de proteïnes de membrana externa.

S'han identificat sis proteïnes WaaG anàlogues (en *E. coli* K-12, R2, R1, R4, R5 i en *S. enterica* sv. Typhimurium) i totes elles presenten alts nivells d'identitat. El gen *waaG* està situat en *E. coli* i *Salmonella* a continuació del gen *waaQ* (Figura 5.3). El gen *waaG* s'ha identificat també en *Serratia marcescens* (veure apartat 2 de resultats) i en *Klebsiella pneumoniae* (Climent, Tesi doctoral, 2000).

### 5.5.2 Transferència de Gal al residu de Glc I

La proteïna WaaB (UDP-Gal: glucosil LPS- $\alpha(1\rightarrow6)$ -galactosiltransferasa) catalitza la transferència de la ramificació de Gal a la GlcI a través d'un enllaç  $\alpha(1\rightarrow6)$  en el cas d'*E. coli* K-12, R2 i *Salmonella*. (Veure apartat 3.4).

La mutació en el gen *waaB* en *Salmonella* es pot complementar amb els gens *waaB* d'*E. coli* K-12 (Schnaitman i Klena, 1993). Les tres proteïnes WaaB que es coneixen estan molt conservades i estan situades en llocs similars dintre del cluster *waa* (Figura 5.3). En el cas de *E. coli* i *Salmonella*, el gen *waaB* es troba situat entre els gens *waaI* i *waaP*. El gen *waaB* també s'ha identificat en *Serratia marcescens* (present tesi doctoral) i en *Klebsiella pneumoniae* (Climent, tesi doctoral) però, sorprenentment, els nivells d'homologia amb els gens d'*E. coli* i de *Salmonella* són molt més baixos.

### 5.5.3 Transferència d'un residu de Gal a la GlcI en Salmonella

En *Salmonella*, la transferència d'un residu de galactosa a la GlcI mitjançant enllaç  $\alpha(1\rightarrow3)$  està catalitzada per la proteïna WaaI (UDP-Gal:glucosil LPS- $\alpha(1\rightarrow3)$ galactosiltransferasa) (Pradel *et al*, 1992).



El gen *waaI* es troba situat en el segon operó del cluster *waa*, entre els gens *waaJ* i *waaB*. La proteïna WaaI segurament necessita la presència de la Gal lateral per reconèixer la molècula acceptora. El gen *waaI* també s'ha identificat en *E. coli* R3 i per tant la proteïna WaaI sembla la encarregada de transferir també el residu de Gal a la GlcI en *E. coli* R3.

#### **5.5.4 Transferència del residu de GlcII en Salmonella**

La GlcII és transferida al residu de GalI mitjançant enllaç  $\alpha(1\rightarrow2)$ . Aquesta reacció està catalitzada per l'enzim WaaJ (UDP-Glc:galactosil LPS  $\alpha(1\rightarrow2)$ -glucosiltransferasa). Tot i que les proteïnes WaaI i WaaJ posseeixen alts nivells d'identitat, segurament es diferencien per l'especificitat del substracte. Sembla, a més, que la funció del gen *waaY* podria ser necessària per la funció del gen *waaJ*. El gen *waaJ* s'ha identificat també en *E. coli* R3 en què el nucli posseeix també la seqüència GlcII-GalI-GlcI.

#### **5.5.5 Addició d'un residu de GlcNAc lateral a la GlcII en Salmonella**

Es creu que la transferència del residu de GlcNAc a la GlcII està catalitzada per la proteïna WaaK (UDP- GlcNAc:glucosil LPS  $\alpha(1\rightarrow2)$ - GlcNActransferasa) en *S. enterica* Typhimurium Taula 5.1). En *E. coli* R2 també existeix aquesta substitució en quantitats no estequiomètriques (Heinrichs *et al*, 1998) i també s'ha identificat el gen *waaK*. Els enzims WaaK de *Salmonella* i *E. coli* R2 presenten nivells d'identitat i similitud molt alts. Aquest gen també podria ser el responsable per l'addició de la Glc amb enllaç  $\alpha(1\rightarrow2)$  en l'estructura del nucli de *Salmonella enterica* Arizonae (Veure apartat 3.4).

#### **5.5.6 Addició de la GlcII en E. coli K-12**

Aquesta reacció està catalitzada per la proteïna WaaO (anteriorment anomenada WaaI). El gen *waaO* també s'ha identificat en *E. coli* R1 i R2 el nucli de les quals posseeix el residu de GlcII unit a la GlcI (Taula 5.1).

### **5.5.7 Addició de la GlcIII en *E. coli* K-12**

Aquesta reacció podria estar catalitzada per la proteïna WaaR (UDP- Glc:glucosil LPS  $\alpha(1\rightarrow2)$ - glucosiltransferasa). La GlcIII terminal s'uneix a la GlcII per enllaç  $\alpha(1\rightarrow2)$ . S'ha determinat que la proteïna WaaR posseeix un parell de residus de Asp en les regions catalitiques que semblen jugar un paper important en la funció com a  $\alpha(1\rightarrow2)$ - glucosiltransferasa (Shibayama, 1999) (Taula 5.1). En *E. coli* R1 , la proteïna WaaT seria la responsable de l'addició d'un residu de Gal a la GlcII.

### **5.5.8 Transferència de l'HepIV en *E. coli* K-12**

La transferència de l'HepIV a la GlcIII es duu a terme mitjançant enllaç  $\alpha(1\rightarrow6)$ . Estudis recents suggereixen que aquest pas podria estar catalitzat per la proteïna WaaU, codificada pel gen *waaU* . El gen *waaU* és l'últim del segon operó en *E. coli* K-12 (Taula 5.1)

### **5.5.9 Transferència de GlcNAc a l'HepIV en *E. coli* K-12**

La tranferència de la GlcNAc a l'HepIV mitjançant enllaç  $\beta(1\rightarrow7)$  sembla que podria estar catalitzada també per l'enzim WaaU. En aquesta transferència, hi poden intervenir també els productes dels gens *wecA* (*rfe*) i *waaL*. El gen *wecA* codifica per a una GlcNAc-1-fosfat tranferasa que està implicada en els passos inicials de la biosíntesi de l'ECA i també d'alguns antígens O.

### **5.5.10 Transferència de residus laterals en *E. coli* R1, R3 i R4**

En *E. coli* R3 s'ha identificat el gen *waaD* el producte del qual podria transferir un residu de GlcNAc lateral al residu de Gal I i, alhora, el residu de GlcIII a la GlcII. La proteïna WaaD presenta un 70 % de similitud amb la proteïna WaaK de *Salmonella* i d'*E. coli* R2.

En *E. coli* R3 i R4 el residu de GalI està substituït per un residu de GalII mitjançant enllaç  $\alpha(1\rightarrow2)$ . L'enzim que catalitza aquesta reacció és la proteïna WaaW. En *E. coli* R1 un mutant *waaW* està mancat del residu de GalII. Les proteïnes WaaW d'*E. coli* R1 i R4 presenten un 93% d'identitat. El gen *waaV*, identificat en *E. coli* R1, estaria involucrat en l'addició d'un residu de  $\beta$ -Glc al nucli d'*E. coli* R1 mentre que l'addició del residu de  $\beta$ -Gal en *E. coli* R4 estaria catalitzada per la proteïna WaaX. Mutants en els gens *waaV* i *waaX* han permès definir les proteïnes WaaV i WaaX com a  $\beta$ -glicosil-transferases. Aquestes dues proteïnes, però, presenten baixos nivells de similitud (36 %).

### **5.5.11 Formació d'estructures de nucli alternatives (LOS)**

Es desconeix la funció associada a alguns gens del cluster *waa*. Per exemple, es desconeix el paper de les proteïnes WaaS i WaaZ en la biosíntesi del nucli d'*E. coli* K-12. Sembla que aquestes proteïnes podrien estar involucrades en la transferència de residus laterals la presència dels quals podria generar un nucli deficient en antigen O. A aquest nucli se l'ha anomenat lipooligosacàrid (LOS). Les proteïnes WaaS i WaaZ s'han proposat com a responsables de la transferència de L-Rha al KdoII. El gen *waaZ* també s'ha identificat en *Salmonella* i en *E. coli* R2. Per altra banda, la proteïna WaaQ també estaria involucrada en la formació d'aquests dos tipus de LPS ja que s'ha observat que mutants en el gen *waaQ* generen LPS deficients en antigen O.

## **5.6 Unió de l'antigen O al nucli**

La unió de l'antigen O al nucli es duu a terme a través de l'Hexosa distal del nucli extern i l'antigen O des del lípid portador de grups acils (bactoprenol o ACL).

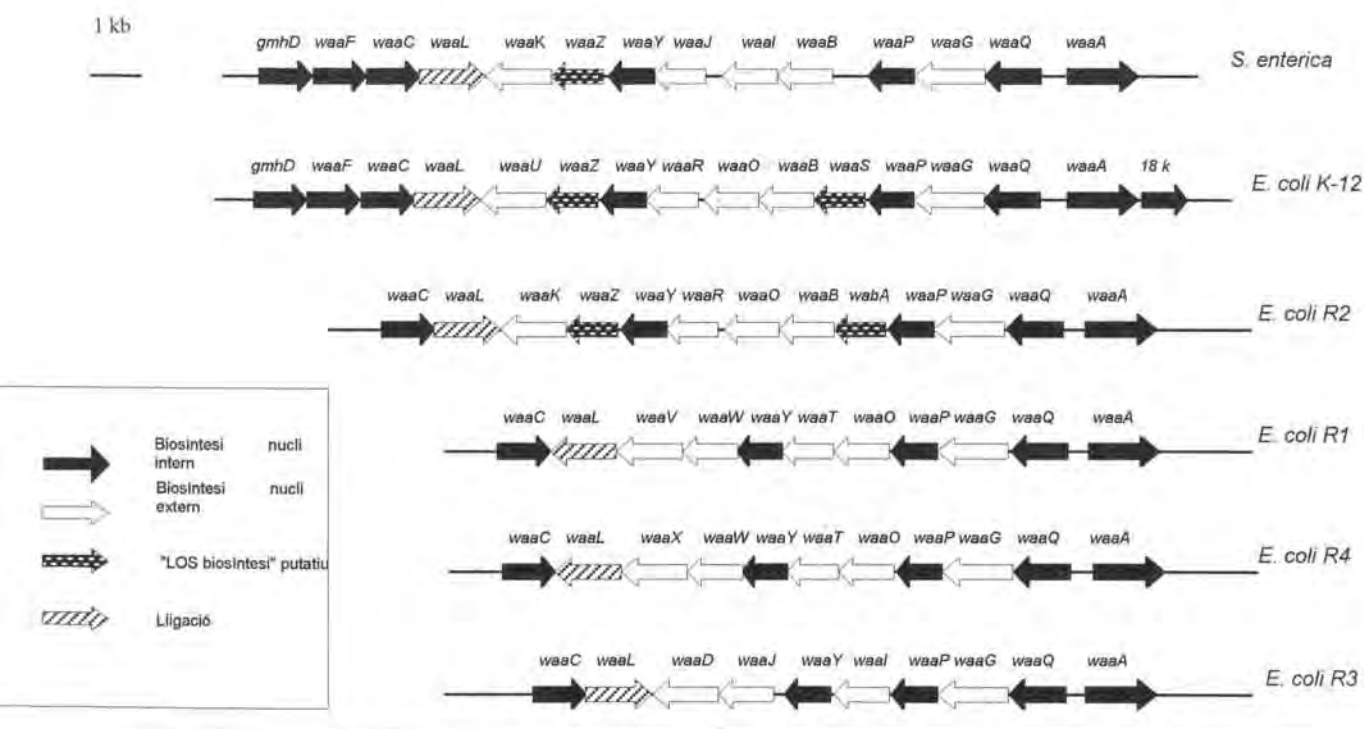
Sembla que la proteïna WaaL (codificada pel gen *waaL*) està implicada en aquesta unió i en la unió de l'ECA al LPS. La proteïna WaaL funciona segurament com a part d'un complex en què es donen interaccions molt específiques amb l'antigen O i amb l'acceptor lípid A-nucli. Com a part d'aquest complex, la proteïna WaaL estaria involucrada en la interacció proteïna-carbohidrat. Això pot explicar la gran diversitat de seqüències per aquesta proteïna (Heinrichs, 1998).

### 5.7 Determinants genètics de la biosíntesi del nucli del LPS.

En *E. coli* i *Salmonella*, els gens que codifiquen per a la biosíntesi del nucli del LPS s'agrupen en tres operons que constitueixen el cluster *waa*. Els operons s'anomenen segons el primer gen de la unitat transcripcional (*gmhD*, *waaQ* i *waaA*) (Figura 5.3). L'operó *gmhD* en *E. coli* K-12 està regulat per un promotor dependent de la temperatura. Això podria indicar que la biosíntesi de la regió de les heptoses en *E. coli* K-12 podria variar en funció de la temperatura de creixement.

Els operons *waaQ* i *waaA* es transcriuen en direccions oposades i estan separats per 400-500 pb. Una seqüència de 39 pb, anomenada JUMPStart (*Just Upstream of Many Polysaccharide-associated gene Starts*) s'han trobat abans de l'operó *waaQ*. Aquesta seqüència s'ha trobat també en operons associats a la síntesi i exportació d'altres estructures com ara els operons *kps* (síntesi i exportació de càpsula en *E. coli* grup II) o *rfb* (síntesi d'antigen O). La seqüència JUMPStart inclou una regió de 8pb anomenada *ops* que, junt amb la proteïna RfaH, és necessària per la supressió de la polaritat de l'operó. RfaH pot interaccionar amb Rho i amb la RNA polimerasa i formar un complex capaç d'extendre's més enllà de d'elements de terminació. En el cas de *Salmonella* i *E. coli*, mutants deficientes en RfaH produeixen molècules de LPS més curtes.

**Figura 5.3** Organització genètica de la regió involucrada en la biosíntesi del nucli del LPS en *E. coli* i *S. enterica* sv. Typhimurium.



**Taula 5.1** Estructures del nucli extern del LPS de *S. enterica* i *E. coli* juntament amb els seus determinants genètics.

<b><i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium</b>	
<i>waaJ</i>	<i>waaI</i>
↓	↓
GlcII-(1→2)-GalI-(1→3)-GlcI-(1→3)-HepII	
2	6
<i>waaK</i> →↑	↑← <i>waaB</i>
1	1
GlcNAc	GalII
<b><i>E. coli</i> K-12</b>	
<i>waaR</i>	<i>waaO</i>
↓	↓
GlcIII-(1→2)-GlcII-(1→3)-GlcI-(1→3)-HepII	
6	6
<i>waaU</i> →↑	↑← <i>waaB</i>
↓	1
1	1
β-GlcNAc-(1→7)-HepIV	GalI
<b><i>E. coli</i> R1</b>	
<i>waaT</i>	<i>waaO</i>
↓	↓
GalI-(1→2)-GlcII-(1→3)-GlcI-(1→3)-HepII	
2	3
↑	↑← <i>waaV</i>
<i>waaW</i> →1	1
GalII	β-Glc
<b><i>E. coli</i> R2</b>	
<i>waaR</i>	<i>waaO</i>
↓	↓
GlcIII-(1→2)-GlcII-(1→3)-GlcI-(1→3)-HepII	
2	6
<i>waaK</i> →↑	↑← <i>waaB</i>
1	1
GlcNAc	GalI
<b><i>E. coli</i> R3</b>	
<i>waaJ</i>	<i>waaI</i>
↓	↓
GlcII-(1→2)-GalI-(1→3)-GlcI-(1→3)-HepII	
2	3
<i>waaD</i> →↑	↑← <i>waaD</i>
1	1
GlcIII	GlcNAc
<b><i>E. coli</i> R4</b>	
<i>waaT</i>	<i>waaO</i>
↓	↓
GalI-(1→2)-GlcII-(1→3)-GlcI-(1→3)-HepII	
2	3
↑	↑← <i>waaX</i>
<i>waaW</i> →1	1
GalII	β-Gal

## 6. BIOSÍNTESI DE L'ANTIGEN O

L'antigen O es sintetitza independentment del lípid A i del nucli. La ruta de biosíntesi de l'antigen O varia en funció de:

- Els components requerits per l'inici de la biosíntesi (sistema WbaP dependent o sistema WecA dependent)
- La forma de polimeritzar (Wzx i Wzy dependent).
- La localització cel.lular de la reacció de polimerització (cara periplasmàtica o a la cara interna de la membrana citoplasmàtica).
- La via d'exportació a través de la membrana citoplasmàtica (sistema Wzy dependent o sistema wzy independent).

Els passos que se segueixen en la biosíntesi i ensamblatge de l'antigen O es descriuen a continuació.

### 6.1 Biosíntesi de monosacàrids activats

Els passos inicials en la biosíntesi del LPS estan constituïts per la síntesi dels residus de monosacàrids activats. En concret, els intermediaris UDP-Glc, UDP-Gal i UDP-GlcNAc poden servir com a donadors tant en la biosíntesi del nucli com en la biosíntesi de l'antigen O. Tal com es mostra en la Figura 6.1, els monosacàrids activats es sintetitzen en reaccions successives on intervenen enzims implicats en el metabolisme central de la bactèria.

La ramnosa s'incorpora a l'antigen O en forma de dTDP-L-Rha. Per a la seva biosíntesi es parteix de Glc-1-P i es necessita l'actuació seqüencial dels enzims:

RmlA: glucosa-1-P-timidiltransferasa

RmlB: dTDP-D-glucosa-4,6-dehidratasa

RmlC: dTDP-6-deoxi-D-glucosa-3,5-epimerasa

RmlD: dTDP-6-deoxi-L-manosa-dehidrogenasa

En els membres de la família *Enterobacteriaceae* els gens homòlegs a *rmlA* i *rmlB* es troben situats en el cluster *wca*, implicat en la biosíntesi de l'ECA. Per altra banda, les

dues reaccions inicials són comunes per a la biosíntesi de dTDP-L-Rha, dTDP-Fuc-4-NAc, dTDP-ViNAc i dTDP-6-dAlt.

La biosíntesi de GDP-Man sucre parteix de la fructosa-6-P (Fru-6-P) i hi actuen tres enzims diferents: ManA (Man-6-P-isomerasa), ManB (Fosfomanomutasa), ManC (Man-1-P-guanidiltransferasa). Reaccions addicionals a partir de GDP-Man donen lloc a la biosíntesi de GDP-L-Fuc, GDP-Col, GDP-Per i GDP-D-Rha, necessaris per a la biosíntesi dels antigens.

Per a la biosíntesi de la CDP-Abequosa es requereix Glc-1-P i els cinc enzims següents: DdhA (D-Glc-1-P-citidiltransferasa), DdhB (CDP-Glc-4,6-dehidratasa), DdhC (CDP-4-cet-6-D-Glc-3-dehidratasa), DdhD (CDP-6-deoxi- $\delta$ -3,4-Glc-reductasa) i Abe (CDP-Abesintasa).

Hi ha altres reaccions que parteixen de la mateixa via i porten a la síntesi de CDP-Par i CDP-Tyv. En la Figura 6.1 es poden veure les rutes biosintètiques que donen lloc a la formació de *N*-Acetil-glucosamina (UDP-GlcNAc) i galactosa (UDP-Gal).

## ***6.2 Inici de la biosíntesi de l'antigen O***

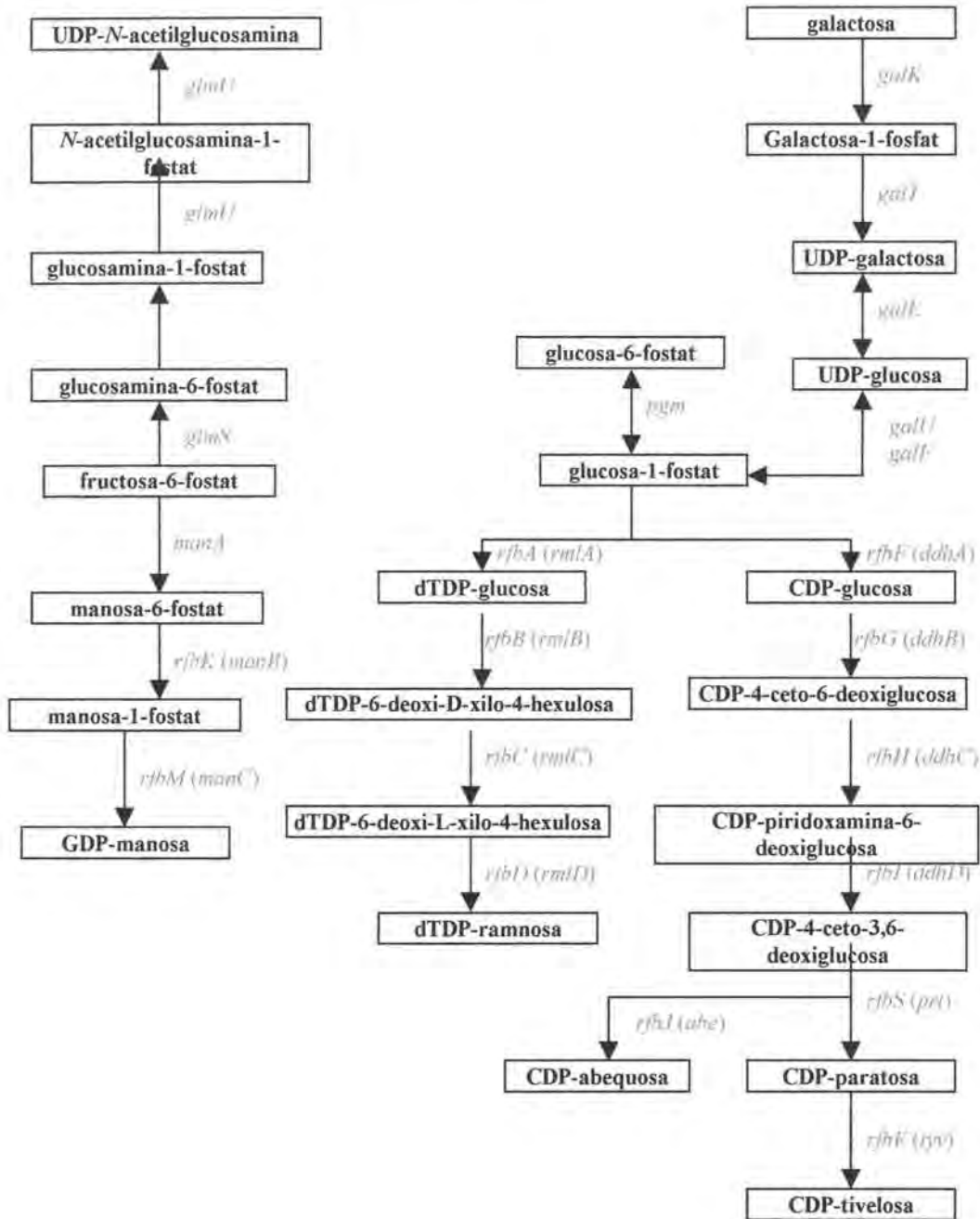
En funció de com s'uneix el primer sucre al bactoprenol o ACL (Antigen-Carrier lípíd) es distingeixen dos mecanismes diferents:

### ***6.2.1 Antigen O WbaP depenents***

Aquest sistema es dona per antigens heteropolisacarídics, formats per unitats de 3, 4, 5 o 6 sucres, sovint ramificats. Les unitats solen estar repetides de 25 a 40 vegades. És el cas dels antigens de *S. enterica* A,B,D i E (Veure apartat de l'estructura de l'antigen O). La primera reacció està catalitzada per la proteïna WbaP (RfbP), una galactosiltransferasa que catalitza la transferència reversible de Gal-1-P des d'UDP-Gal-P al ACP-P, donant lloc a Gal-P-P-ACL (Figura 6.2)

A diferència de les glicosiltransferases que uneixen els sucres activats, la proteïna WbaP conté cinc dominis transmembrana. La seva estructura i funció són diferents de les de les altres glicosiltransferases.

**Figura 6.1** Rutes de biosíntesi de monosacàrids activats mitjançant reaccions successives on intervien enzims implicats en el metabolisme central de la bactèria.



### 6.2.2 Antigen O *WeeA* dependents

Aquest sistema es dona tant per antigens heteropolisacàridics com per antigens homopolisacàridics. Dintre dels antigens heteropolisacàridics destaquen *S. dysenteriae* tipus I, *Shigella flexneri*, *Salmonella* C1 i molts antigens d'*E. coli* (Veure apartat



d'estructura). Dintre dels antigens homopolisacàridics s'inclouen els serotipus O8 i O9 d'*E. coli* i el serotipus O1 de *Klebsiella pneumoniae*.

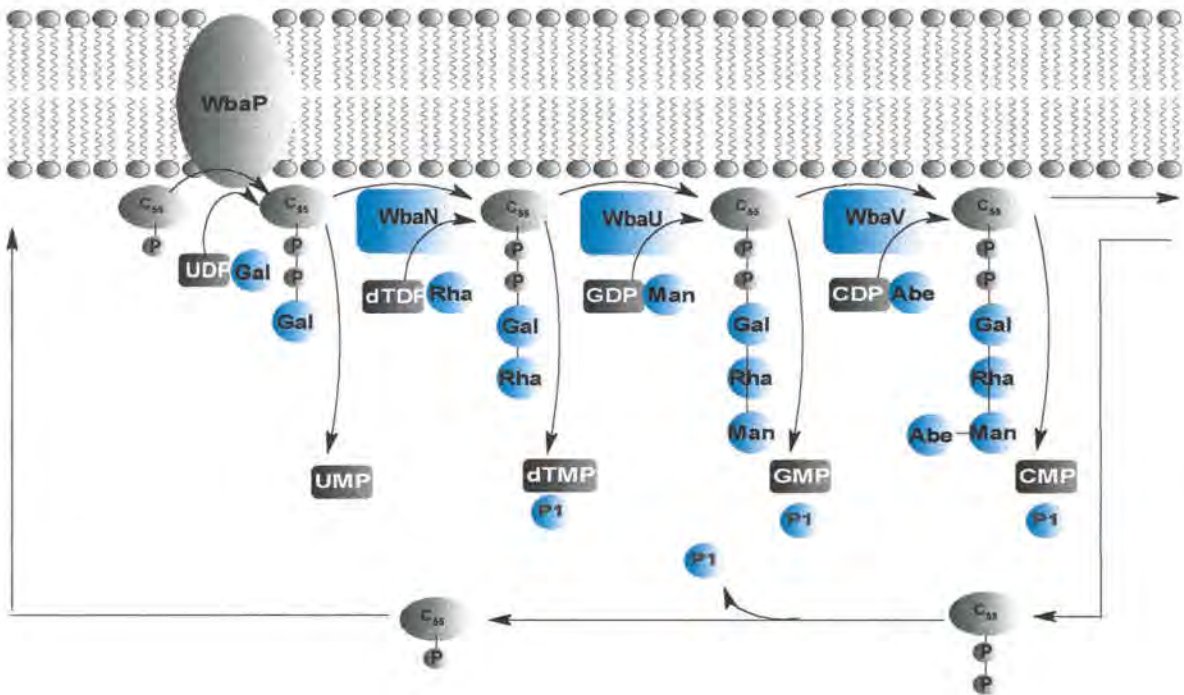
L'inici de la biosíntesi de l'antigen O ve donada per la proteïna WecA (Rfe), una *N*-AcetilGlcN-1-P-transferasa. Aquest enzim catalitza la transferència reversible del primer residu, AcetilGlcN-1-P, al ACL-P. La proteïna WecA té, a més, altres funcions: està involucrada en la síntesi de polisacàrids de la superfície cel·lular que generalment es co-expressen amb l'antigen O (com ara l'antigen T<sub>1</sub> de *Salmonella* i l'antigen comú de les *Enterobacteriaceae* (ECA).

### **6.3 Biosíntesi de les unitats de repetició**

Tots els sucres activats es sintetitzen a través d'enzims citosòlics i l'ensamblatge per donar unitats de repetició es duu a terme en la cara citoplasmàtica de la membrana citoplasmàtica. A més, s'ha observat que les transferases que uneixen el sucre no contenen dominis transmembrana.

Les glicosiltransferases són enzims altament específics quant al tipus de sucre que transfereixen i a l'enllaç que formen. Per tant, la formació de les unitats de repetició es duu a terme en reaccions seqüencials, cada una de les quals està mediada per glicosiltransferases específiques. La transferència seqüencial dels residus de sucres té lloc en l'ACL, que s'ha identificat com a un alcohol poliisoprenoid C<sub>55</sub> undecaprenil pirofosfat.

**Figura 6.2.** Biosíntesi de les unitats de repetició en *S. enterica* Typhimurium (Grup B).



### 6.4 Translocació de les unitats de repetició i polimerització en antigens heteropolisacàridics

Com ja s'ha vist, l'inici de la síntesi de les unitats de repetició es pot dur a terme pel sistema WbaP o WecA per als antigens heteropolisacàridics. La unió de les unitats de repetició en el cas dels antigens heteropolisacàridics depèn de l'enzim Rfc (Wzy), codificat pel gen *wzy* (*rfc*). Aquest enzim duu a terme l'enllaç covalent entre les unitats de repetició unides al ACL-P. Wzy és una proteïna integral de membrana amb 10-11 dominis transmembrana (Figura 6.3). Els mutants en el gen *wzy* en *Salmonella* presenten el fenotip SR, és a dir, el LPS només conté una sola unitat de repetició.

La biosíntesi de les unitats de repetició es dona en la cara interna de la membrana citoplasmàtica i la reacció de polimerització té lloc en la cara periplasmàtica. Per tant, és

necessari que les unitats es transloquin des de la cara citoplasmàtica fins a la cara periplasmàtica on seran polimeritzades i unides al nucli del LPS.

La translocació a la cara periplasmàtica ve donada per la proteïna Wzx (RfbX). Aquesta proteïna conté diversos dominis transmembrana. La proteïna Wzx s'ha descrit com una flipasa que participa en la transferència de les unitats de repetició unides al ACL-P des de la cara interna de la membrana citoplasmàtica fins a la cara periplasmàtica de la membrana citoplasmàtica (Figura 6.3).

En el cas de *Salmonella enterica* serogrup B i E s'ha descrit l'existència d'un complex transmembrana format per WecA, Wzx i WaaL (enzim que forma l'enllaç entre l'antigen O i el nucli extern) i la proteïna Wzz (Rol).

### **6.5 Regulació de la polimerització de l'antigen O**

La distribució de la cadena d'antigen O no és uniforme sinó que sovint presenta una distribució bimodal en què unes determinades longituds de la cadena predominen sobre unes altres. Sembla que el gen *wzz* (*rol* o *clb*) codifica per al regulador de la longitud de la cadena d'antigen O. La proteïna Wzz podria actuar segons dos esquemes diferents dintre del sistema mediat per Wzy.

El primer model considera que Wzz actua en coordinació amb Wzy. Wzy podria existir en dos estats funcionals diferents: E i T. L'estat E afavoreixeria la transferència de les unitats a WaaL (que catalitza la unió de l'antigen al LPS). La proteïna Wzz desplaçaria Wzy de l'estat E fins a l'estat T. En funció de l'activitat en l'estat E es produirien diferents modalitats d'antigen O, que es diferenciarien en el número d'unitats polimeritzades.

En el segon model, la proteïna Wzz actuaria com a xaperona, facilitant la interacció entre Wzy i WaaL. La proporció de Wzy i WaaL determina la longitud de la cadena O. En absència de Wzz el complexe Wzy-WaaL tindria una proporció constant de les dues proteïnes i això provocaria una distribució no-modal.

## **6.6 Unió de l'antigen O al nucli-lípid A**

Una vegada completada la síntesi de la cadena d'antigen O es produeix l'enllaç covalent entre l'antigen O i l'estructura nucli-lípidA. Aquesta unió sembla estar catalitzada per l'enzim WaaL i té lloc en la cara periplasmàtica de la membrana citoplasmàtica.

Després de la unió, la molècula sencera de LPS és translocada a la superfície cel·lular a través de mecanismes que encara no es coneixen.

## **6.7 Translocació dels antigens homopolisacarídics**

L'inici de la síntesi dels antigens homopolisacarídics es duu a terme mitjançant la proteïna WecA, que catalitza l'enllaç covalent entre GlcNAc i ACL-P. La unió posterior dels monosacàrids activats a l'extrem no reductor de l'antigen O es duu a terme de forma seqüencial. A aquest mecanisme d'unio se l'anomena *processiu* i en ell no intervenen les proteïnes Wzx i Wzy. Per tal que l'antigen O sigui unit al nucli-lípidA, la cadena sencera és translocada des de la cara interna fins a la cara periplasmàtica de la membrana citoplasmàtica.

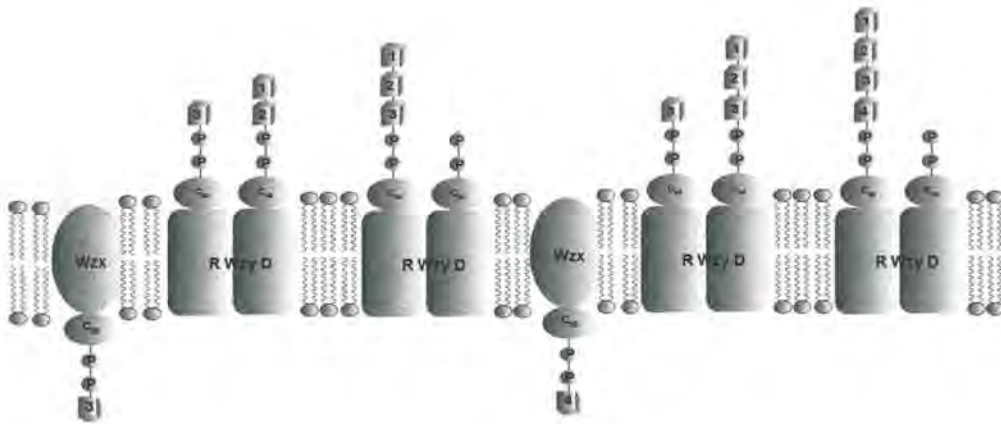
L'exportació de l'antigen O sencer té lloc a través d'un sistema format per dues proteïnes: una proteïna integral de membrana que actua com a transportador i una proteïna perifèrica de membrana citoplasmàtica que uneix i hidrolitza ATP aportant així energia al sistema. Aquest sistema de transportadors s'anomena ABC (ATP-binding cassete). Dintre de les famílies de transportadors ABC, el transportador dels antigens homopolisacarídics pertanyen a la família ABC-2. En aquest sistema, el mecanisme que modula la longitud de la cadena no es coneix. Sembla que hi ha una selecció de les molècules en funció de la grandària requerida pel transportador ABC. Sembla que no existeix un gen responsable per la determinació de la longitud de la cadena.

## **6.8 Translocació de l'antigen O en *S. enterica* Borreze**

Tal i com s'ha descrit en l'apartat d'estructura de l'antigen O, *S. enterica* sv Borreze (O:54) posseeix un antigen O format per un polímer de *N*-Acetilmanosamina. Per la síntesi i translocació d'aquest antigen O, s'ha proposat un nou mecanisme d'acció.

L'inici de la biosíntesi està catalitzat per la proteïna WecA i la polimerització és Wzy-depenent. Després de l'actuació de WecA, la proteïna WbbE transfereix un residu de *N*-Acetil-manosamina al ACP-P-P-GlcNAc. A continuació la proteïna WbbF podria dur a terme una doble funció com a glicosiltransferasa i com a translocasa de l'antigen O format. Existeixen altres proteïnes bifuncionals (transferasa/translocasa) implicades en la biosíntesi de quitina i cel·lulosa.

**Figura 6.3.** Sistema Wzy depenent proposat per la translocació i polimerització de les unitats de repetició.



## 7. LA BACTERIOCINA 28b DE *Serratia marcescens* I EL LPS

*Serratia marcescens* produeix bacteriocines sota la inducció amb agents que causen danys a l'ADN.

La bacteriocina 28b, produïda per la soca *Serratia marcescens* N28b (Gargallo, 1989) ha estat estudiada pel grup d'investigació del Dr. Miquel Regué. Tot i que la bacteriocina 28b presenta una gran homologia amb les colicines formadores de porus,

quan es clona en *E. coli* presenta un comportament diferent a les altres colicines quant a inducció, secreció i immunitat. La producció de bacteriocina 28b s'indueix per agents que causen danys a l'ADN. Aquesta inducció depèn del sistema SOS (Ferrer *et al.*, 1996; Ferrer, 1995). Una vegada sintetitzada, s'exporta a l'exterior de la cèl.lula productora com un únic polipèptid que queda fixat electrostàticament a la membrana externa (Enfedaque *et al.*, 1996).

El gen que codifica per a la bacteriocina 28b (*bss*) es troba situat en el cromosoma i s'ha clonat en *E. coli*, seqüenciat i s'ha determinat que codifica per a una proteïna de 449 aminoàcids amb un pes molecular de 47,5 kDa. (Viejo *et al.*, 1992).

La caracterització dels receptors i de la via de translocació s'ha dut a terme mitjançant mutants resistents i tolerants a les soques d'*E. coli* inicialment sensibles a la bacteriocina. (Enfedaque *et al.*, 1995).

S'ha determinat que el principal receptor de la bacteriocina 28b és la proteïna OmpA i que la porina OmpF també s'hi troba implicada. La molècula del LPS (tant l'antigen O com el nucli) també està relacionada amb la recepció del bacteriocina (Enfedaque *et al.*, 1996). Les mutacions en els gens *tolQ*, *tolA* i *tolB* generen fenotips de tolerància a la bacteriocina 28b indicant que la via de translocació depèn de les proteïnes TolQ, TolA i TolB localitzades en la membrana citoplasmàtica.

Guasch (1994) va identificar clons recombinants resistents a la bacteriocina i al sèrum que contenen gens implicats en la biosíntesi de molècules de la membrana externa de *S. marcescens*. Això suggerí que no existia un gen d'immunitat a la bacteriocina. El mecanisme pel qual *S. marcescens* N28b és resistent a la bacteriocina 28b es basa en l'absència de receptors adequats en la seva membrana externa.

L'expressió de gens que puguin modificar les proteïnes de la membrana externa implicades en la recepció de la bacteriocina pot conferir un fenotip de resistència a la bacteriocina. Així, s'han obtinguts clons de *E. coli* resistents a la bacteriocina que transportaven els següents determinants genètics:

- Gen *Omp4*, que codifica per a una proteïna de membrana externa de *S. marcescens* (Guasch *et al.*, 1995).
- Gen *OmpK17*, que codifica per a una proteïna de membrana externa de *K. pneumoniae* (Climent *et al.*, 1997).

- Gens implicats en la biosíntesi del nucli del LPS de *K. pneumoniae* (Climent, Tesi Doctoral, 2000).
- Gens implicats en la biosíntesi del nucli del LPS de *S. marcescens* (Guasch *et al*, 1996, i resultats en la present Tesi Doctoral).
- Gens implicats en la biosíntesi de l'Antigen O de *Serratia marcescens* (Saigi, 1999).

# Objectius

---



## **OBJECTIUS**

- 1.- Caracterització genètica del cluster *waa* de *Serratia marcescens* N28b.
- 2.- Identificació del gen *waa* responsable del fenotip de resistència a la bacteriocina 28b en *E. coli*.
- 3.- Estudi químic del LPS d'*E. coli* que confereix resistència a la bacteriocina 28b.
- 4.- Estudi químic del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b.

# Material i Mètodes

---

## 1. SOQUES BACTERIANES UTILITZADES

En les Taules 1.1 , 1.2 i 1.3 es descriuen les soques utilitzades en el present treball (les seves característiques principals, la seva procedència o referència). Les característiques genotípiques s'indiquen amb cursiva i minúscula i les característiques fenotípiques s'expressen en majúscula.

**Taula 1.1** Soques de *Serratia marcescens* utilitzades en aquest treball

SOCA BACTERIANA	CARACTERÍSTIQUES	REFERÈNCIA/ PROCEDÈNCIA
<i>Serratia marcescens</i> N28b	Soca salvatge, serotip O <sub>4</sub>	Gargallo-Viola, 1989
<i>Serratia marcescens</i> 2170	Soca salvatge, serotip O <sub>8</sub>	Palobart et al, 1988
<i>Serratia marcescens</i> 2170 O <sup>-</sup>	Soca salvatge, serotip O <sub>8</sub> <sup>-</sup>	Palomar, 1996

**Taula 1.2** Soques d'*Escherichia coli* utilitzades en aquest treball

SOCA BACTERIANA	CARACTERÍSTIQUES	REFERÈNCIA/ PROCEDÈNCIA
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> <i>endA hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44</i> <i>thi-1 recA1 gyr-A96</i> φ80 <i>lacZM15</i> Δ( <i>argF</i> <i>lacZYA</i> )U169	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> X11-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17 supE44 relA1 lac</i> (F' <i>proAB lac<sup>q</sup> ZAM15 Tn10</i> )	Stratagene
<i>E. coli</i> NM554	<i>recA13 araD139 Δ(ara-leu)7696</i> Δ( <i>lac</i> ) <sub>x</sub> 74 <i>galE15galK16 hsdR2</i> <i>rpsL mcrA mcrB</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> SM10 (λ <i>pyr</i> )	<i>Thi thr tonA lacY supE</i> <i>recA::RP-2-Tc::Mu, Km<sup>R</sup>, λ pyr</i>	Miller et al, 1988

**Taula 1.3** Soques de *Salmonella enterica* sv Typhimurium LT2 utilitzades en aquest treball

SOCA BACTERIANA	CARACTERÍSTIQUES	REFERÈNCIA/ PROCEDÈNCIA
SA1377	<i>rfaC630</i>	Chatterjee, 1976
SL3789	<i>rfaF511</i>	Roantree, 1977
SL3790	<i>rfaF511 gal1-851</i>	Roantree, 1977
SL3854	<i>rfaG489gs/1-851</i>	Roantree, 1977
SA2381	<i>galE409</i>	MacLachlan, 1985

## 2. PLASMIDIS I CÒSMIDS RECOMBINANTS UTILITZATS

En aquest treball s'han utilitzat una sèrie de plàsmids, alguns dels quals es van obtenir de fonts comercials i d'altres s'han generat en el nostre laboratori o en altres laboratoris d'investigació (Taula 2.1). En la Taula 2.2 s'indiquen els plasmidis generats en aquest treball i el vector amb el qual es van generar.

**Taula 2.1:** Plasmidis utilitzats en aquest treball.

PLASMIDI	GENOTIP O FENOTIP	REFERÈNCIA
PBA189	Col <sup>+</sup> Cm <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup>	Viejo <i>et al.</i> (1992 )
pBluescript SK	<i>lacZ</i> ( $\alpha$ ), Ap <sup>R</sup>	Stratagene
pGEM <sup>R</sup> -T	<i>lacZ</i> ( $\alpha$ ), Ap <sup>R</sup>	Promega
pACYC184	Replicó p15A, Tc <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Chang i Cohen, 1978
PUT-mini-Tn5.Km1	miniTn5 en pUT, origen $\pi$ -depenent	De Lorenzo, 1990
cosFGR2	gens <i>waa</i> de <i>S. marcescens</i>	Guasch, 1996
supercos 1	<i>cos</i> (2), Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Stratagene
pWSK29	Ap <sup>R</sup> , <i>lacI</i>	Wang, 1991
pSKF41	<i>waaAE</i> , <i>kdtB</i> <i>S. marcescens</i>	Guasch, 1996
pGEM-T- <i>waaG</i>	<i>waaG</i> de <i>S. marcescens</i>	Coderch, tesi doc. en preparació
pGEM-T- <i>waaQ</i>	<i>waaQ</i> de <i>S. marcescens</i>	Coderch, tesi doc. en preparació
pGEM-T- <i>waaQII</i>	<i>waaQ</i> de <i>S. marcescens</i>	Coderch, tesi doc. en preparació

Taula 2.2: Plàsmids recombinants generats durant aquest treball.

PLÀSMID RECOMBINANT	VECTOR D'ON DERIVA	GENOTIP O FENOTIP
subFGR2	pACYC184	fragment <i>NotI</i> del cosFGR2, clonat amb pACYC tallat amb <i>EagI</i> . <i>waaB</i> , <i>waaQ</i> , <i>waaAE</i> , <i>kdtB</i> , <i>fpg</i> , <i>rpmBG</i> , <i>radC</i> , <i>dff</i> , <i>dut</i> , <i>ttk</i> .
pNP9	pACYC184	fragment <i>KpnI</i> i <i>SalI</i> a partir del plàsmid subFGR2. <i>waaB</i> , <i>waaQ</i> , <i>waaAE</i> , <i>kdtB</i> , <i>fpg</i> , <i>rpmBG</i> .
pWSK2346	pWSK29	fragment <i>KpnI</i> i <i>EcoRV</i> generat a partir del plàsmid subFGR2. <i>fpg</i> , <i>rpmBG</i>
pWSK1848	pWSK29	fragment <i>EcoRV-EcoRV</i> generat a partir del plàsmid subFGR2. <i>waaE</i>
pWSKS1	pWSK29	insert <i>BamHI-BamHI</i> a partir del plàsmid subFGR2. <i>dut</i> , <i>ttk</i>
pWSKS2	pWSK29	insert <i>BamHI-BamHI</i> a partir del plàsmid subFGR2. <i>radC</i> , <i>rpmBG</i>
cosR11	supercos1	insert <i>BamHI-Sau3AI</i> a partir genoteca <i>S. marcescens</i> . Cluster <i>waa</i>
subR11	supercos1	insert <i>HindIII</i> a partir del plàsmid cos R11.
pACYC-F41	pACYC184	insert F41 ( <i>BamHI-BamHI</i> ). <i>waaB</i> , <i>waaQ</i> , <i>waAE</i> , <i>kdtB</i>

### 3. MEDIS DE CULTIU I ANTIBIÒTICS

#### 3.1 Medis líquids

**TSB:** Medi ric utilitzat rutinàriament per al creixement bacterià (Adsa-Micro)

Composició(g/l): peptona de caseïna 17,0; peptona de soja 3,0; clorur sòdic 5,0; fosfat monopotàsic 2,5; dextrosa 2,5, pHaproximat=7,3

**LB-Lúria:** Medi ric (Adsa-Micro) utilitzat per a la preparació de les cèl.lules competents prèvia a l'electroporació (veure apartat 8.12.2) donat que és un medi amb un contingut de sals molt baix. Composició (g/l): peptona de caseïna 10,0; extracte de llevat 5,0. pHaproximat=7,2

**SOB:** Medi ric utilitzat per al creixement bacterià previ a la transformació pel mètode de les soques supercompetents (veure apartat 8.12.1). Composició: triptona 2%; extracte de llevat 0,5%; NaCl 10mM; KCl 2,5mM; MgCl<sub>2</sub> 10mM; MgSO<sub>4</sub> 10mM

**SOC:** Medi ric utilitzat per a l'expressió fenotípica posterior al procés de transformació. Composició: igual que el SOB més un 0,2% de glucosa.

### 3.2 Medis sòlids

**TSA:** Medi ric utilitzat per a la preparació de plaques de cultiu (Adsa-Micro). Composició(g/l): peptona de caseïna 15,0; peptona de soja 5,0; NaCl 5,0; agar-agar 15,0. pHaproximat=7,3

**Agar tou:** Medi ric utilitzat per als assaigs de producció i quantificació de la bacteriocina i per la multiplicació de bacteriòfags. Composició(g/l): la mateixa que la del TSB més 0,7 g/l d'agar per a bacteriologia.

### 3.3 Antibiòtics i altres additius

Els medis de cultiu es van suplementar, en els casos necessaris, amb els antibiòtics que s'indiquen a la Taula 3.1

**Taula 3.1** Antibiòtics utilitzats en aquest treball.

ANTIBIÒTIC	CONCENTRACIÓ STOCK (mg/ml)	CONCENTRACIÓ TREBALL (µg/ml)	DE	DISSOLVENT
Ampicil.lina	100	50/100		Aigua
Tetraciclina	10	10/15/20		Etanol 50%
Cloramfenicol	50	50		Etanol absolut
Kanamicina	100	50		Aigua

Per a la selecció de transformants portadors de l'insert en els plàsmids de la sèrie Bluescript i pGEM-T, es va afegir IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranòsid) 0,5 mM i

X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosid) a una concentració final de 40 $\mu$ g/ml.

## **4. PRODUCCIÓ D'EXTRACTES CRUS DE BACTERIOCINA. TITULACIÓ**

### ***4.1 Mètode d'extracció de la bacteriocina mitjançant l'obtenció de proteïnes totals.***

L'extracció de bacteriocina 28b es va dur a terme a partir de la soca recombinant d'*E. coli* que transporta el plàsmid amb el gen *bss* (pBA189) (Viejo, 1992). En aquest cas, la bacteriocina no és secretada i s'acumula al citoplasma. L'obtenció d'extractes de proteïnes totals va ser el mètode aplicat.

- Es realitza un creixement de la soca productora de bacteriocina en 100 ml de TSB.
- Es recullen les cèl·lules per centrifugació i es resuspenen en 10 ml de tampò fosfat potàsic 0,05M (pH 7,4) 1M NaCl.
- La suspensió es sonica (Sonicador MSE de 150W), a una amplitud de 14 microns aplicada en 4 cicles d'un minut, amb descansos de 1 minut. Les mostres es van mantenir en un bany de gel/aigua i sal per tal d'evitar el sobrecalfament.
- A continuació es centrifuga a 16.000 rpm durant 30 minuts i es recull el sobrenedant que conté les proteïnes presents en la fracció interna de la cèl·lula.
- S'esterilitzen els extractes crus de bacteriocina mitjançant un filtre d'un tamany de porus de 0,22 micres.

### ***4.2 Titulació de l'activitat bacteriocinogènica***

Després de l'extracció de la bacteriocina es va dur a terme un procediment per titular-la. Es va utilitzar el mètode de dilució crítica descrit per Pugsley i Oudega (1987).

- Sobre una placa de TSA es distribueixen 3 ml d'agar tou inoculats amb 250  $\mu$ l d'un cultiu o/n d'una soca sensible a la bacteriocina (*E. coli* NM554) i es deixa solidificar.
- Es prepara un banc de dilucions binàries (1/2) dels extractes de bacteriocina en TSB.

-Es dispersa una gota de 10 µl de cada dilució sobre la placa preparada i es deixen assecat a l'aire en un sistema de fluxe laminar estèril durant uns minuts.

-Les plaques s'incuben entre 5-12 hores a 37°C fins que s'observa la inhibició del creixement de la soca sensible de forma clara.

El nivell de bacteriocina es defineix com el recíproc de la última dilució del extracte que produeix una inhibició contrastada multiplicat per 100 per a referir-ho com a unitats arbitrària de bacteriocina/ml.

## **5. ASSAIG DE SENSIBILITAT/RESISTÈNCIA A LA BACTERIOCINA**

### ***5.1 Assaig qualitatiu (Cross-streak layer test)***

Aquest mètode es va usar per determinar la sensibilitat/resistència a la bacteriocina de forma qualitativa de les soques recombinants produïdes en aquest treball i que contenen gens relacionats amb la biosíntesi del nucli del LPS de *Serratia marcescens*. Aquest mètode va ser descrit per Pugsley i Oudega (1987).

Breument, es disposa una gota de 20µl d'extracte de bacteriocina en una placa de medi sòlid, s'extén i es deixa secar. Es sembla una colònia de la soca a assajar de forma perpendicular a la línia de bacteriocina. S'incuba a la temperatura òptima de creixement durant 24 h.

### ***5.2 Assaig quantitatiu***

Aquest mètode, descrit per Cavart i Lanzdunki (1981), es va utilitzar per quantificar la sensibilitat o resistència a la bacteriocina de les soques estudiades. Els passos que es van seguir són els següents:

-Creixement tota la soca en 5ml de TSB fins obtenir una densitat

-Assaig en plaques de microtiter de diferents dilucions de bacteriocina (20µl) en front de 20µl de cultiu bacterià. Es porta a un volum final de 200µl amb TSB.

-Incubació a 37°C durant 4 hores.

-Lectura de l'Absorbància a 600nm.

-Corba de sensibilitat/resistència a la bacteriocina.



## 6. ELECTROFORESI EN GELS DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE

### 6.1 Gels de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%. Gels de LPS

Per a l'anàlisi del lipopolisacàrid es van utilitzar gels de poliacrilamida al 12% en la part inferior del gel o gel de resolució. Aquest sistema es va dur a terme per tal d'analitzar el LPS de tipus S i va permetre la visualització de les bandes corresponents a els diferents unitats de repetició de l'antigen O.

#### 6.1.1 Preparació de les mostres

Les mostres de LPS es van obtenir segons el mètode descrit per Hitchcoc i Brown (1983):

- Creixement o/n de la soca en 5 ml de TSB.
- Centrifugació d'una alíquota de 200 µl de creixement.
- Resuspensió del precipitat en 25 µl de tampó de mostres (Taula 6.1).
- Incubació en un bany a 100 °C durant 15 min.
- Addició de 25 µl de Proteïnasa K (1mg/ml).
- Incubar durant 1,5 h a 65 °C.

**Taula 6.1** Composició del tampó de mostra per a gels de LPS al 12%.

TAMPÓ DE MOSTRA	
Tris-HCl 0,5M (pH6,8)	2,5 ml
Glicerol	2 ml
SDS 20%	25 ml
2-β-mercaptoetanol	200µl
Blau de bromofenol	0,1%
Aigua bidestil.lada	4,3 ml

En el cas de l'anàlisi de LPS extret a gran escala, es va partir d'una quantitat de 25 µg i es va tractar la mostra de la mateixa manera que s'acaba de descriure.

### 6.1.2 Preparació dels gels

La preparació dels gels es va dur a terme seguint el mètode clàssic d'electroforesi de proteïnes en condicions desnaturalitzants, pel sistema de SDS-PAGE. La composició del gel de compactació i de resolució es mostra en la Taula 6.2.

**Taula 6.2** Composició dels gels de resolució i compactació dels gels de LPS al 12%.

COMPOSICIÓ	GEL RESOLUCIÓ	GEL COMPACTACIÓ
Aigua bidestil.lada	3,35 ml	6,1 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	-
1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	2,5 ml
SDS 10%	100µl	100µl
Solució Acrilamida/Bisacrilamida 30%	4 ml	1,3 ml
Persulfat amònic 10%	50µl	50µl
TEMED	5µl	10µl

Les mostres es corren en el tampó Tris-Glicina-SDS (Taula 6.3), aplicant un voltatge de 15V fins que les mostres entren en el gel de resolució. Aleshores s'eleva el voltatge fins a 100-110V.

**Taula 6.3** Composició del tampó Tris-Glicina-SDS.

TAMPÓ TRIS-GLICINA-SDS	
Tris-base	3,02 g
Glicina	14,4g
SDS 20%	25 ml
Aigua bidestil.lada	fins a 1l

### 6.1.3 Tinció

La tinció es va dur a terme segons el mètode descrit per Tsai i Frash el 1982. Aquest mètode es basa en l'ús de sals de nitrat de plata. La composició de les solucions utilitzades en la tinció s'indica en la Taula 6.4.

- Es col·loca el gel de poliacrilamida en una placa de Petri amb 100 ml de Solució I.
- S'incuba durant 2-3 h.
- Es substitueix la Solució I per la Solució I que conté 0,7% d'àcid periòdic.
- S'incuba amb agitació durant 10 min.
- Es renta 3 vegades amb 100 ml d'aigua bidestil·lada. Cada rentat es realitza amb agitació durant 10 min.
- S'elimina l'aigua bidestil·lada de l'últim rentat i s'afegeix la Solució II (Solució de Nitrat de Plata). S'incuba amb agitació durant 10 min.
- Es renta tres vegades amb aigua bidestil·lada. Els canvis es realitzen cada 5 min.
- S'elimina l'aigua de l'últim rentat i s'afegeix 100 ml de la Solució III (Solució de revel·lat). S'incuba sense agitació fins a observar l'aparició de les bandes.
- S'atura el procés substituint la Solució III per la Solució de Parada (Àcid acètic al 7%).

**Taula 6.4** Composició de les solucions I, II i III utilitzades en el procés de tinció.

SOLUCIÓ I	SOLUCIÓ II	SOLUCIÓ III
40% etanol absolut	NaOH 0,4 M      28 ml	Àcid cítric 10%      50µl
5% àcid acètic glacial en aigua destil·lada	NH <sub>4</sub> OH (30%)      2 ml	Formaldèhid 37%      50µl
	AgNO <sub>3</sub> (20%)      5ml	H <sub>2</sub> O bidest. fins a 100ml
	H <sub>2</sub> O bidest. fins a 150 ml	

## 6.2 Gels de poliacrilamida-SDS-PAGE-Treicina. Gels de nucli de LPS

Aquests gels es van dur a terme per analitzar el LPS de tipus R o de tipus RS.

### 6.2.1 Preparació de les mostres.

La preparació de les mostres es va dur a terme de la mateixa manera que per als gels de LPS. La composició del tampó de mostra utilitzat s'indica en la Taula 6.5.

**Taula 6.5** Composició del tampó de mostra utilitzat per als gels de SDS-PAGE-Tricina.

TAMPÓ DE MOSTRA	
Tris-HCl	0,06M pH=8
EDTA	1mM
SDS	2%
H <sub>2</sub> O	fins a      5,9 ml
Blau de Bromofenol (solució saturada)	0,4 ml
2-mercaptoetanol	0,8 ml

### 6.2.2 Gels i tinció

La composició del gel i el tampó utilitzats van ser descrits per Pradel i Schnaitman (1991) (Taula 6.6).

**Taula 6.6** Composició dels gels de resolució, compactació i del tampó d'electroforesi utilitzats en els gels de SDS-PAGE-Tricina.

GEL DE RESOLUCIÓ	GEL COMPACTACIÓ	TAMPÓ D'ELECTROFORESI
Acrilamida 15%	Acrilamida 4,5%	0,1% Tris-HCl (pH 8,25)
Bisacrilamida 0,3%	Bisacrilamida 0,3%	0,1 M Glicina
SDS 0,1%	SDS 0,3% en Tris-HCl 0,75M	0,1% SDS
Glicerol 10% en Tris-HCl 1M (pH 8,5)	(pH 8,5)	

El gel es va córrer a 10mA fins que les mostres van entrar al gel de resolució. En aquest moment es pot augmentar l'amperatge a 20mV.

La tinció es va fer segons el mètode descrit anteriorment basat en la tinció amb nitrat de plata.

## 7. AÏLLAMENT DE BACTERIÒFAGS

### 7.1 Mostreig

Per al mostres es va partir d'aigües amb possible contaminació fecal dels rius Besós i Llobregat. Les mostres es van recollir de llocs on el corrent no era excessiu, els nivells de contaminació orgànica i particulada no eren excessivament alts i on no se sospitava de la presència d'agents amb activitat antimicrobiana (colorants, metalls pesants, etc.).

### 7.2 Enriquiment

L'enriquiment té com a objectiu l'increment en el nombre de bacteriòfags específics per a la soca bacteriana utilitzada. En els experiments realitzats, es va utilitzar les soques de *Serratia marcescens* N28b, 2170 i 2170 O<sup>-</sup>. El procediment que es va seguir va ser el descrit a continuació.

-Es realitza un creixement o/n de la soca en 20 ml de TSB.

-Es barregen en un matràs estèril 50 ml de la mostra d'aigua, 50 ml del medi de cultiu TSB doble concentrat (2xTSB) i s'incoculen els 20 ml de la soca bacteriana.

-S'incuba de 8-12 hores sense agitació a 30-37 °C per aconseguir el lisat cel.lular.

### **7.3 Obtenció de l'estoc de bacteriòfags**

L'obtenció d'una suspensió de bacteriòfags es va aconseguir afegint cloroform, que lisa els bacteris i permet alliberar al medi els bacteriòfags presents a l'interior cel.lular.

-S'afegeix un volum de 30 ml de cloroform al lisat cel.lular i s'agita vigorosament.

-Es centrifuga a 6000 rpm durant 15 minuts.

-Es recull la fase superior i es transfereix a tubs nets.

-S'afegeixen unes gotes de cloroform per mantenir l'estoc lliure de bacteris i es conserva a 4 °C.

### **7.4 Assaig qualitatiu**

L'assaig qualitatiu es va realitzar per tenir una idea orientativa de la concentració de l'estoc de bacteriòfags.

-Es prepara un banc de dilucions de l'estoc, des de  $10^{-1}$  fins a  $10^{-8}$  en Ringer 1/4.

-S'inculen 0,2 ml d'un creixement de 5 ml de la soca bacteriana a 3ml d'agar tou fos. S'agita i s'aboca sobre una placa de TSA i es deixar assecat (Tècnica de la doble capa d'agar).

-A continuació es diposita una gota de 10µl de cada dilució sobre la placa.

-Una vegada les gotes s'han absorbit en la placa, s'incuba a 30-37 °C.

### **7.5 Assaig quantitatiu**

L'assaig quantitatiu va permetre conèixer el número d'unitats formadores de calba per ml (PFU) així com caracteritzar la morfologia de les diferents calbes. Les diferents calbes van ser aïllades i es va obtenir un estoc de bacteriòfags per cada calba diferent, repetint el procés anterior.

L'assaig quantitatiu es va dur a terme de la següent manera:

-Es prepara un banc de dilucions de l'estoc de bacteriòfags tal com es descriu en l'apartat anterior (assaig qualitatiu) però ampliant les dilucions a 3 dilucions més que la última en què s'observa lisi a l'assaig qualitatiu.

-A continuació s'afegeix a 3ml d'agar tou fos 0,2 ml del cultiu de bacteri i 0,1 ml de la dilució de l'estoc de bacteriòfag. S'agita i s'aboca en un placa de TSA (Tècnica de la doble capa d'agar). Per a cada dilució s'inoculen dues plaques.

-Es deixa solidificar i s'incuba durant 12-24h a 30-37 °C.

-Es calcula el número d'unitats formadores de calba per ml.

## **7.6 Assaig de sensibilitat/resistència**

Una vegada obtinguts els estocs de bacteriòfags específics per a cada soca, es va passar a estudiar la sensibilitat de totes les soques que volíem mutar a tots els fags de què disposàvem.

Aquest estudi es va dur a terme per la tècnica de la doble capa d'agar. La sensibilitat als fags es determinà dipositant gotes de bacteriòfag ( $10^9$  PFU/ml) sobre creixements confluents de la soca bacteriana. Les plaques s'incuben durant 24 hores a 30-37 °C.

## **7.7 Obtenció de mutants per resistència a fags**

Una vegada obtinguts bacteriòfags que infectaven les diferents soques assajades, es va procedir a obtenir colònies resistents als bacteriòfags. Aquest procediment tenia com a objectiu l'obtenció de mutants en gens implicats en la biosíntesi del nucli del LPS.

Per obtenir mutants, es va dur a terme el següent procés:

-Es barreja 3ml d'agar tou fos amb 0,1 ml d'un cultiu de la soca bacteriana i s'aboca a una pla de TSA. Es deixa solidificar.

-A continuació es diposita un volum de fag que contingui aproximadament  $10^9$  PFU sobre la placa. S'incuba a 30-37 °C durant 12 -24h.

-Les colònies que creixen en la zona de lisi es purifiquen individualment amb estries en placa de TSA i es comprova la resistència al bacteriòfag.

Els fenotips de les colònies resistents als bacteriòfags es van analitzar a través de gels de LPS.

## 8. TÈCNIQUES DE GENÈTICA MOLECULAR

Molts dels protocols utilitzats en aquest treball es troben descrits en els llibres “Molecular cloning: a laboratory manual” (Sambrook *et al.*, 1989) i “Current protocols in molecular biology” (Ausubel *et al.*, 1989). A més, en molts casos es van utilitzar kits comercials seguint les instruccions del fabricant.

### 8.1 Aïllament i purificació d'ADN plasmídic

L'aïllament d'ADN plasmídic es va dur a terme segons el mètode basat en la lisi alcalina (Birboim *et al.*, 1983) descrit per Maniatis (Maniatis *et al.*, 1982) i modificat per Martínez (Martínez *et al.*, 1988).

Es van dur a terme preparacions de d'ADN a petita i a mitjana escala i es va utilitzar el kits comercial subministrat per IZASA, especialment per l'aïllament de plàsmids multicòpia (*Quiagen plasmid midi-prep preparations* o *Qiagen plasmid mini-prep preparations*). En els dos casos es van seguir les instruccions del kit.

### 8.2 Fenolització de l'ADN

Es va seguir el protocol descrit per Sambrook (1989). La fenolització s'utilitza per tal de purificar molècules d'ADN en solució.

- S'afegeix el mateix volum de Fenol que de mostra i s'agita vigorosament.
- Es centrifuga durant 5 min.
- Es transfereix la fase aquosa, superior, a un tub net. S'afegeix igual volum de Fenol:Cloroform (1:1) i s'agita vigorosament.
- Es centrifuga durant 5 min.
- Es transfereix la fase superior a un tub net.
- S'afegeix igual volum d'una solució de Cloroform:Alcohol isoamílic (24:1). Aquesta extracció permet eliminar les restes de Fenol.
- Es centrifuga durant 5 min i es transfereix la fase superior a un tub net.

### **8.3 Precipitació de l'ADN**

Es va seguir el procediment descrit per Maniatis (Maniatis, 1982), basat en l'addició de la dècima part del volum d'ADN d'acetat sòdic i l'addició del doble del volum obtingut d'etanol al 98% fred. La barreja es manté a -20°C un mínim de 2 h. Posteriorment es centrifuga a 10.000g durant 15 min. i es realitza un rentant amb etanol al 70% fred. Finalment s'evaporen les restes d'etanol i l'ADN es resuspèn H<sub>2</sub>O.

### **8.4 Quantificació de l'ADN**

La quantificació de l'ADN es va dur a terme per dos mètodes diferents: a partir de la intensitat de fluorescència que emet el bromur d'etidi quan s'intercala entre les bases d'ADN o bé mesurant l'absorbància per espectrofotometria.

En el primer procediment, l'emissió és directament proporcional a la massa total d'ADN. En un gel d'agarosa amb 0,5 µg/ml de bromur d'etidi dissolts en agarosa, es carreguen diverses quantitats de l'ADN que s'ha de quantificar i una quantitat d'ADN coneguda (0,4 µg de l'ADN del fag λ digerit amb l'enzim *Hind*III, el patró del qual es coneix. Per comparació de la intensitat de les bandes de patró amb la de la mostra es va estimar la concentració de l'ADN.

En el segon cas, la concentració d'ADN es va determinar per absorció a 260 nm. Breument, es van agafar 0,1 ml de la solució d'ADN i es van afegir a 1,9 ml d'aigua i es van barrejar. Usant 1 ml d'aquesta solució, es va determinar l'absorbància a 260 nm. Usant la relació 50 µg d'ADN = 1 (A<sub>260</sub>), es calcula la concentració d'ADN.

### **8.5 Reaccions enzimàtiques**

Els enzims de restricció i els tampons utilitzats van ser subministrats per Pharmacia Biotech. Les condicions de les digestions utilitzades es van fer segons les indicacions de l'aquesta casa comercial. L'avantatge que representa usar aquests enzims és que tots ells requereixen el mateix tampó diluït a diferents concentracions en funció de l'enzim utilitzat (tampó "One for all buffer").



### **8.5.1 Restriccions senzilles**

Habitualment, s'utilitza 0,1 µg d'ADN per a una volum final de 20 µl de volum final. El volum de "One for all buffer" varia segons l'enzim. La quantitat d'enzim utilitzada està al voltant d'una unitat. La digestió s'incuba habitualment a 37°C durant 1,5-2h.

En el cas de digestions a gran escala destinades a la purificació d'alguna banda, es va utilitzar un volum final de 100 µl i la resta de components es van afegir segons les proporcions anteriors.

### **8.5.2 Restriccions dobles**

En el cas de que els dos enzims necessitessin la mateixa concentració de tampó, s'afegien els dos enzims alhora. En cas contrari, primer es realitzava la reacció de restricció amb l'enzim que usés la concentració més elevada i posteriorment es diluïa amb aigua desionitzada fins obtenir la concentració adient per al segon enzim.

### **8.5.3 Restriccions parcials**

Es van dur a terme segons el procediment descrit per Bloch (Bloch, 1987). Es va barrejar l'ADN i el tampó corresponent fins a un volum final de 100µl que es van repartir en cinc tubs diferents. En el primer es va afegir 30µl de la barreja, en el segon 20 µl; en el tercer, quart i cinquè, 10 µl. Es van afegir de 3 a 5 unitats d'enzim per µg d'ADN del primer tub. Es van barrejar i es van traspasar 10 µl d'un tub a l'altre seqüencialment.

Es van incubar tots els tubs a 37°C durant 15 min. Posteriorment es van analitzar els productes de les diferents reaccions en una electroforesi en gels d'agarosa.

### **8.5.4 Reaccions de defosforilació**

La reacció de defosforilació es va dur a terme sobre els vectors digerits amb enzims que generen extrems compatibles per tal d'evitar la religació. La reacció de defosforilació elimina els grups fosfat 5' terminals dels extrems lliures. S'utilitza l'enzim BAP

(Bacterial Alkaline Phosphatase) de Pharmacia, seguint el procediment descrit per Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989) amb modificacions. Una d'elles consisteix en allargar el temps d'incubació a 1,5h. afegint una alíquota d'enzim (1 unitat) cada 30 min. Una vegada s'ha dut a terme la reacció, l'enzim s'inactiva per incubació a 85° C, durant 15 min. en presència de 10 mM d'EDTA pH=8. A continuació es dur a terme un tractament per purificar l'ADN.

### **8.5.5 Reacció de lligació**

L'enzim T4 ADN-ligasa i el tampó de lligació van ser subministrats per Promega. Les reaccions de lligació es van realitzar en una relació molar de 2:1 (insert: vector). Habitualment, per a les reaccions de lligació entre molècules amb extrems cohesius es van utilitzar de 0,01 a 0,1 µg de l'ADN total (vector i insert) diluïts en aigua i es van barrejar amb 1 unitat de l'enzim, tampó i aigua fins a un volum de 20 µl. La reacció es va deixar tota la nit a 4°C. En el cas d'ADN amb extrems roms, es va augmentar la quantitat d'ADN i d'enzim i les incubacions es van realitzar a 4°C durant 48 h.

Després de realitzar la barreja entre el vector i l'insert es va incubar a 65°C durant 5 min per tal de permetre que tots els extrems de restricció estiguessin lliures.

### **8.5.6 Modificació dels extrems**

La modificació dels extrems va tenir com a objectiu generar extrems roms. Per fer-ho, es van seguir les instruccions de Maniatis (Maniatis *et al.*, 1982). En el cas dels extrems 5' protuberants es va utilitzar l'activitat 5'→3' polimerasa de l'enzim *Klenow*, que afegeix nucleòtids a l'extrem 3' lliure, prenent com a motllo l'extrem protuberant. En el cas dels extrems 3' protuberants, es van utilitzar enzims amb activitat exonucleasa 3'→5' de cadena senzilla, que digereixen l'extrem protuberant fins a obtenir extrems roms.

## **8.6 Electroforesi d'ADN en gels d'agarosa**

L'electroforesi s'utilitza per separar i identificar fragments d'ADN. L'electroforesi es basa en la càrrega negativa que presenta l'ADN a pH neutre, que condiciona la seva

migració cap al pol positiu quan se'l sotmet a un camp elèctric. Variant la concentració d'agarosa pot aconseguir-se separar amb bona resolució fragments d'ADN de longituds diverses. S'utilitzen concentracions des de 0,3 (per resoldre fragments grans) fins al 2% (per fragments al voltant de 100 pb) (Maniatis *et al.*, 1982). En les electroforesis rutinàries s'utilitza el tampó TAE x 1, que es prepara a partir d'una solució concentrada de TAE<sub>x50</sub> (Taula 8.1).

Les mostres es preparen adonant tampó de mostres (Taula 8.1), a una proporció 1/5 respecte el volum total. El tampó de mostres actua com a incrementador de la densitat, per tal que la mostra s'introdueixi bé ens els pous del gel i no difongui. Els dos colorants (Blau de bromofenol i Xylen cyanol) del tampó permeten seguir el procés. L'electroforesi es va dur a terme a un voltatge d'aproximadament 100 V i en les cubetes d'electroforesi Hoefer HE33 de Pharmacia.

La visualització de l'ADN s'aconsegueix afegint Bromur d'etidi en la composició del gel a una concentració de 0,5 µg/ml. Els gels es van visualitzar en uns transil.luminador de llum ultraviolada a 302nm.

**Taula 8.1** Composició del tampó TAE<sub>x50</sub> i del tampó de mostres utilitzats en l'electroforesi de gels d'agarosa.

TAMPÓ TAE <sub>x50</sub>		TAMPÓ DE MOSTRES	
Tris	242 g	Blau de bromofenol	0,25%
EDTA 0,5M pH=8	100 ml	Xylen cyanol	0,25%
Àcid acètic glacial	57,1 ml	Glicerol	30%
Aigua bidestil.lada	fins a 1 l		

## 8.7 Purificació d'ADN a partir de gels d'agarosa

Per la purificació de fragments d'ADN a partir de gels d'agarosa es va utilitzar el sistema QUIAEX subministrat per IZASA. Aquest sistema també permet la purificació de qualsevol ADN en solució. Es basa, principalment, en la retenció de l'ADN en una matriu de sílica, que es renta diverses vegades per tal d'eliminar contaminants no desitjats. Finalment, s'elueix l'ADN purificat.

## 8.8 *Obtenció de sondes d'ADN. Detecció de fragments d'ADN. Tècnica de Southern.*

A partir de fragments d'ADN purificats es van marcar mitjançant el kit de marcatge no-radioactiu (Boehringer.Mannheim). El sistema de marcatge es basa en la incorporació de dUTP marcat amb digoxigenina. Després de la hibridació, les molècules marcades es detecten utilitzant un anticòs antidigoxigenina conjugat amb fosfatasa alcalina i posterior reacció enzimàtica contra els substrats X-fosfat i NBT. Els passos següents en el marcatge són els següents:

- desnaturalització de l'ADN que es vol marcar incubant-lo a 100°C durant 10 minuts.
  - congelació immediata en un bany de gel/etanol.
  - A la temperatura de congelació, s'afegeixen 2 µl de la barreja d'hexanucleòtids (primer universal inespecífic), 2 µl d'una combinació de dNTPs que conté el nucleòtid marcat i 1 µl de l'enzim Klenow.
  - Descongelació a temperatura ambient i després de homogenitzar, s'incuba a 37°C durant un mínim de 1 hora.
  - S'afegeixen 2 µl d'EDTA 0,5M (pH=8) per parar la reacció.
  - Precipitació de l'ADN i resuspensió en 30 µl d'aigua o TE. La sonda marcada es pot conservar a -20°C.
- Després d'hibridar les sondes amb les seqüències diana (passos següents) es realitza el revelat mitjançant la tècnica immunoenzimàtica. Els passos de revelat són els següents:
- després de la hibridació, rentar els filtres amb tampó I durant 1 minut.
  - incubar durant 30 minuts amb tampó II.
  - rentar amb tampó I (Taula 8.2) durant 1 minut.
  - incubar durant 30 minuts amb el tampó I (10-20 ml per filtre) al que se li afegeix 2 µl de l'anticòs antidigoxigenina.
  - dur a terme dos rentats de 15 minuts amb tampó I en excés per tal d'eliminar l'anticòs fixat.
  - equilibrar durant 2 minuts amb tampó III (Taula 8.2).
  - incubar en la solució cromàtica, protegida de la llum, fins observar l'aparició de senyals.
  - parar la reacció cromàtica summergeint el filtre amb el tampó IV (Taula 8.2)
  - totes les incubacions es realitzen amb agitació excepte la reacció cromàtica.

**Taula 8.2** Composició dels tampons utilitzats per al revelat.

**Tampó I:** 100mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl

**Tampó II:** reactiu de bloqueig en 0,5% del tampó I.

**Tampó III:** 100mM Tris-HCl (pH=9,5), 100mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>

**Tampó IV:** 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH=8,0)

**Solució cromàtica:** 45µl NBT + 35 µl de X-fosfat en 10 ml de tampó III

L'ADN que es pretèn hibridar amb les sondes es sotmet, en primer lloc, a una electroforesi en gel d'agarosa usant com a tampó TBE x 1. Els gels es preparen amb un gruix inferior al normal per minimitzar el temps de transferència i la resistència durant la transferència. L'ADN que s'ha d'hibridar es desnatura en el gel mitjançant una incubació en una solució 0,25M NaOH durant 15 minuts. A continuació, es duen a terme dos rentats de 10 minuts amb TBE x 0,5.

La transferència es realitza a filtres de nylon (Boehringer Mannheim) mitjançant el sistema d'electrotransferència de Bio-Rad, a 80 V durant 1 hora, mantenint la cubeta parcialment submergida en un bany de gel i amb agitació permanent del tampó de transferència (TBE x 0,5). Finalitzada la transferència, es pot fixar l'ADN al filtre incubant per secat a 120 °C durant 30 minuts al buit o bé per exposició del filtre, previ procés de secat a l'aire, a il.luminació ultraviolada durant 3 minuts. El procés d'hibridació següent consisteix en:

-S'incuba el filtre en la solució d'hibridació (Taula 8.3) durant 2 hores a 42 °C (Fase de pre-hibridació o bloqueig).

-S'elimina la solució d'hibridació utilitzada i s'afegeixen 5-10 ml de solució d'hibridació fresca a els que s'ha afegit 5 µl de sonda desnatura (la sonda es desnatura prèviament per ebullició durant 10 minuts seguida de congelació instantània en un bany de gel sec/etanol).

-Incubació durant tota la nit a 42 °C.

-Al dia següent, s'apliquen 2 rentats de 5 minuts amb 2 x SSC + SDS 0,1% a 68 °C.

Finalitzats els rentats, es pot dur a terme el protocol de revelat.

**Taula 8.3** Composició de la solució d'hibridació.

<b>Solució d'hibridació</b>	
Formamida desionitada	20 ml
Agent de bloqueig	2 g
N-lauril-Sarcosina	40 mg
SDS 10%	80 µl
20 x SSC	7,5 ml
Aigua bidestil.lada	9,2 ml

## **8.9 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)**

El protocol de PCR es va dur a terme segons les indicacions generals de la bibliografia (Sambrook *et al.*, 1989) amb algunes modificacions.

La DNA polimerasa termoestable (Taq polimerasa) va ser subministrada per GIBCO-BRL. La composició del tampó utilitzat es mostra en la Taula 8.4.

**Taula 8.4** Composició del tampó utilitzat en les reaccions de PCR.

<b>TAMPÓ DE PCR</b>	
Glicerol	5%
Tris HCl pH=7,4	250mM
KCl	200 mM
DMSO	5%

Les condicions de la reacció de PCR varien segons el tamany del fragment a amplificar, els cebadors a utilitzar i el DNA motllo. En general es van usar unes condicions estàndard que es van modificar en cada cas. En la Taula 8.5 s'indiquen les condicions utilitzades habitualment.

**Taula 8.5** Condicions utilitzades en les reaccions de PCR.

Tampó de PCR	5 µl
Barreja de nucleòtids (2,5 mM)	5 µl
Tampó MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5 µl
Solució de cebadors	30 ng
Taq polimerasa	1,25 U
ADN motllo	0,25-0,1 µg
H <sub>2</sub> O bidestil.lada	Fins a 50 µl

Per tal d'aconseguir el producte d'amplificació desitjat, es van modificar condicions com ara la concentració de MgCl<sub>2</sub>, la quantitat dels cebadors o la temperatura d'hibridació.

Per evitar que l'evaporació d'aigua durant el procés es va afegir oli mineral. En alguns casos, per evitar el contate entre ADN motllo i cebadors abans d'arribar a la temperatura d'hibridació, es va utilitzar parafinar per tal de separar els dues fases.

Per a l'amplificació es va utilitzar el termociclador *GeneAmp System 2400* de Perkin Elmer. En primer lloc es va dur a terme un cicle de desnaturalització a 95°C durant 4 min. Posteriorment, es van realitzar de 30 a 35 cicles dels 3 passos indicats en la Taula 8.6.

**Taula 8.6** Passos que componen un cicle en la reacció de PCR. Es van utilitzar de 30 a 35 cicles.

95°C, 30 segons  
Temperatura d'hibridació del cebador, 30 segons  
72°C, temps necessari per l'amplificació de fragment (1 Kb/ min)

En últim terme, es va realitzar un cicle a 72 °C durant 5 minuts per tal d'assegurar la formació de la cua d'As en els fragments amplificats.

Una vegada acabada la reacció de PCR es van mantenir les mostres a 4°C i els fragments amplificats es van analitzar per electroforesi en gels d'agarosa.

### **8.10 Disseny de cebadors específics**

Els cebadors específics utilitzats tant en les reaccions de PCR com en les reaccions de seqüenciació es van dissenyar amb el *software* Amplify (University of Wisconsin, 445 Henry Mall, Madison 53706). Una vegada dissenyats, van ser sintetitzats per Pharmacia seguint la indicació de la seqüència sol·licitada. En general, la temperatura d'hibridació es va calcular seguint la fórmula:  $T=63,9 + 0,41.(%G+C)-650/n^{\circ}$  bases.

### **8.11 Seqüenciació de l'ADN**

Per dur a terme les reaccions de seqüenciació de l'ADN es va utilitzar el mètode basat en el marcatge amb fluorocroms. Aquest mètode va ser descrit per Sanger (Sanger *et al*, 1977). Es va utilitzar el kit de seqüenciació d'Abi Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit de Perkin Elmer. El kit conté dideoxinucleòtids marcats amb fluorocroms. Cada dideoxinucleòtid (A,C,G,T) està marcat amb un fluorocrom diferent. Això permet que cada fragment que queda interromput per la incorporació d'un dideoxinucleòtid tingui una fluorescència associada al tipus de nucleòtid que s'ha incorporat últim. D'aquesta manera, separant els fragments generats en la reacció a través d'una electroforesi en gels de poliacrilamida i determinant la fluorescència, podem determinar la seqüència de nucleòtids des del cebador utilitzat fins a una tamany de 300 a 400 pb.

Les concentracions que es van utilitzar en la reacció de seqüenciació es mostren en la Taula 8.7.

**Taula 8.7** Concentracions utilitzades en la reacció de seqüenciació de l'ADN.

Terminator ready reaction mix	4 µl
ADN motllo	0,2-0,5 µg/µl
Cebador	3,2 pmols
H <sub>2</sub> O bidestil.lada fins a un volum de	10 µl
Oli mineral per evitar l'evaporació durant la reacció.	

La reacció de seqüenciació es va dur a terme en el termociclador *GeneAmp System 2400* de Perkin Elmer. En primer lloc es va realitzar un cicle de desnaturalització a 95 °C durant 4 min i, a continuació, 25 cicles amb els passos següents:

- 96 °C durant 30 segons.
- Temperatura d'hibridació del cebador, durant 15 segons.
- 60 °C, durant 4 min.

El protocol de purificació de la reacció de seqüenciació consisteix en precipitar els fragments amplificats. Es va dur a terme segons el protocol del fabricant del kit:

- Es transfereix el contingut de la reacció (10 µl) a un tub Eppendorf que conté 1 µl de cetat sòdic 3M (pH=4,6) i 25 µl d'etanol al 95%.
- Es barreja i es manté en gel durant 10 min.
- Es centrifuga durant 15-30 min.
- Es retira el sobrenedant i s'afegeixen 125 µl d'etanol al 70%. Es retira l'etanol i es deixa assecar el precipitat.

Els gels de poliacrilamida, el seu revelat i l'obtenció de la seqüència van ser realitzats pel personal dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

## **8.12 Software per a l'anàlisi de seqüències**

Una vegada obtinguda la seqüència d'ADN, es va dur a terme un estudi en què es van analitzar les pautes de lectura oberta presents i les dianes de restricció a través del programa **Seqaid 3.81** (Rhoads i Roufa, Kansas University, 1991). Aquest programa també es va utilitzar per establir el perfil d'hidrofobicitat d'una proteïna. El programa utilitza una versió informatitzada del mètode de Kyte i Doolittle (1982).



Les pautes de lectura oberta trobades van ser introduïdes a la base de dades de proteïnes Pirprot (v. 39,0) i Swiss-prot (v. 27,0) mitjançant el programa **FASTA** (Pearson and Lipman, 1988). Aquest programa utilitza un algoritme que permet la comparació d'una seqüència problema amb milers de seqüències d'una base de dades. L'algoritme identifica les regions que presenten, en cada parell de seqüències, un màxim de residus idèntics, agafats d'un en un ( $ktup=1$ ); ordena els 10 millors fragments de cada parell de seqüències, segons una matriu de similitut. El programa **BLAST** (Atchul *et al*, 1990) s'utilitza també per a la recerca de seqüències d'ADN i proteïnes homòlogues. Les proteïnes que presenten major similitud amb les deduïdes de la nostra seqüència són sotmeses a un procés d'alineament múltiple utilitzant els programes "PileUp", "Preetybox", "Prettyplot" del paquet integrat EMB-GSG (Genetics Computer Group, Inc) considerant les identitats i les substitucions conservatives d'aminoàcids. També es va utilitzar el programa **Clustal W** per alineaments múltiples.

El programa **Clone Map** (versió 2.11) (CGC Scientific, Inc) es va utilitzar per elaborar els esquemes dels plàsmids i mapes de restricció.

El programa **PROT.PARS** (Parsimony). de PHYLIP (Felsenstein, 1991) es va utilitzar per realitzar anàlisis filogenètiques. Aquest programa compara dues seqüències d'aminoàcids i determina el número de canvis genètics (de bases) que s'han de produir en un codó per passar d'un aminoàcid a l'aminoàcid corresponent de l'altra proteïna. El número de canvis indicarà com de llunyanes es troben dues proteïnes.

El programa **HCA** es va utilitzar per realitzar una anàlisi de les agrupacions (clusters) d'aminoàcids hidrofòbics d'una proteïna. Així, es pot predir el tipus d'estructures secundàries i terciàries d'una proteïna. En les proteïnes globulars, els aminoàcids hidrofòbics es troben situats en el nucli intern de la proteïna mentre que els aminoàcids hidrofílics es troben situats en la superfícies. Com a resultat, els aminoàcids hidrofòbics tendeixen a agrupar-se en una estructura compacte estable que és típica d'un plegament particular. En general, els aminoàcids hidrofòbics es troben situats amb més freqüència en els cares internes de les estructures secundàries regulars (helix- $\alpha$  i fulla- $\beta$ ) i amb menys freqüència en estructures irregulars (girs). En aquest programa, els aminoàcids es troben classificats en aminoàcids hidrofòbics (VILFMWY) i aminoàcids hidrofílics on es troben els aminoàcids constructors de girs (PGDNS) ( $\blacklozenge=G$ ,  $\blackstar=P$  i  $\blacksquare=T$ ). Aquest mètode permet relacionar famílies de seqüències amb nivell baixos d'identitat.

## 8.13 Tècniques de transferència d'ADN

Dintre de les tècniques de transferència d'ADN es va utilitzar comunment la transformació i la conjugació.

### 8.13.1 Transformació per cèl.lules supercompetents

Aquest mètode s'utilitza per transformar ADN a diverses soques d'*Escherichia coli* (Hanahan, 1983).

- Es prepara un cultiu de la soca en 5ml del medi SOB i s'incuba a 30-37 °C durant tota la nit.
- Es realitza un subcultiu en SOB i s'incuba a 30-37 °C fins arribar a una D.O. a 600 nm de 0,5.
- Es deixa el cultiu a 4°C durant 10 min i, a continuació, es recullen les cèl.lules per centrifugació.
- Es resuspèn el sediment amb 1600 µl de TFB-K.MES i es deixa 10 min a 4 °C.
- Es centrifuga de nou i es resuspèn el sediment amb 400 µl de TFB-K.MES (Taula 8.8) S'afegeixen 14 µl d'una solució de DMSO-DTT i s'incuba a 4 °C durant 10 min. Es repeteix aquest pas un vegada més.
- Es divideix el contingut del tub en dues alíquotes iguals i es transfereixen a tubs prèviament refredats. Una meitat s'utilitza com a control i a l'altra meitat s'hi afegeix de 5-20 µl de la solució d'ADN.
- S'incuba la solució a 4 °C durant 30 min.
- Es sotmeten les cèl.lules a un xoc tèrmic: 42 °C, durant 1,5 min i 4 °C, durant 2 min.
- A continuació, s'afegeixen 800µl del medi SOC i s'incuba a 30-37 °C durant 1-2 hores (Expressió fenotípica).
- Es recullen les cèl.lules per centrifugació. S'elimina el sobrenedant i es resuspèn el sediment amb 100 µl del medi TSB. Es sembra en plaques de medi sòlid suplementades amb els agents de selecció adequats.

**Taula 8.8** Composició de les solucions utilitzades per al protocol de transformació per cèl.lules supercompetents.

<b>TFB-K-MES:</b> 100mM KCl; 45 mM MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O; 10 mN CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O; 3 mM HacCoCl; 10 mM K-MES. S'esterilitza per filtració.
<b>K-MES:</b> 0,5 M MES (pH=6,3, ajustat amb KOH)
<b>DMSO-DTT:</b> 50% DMSO; 50% solució DTT.
<b>Solució DTT:</b> 3,3 g. DTT; 7ml H <sub>2</sub> O; 100 ml acetat potàsic 1M (pH=7,5)

### 8.13.2 Transformació per electroporació

Aquest mètode de transformació es va utilitzar per *Serratia marcescens* i per *Salmonella enterica* i també per aquells casos en què *Escherichia coli* es mostrava poc eficient a la transformació pel mètode descrit anteriorment. Aquest mètode es basa en l'aplicació de camps elèctrics intensos en curts intervals de temps. El protocol que es va seguir va ser el següent:

- A partir d'un cultiu de la soca crecut durant tota la nit en el medi LB- Luria, es realitza un subcultiu en el mateix medi. S'incuba a la temperatura òptima de creixement fins arribar a una DO a 600 nm de 0,5-0,8.
- Es deixa a 4 °C durant 15 min per aturar el creixement. El material que s'utilitzi a partir d'aquest moment ha d'estar a una temperatura de 0-4 °C (l'aigua bidestil.lada, els tubs, les cubetes d'electroporació, etc.).
- Es recullen les cèl.lules per centrifugació. S'elimina el sobrenedant i es resupenen les cèl.lules amb 5 ml d'aigua bidestil.lada estèril.
- Es repeteixen els cicles successius de centrifugació i resuspensió amb volums decreixents d'aigua bidestil.lada.
- Acabats els rentats, es posa en contacte la solució d'ADN (que ha d'estar lliure de sals) amb les cèl.lules. El volum de suspensió bacteriana sol ser de 40 µl i la solució d'ADN està entre 5-20 µl. Per l'electroporació, es va utilitzar l'aparell BTX Electro Cell Manipulator 600, amb cubetes BTX de 2mm. Es va ajustar l'aparell a 2,5 kV, 25 µF de capacítancia i 18 Ohms de resistència. En aquestes condicions, s'obté un camp amb una intensitat propera als 12 kV/cm, amb una constant de pols de 6-8,5 segons.
- A continuació, les cèl.lules es recuperen de la cubeta d'electroporació amb 1 ml de SOC o TSB i es sotmeten a un període d'expressió fenotípica a 37 °C durant 1-2 hores.
- Finalment, es sembren en plaques suplementades amb els antibiòtics adequats realitzant diverses dilucions.

### 8.13.3 Conjugació

El procés de conjugació es va utilitzar per obtenir mutants per transposició amb el transposó mini-Tn5::KmI seguint el mètode descrit per De Lorenzo (De Lorenzo *et al*, 1990). L'obtenció dels mutants es va realitzar per conjugació entre la soca portadora del transposó (*E. coli* SM10( $\lambda$ pyr) mini-Tn5::KmI) i la soca receptora de la qual volíem obtenir mutants. La selecció dels mutants es va realitzar per antibiòtics.

El procediment que es va seguir per la conjugació va ser el següent:

- Es fa créixer la soca donadora i receptora en medi sòlid.

- Al dia següent s'agafen de 5-10 colònies de cada soca i es resuspenen amb 300 µl de LB sense antibiòtic.
- Es barregen les dues soques (la donadora i la receptora) en diferents proporcions en una placa de LB sense antibiòtics. En el nostre cas:
- S'agafen 200 µl de la soca donadora i 200 µl de la soca receptora i es posen en contacte en una placa de LB sense antibiòtic.
- Es mantenen les plaques a Temperatura ambient durant 10 min.
- S'incuben les plaques a 30 °C durant 8 hores.
- Es recull el creixement amb la quantitat necessària de LB.
- Es plaqueja en plaques de TSA suplementades amb Km i l'antibiòtic que porta el plàsmid en què voliem incorporar el transposó. Adicionalment es realitzen els controls adequats: tant la soca receptora com la soca donadora es sembren en els mateixos medis com a controls negatius. Es realitzen diverses dilucions i s'incuben les plaques a 37°C durant 12-24 hores.
- L'ADN de les colònies transformants s'extreu i es transfoma a les soca d'*E. coli* NM554.

Les colònies obtingudes de la transformació es van analitzar a través d'extracció del plàsmid a petita escala i es va comprovar per anàlisi de restricció i per seqüenciació la presència del transposó.

## 9 MÈTODES D'ANÀLISI DE LA MOLÈCULA DEL LPS

### 9.1 Mètodes d'extracció del LPS

Els mètodes seguits per extreure LPS van variar en funció del tipus de LPS a extreure: si es tractava de LPS de tipus R (mètode del PCP) o bé si es tractava de LPS amb antigen (S) (mètode fenol-aigua). En la Figura 10 es mostren els passos que es duen a terme des de l'extracció de LPS fins a l'anàlisi química.

#### 9.1.1 Extracció per a LPS de tipus S (fenol-aigua)

Aquest mètode va ser el primer que es va posar a punt per a l'extracció de LPS. Va ser descrit per Whesphal, Lüderitz i Bister l'any 1952. Aquest mètode es basa en l'extracció del LPS usant fenol i aigua a temperatures elevades. En aquestes condicions, el LPS s'extreu en la fase aquosa, tot i que en alguns casos pot dissoldre's en el fenol (en

alguns LPS de tipus R). Després de l'extracció es duu a terme diversos passos de purificació per ultracentrifugació. Els passos que es duen a terme són els següents:

### Deshidratació de les cèl.lules

La deshidratació de les cèl.lules es va dur a terme després del creixement cel.lular. (Normalment es va dur a terme un creixement de 30l en un bioreactor a 37°C durant 8 hores i amb un pO<sub>2</sub> inicial del 100%).

En primer lloc, es duen a terme tres rentats amb una barreja de cloroform i metanol (1:1). En cada pas la barreja de cèl.lules i el dissolvent s'ha d'homogenitzar usant un homogenitzador i a continuació es centrifuga a baixa velocitat per recollir el sediment cel.lular. El segon rentat s'efectua amb etanol. Abans de centrifugar es deixa amb etanol durant tota la nit. A continuació es duen a terme dos rentats amb acetona i un rentat amb dietilèter. En aquest últim pas no es centrifuga sinó que es deixa secant-se tota la nit.

### Extracció amb fenol i aigua

Per 13g de cèl.lules s'utilitza un volum de 50 ml d'aigua bidestil.lada i 50 ml de fenol al 90%.

- La barreja s'homogenitza durant un cert temps manualment.
- A continuació s'incuba en un bany a 68°C durant 20 min i agitant manualment cada 5 minuts.
- La barreja es deixa refredar en gel durant uns minuts i a continuació es centrifuga a 4000 rpm durant 30 minuts a 0°C.
- Es recull la fase aquosa i es guarda. S'extreu novament la fase fenol amb el mateix volum d'aigua. S'incuba a 68°C, es deixa refredar i es centrifuga. En total, es duu a terme l'extracció de la fase de fenol 3 vegades.
- Finalment es recullen els sobrenadants i es dialitzen en front d'aigua bidestil.lada durant 48 hores a 4°C realitzant canvis freqüents. La diàlisi té com a objectiu eliminar les restes de fenol presents a la fase aquosa.
- La fase aquosa es liofilitza.

### Purificació per ultracentrifugació

Amb el residu sec es prepara una suspensió d'aproximadament 50mg/ml en aigua. A continuació es duen a terme 3 passos de centrifugació de 4h a 45000rpm. Es recull el sediment i també es guarden els diferents sobrenadants i es liofilitzen.

Finalment es comprova cada fracció per electroforesi SDS-PAGE.

### Rendiment

El rendiment que se sol obtenir usant aquest mètode està al voltant de 3%.

### **9.1.2 Extracció per a LPS de tipus R (PCP)**

Aquest mètode va ser posat a punt per Galanos, Lüderitz i Westphal l'any 1969. Aquest mètode s'utilitza per les extraccions de LPS de tipus R ja que en molts casos l'extracció pel mètode clàssic (fenol-aigua) de les formes R donava rendiments molts baixos. El LPS de tipus R ( en tenir una proporció molt gran de lípid A ) és bastant hidrofòbic i podia romandre en la fase fenol en l'extracció pel mètode clàssic.

En aquest mètode es duu a terme primer la deshidratació de les cèl.lules i posteriorment es duu a terme el tractament amb el reactiu PCP i la precipitació del LPS. A diferència del mètode d'extracció amb fenol i aigua, aquest mètode permet extreure el LPS sense necessitat de dur a terme els passos de purificació per ultracentrifugació. Els passos que es van dur a terme van ser els següents:

#### Deshidratació de les cèl.lules

La deshidratació de les cèl.lules es va dur a terme després del creixement cel.lular. (A partir de 30 l de cultiu o bé a partir de cultius més petits -5 l-).

En primer lloc, es duen a terme tres rentats amb una barreja de cloroform i metanol (1:1). En cada pas la barreja de cèl.lules i el dissolvent s'ha d'homogenitzar usant un homogenitzador i a continuació es centrifuga a baixa velocitat per recollir el sediment cel.lular. El segon rentat s'efectua amb etanol. Abans de centrifugar es deixa amb etanol durant tota la nit. A continuació es duen a terme dos rentats amb acetona i un rentat amb dietileter. En aquest últim pas no es centrifuga sinó que es deixa secant-se tota la nit.

#### Extracció amb PCP

En primer lloc es prepara el reactiu del PCP. Les proporcions que s'utilitzen en el cas del PCP1 són les següents:

-fenol al 90%-2

-cloroform-5

-èter de petroli (40-60)-8

En primer lloc s'afegeix el fenol, després l'éter i finalment el cloroform amb agitació constat. Per tal d'aconseguir la dissolució total, s'afegeix fenol sòlid.

A continuació s'afegeix el reactiu del PCP (300-400 ml per 50g de cèl.lules deshidratades). S'homogenitza la suspensió amb un homogenitzador durant 30 segons i

s'agita durant una hora amb un agitador magnètic. Es centrifuga a 4000 rpm durant 10 minuts i es filtra el sobrenadant.

El sobrenadant s'evapora al rotavapor per tal d'eliminar les restes de cloroform (s'evapora fins que no s'observa la presència de condensació en el matrau).

Es repeteix l'extracció amb les cèl.lules, es filtra el sobrenadant i s'evapora. Els dos sobrenadants no es combinen fins després de la precipitació.

#### Precipitació

La precipitació es duu a terme en tubs de vidre de 30 ml. S'hi afegeix el contingut dels sobrenadants i s'afegeix un gota d'aigua bidestil.lada i s'observa la formació de cristalls de fenol. S'afegeix més aigua gota a gota i s'observa la precipitació del LPS. És important no afegir un excés d'aigua perquè sinó es formen dues fases (aigua i fenol) i el LPS no queda en el fons del tub després de la centrifugació.

A continuació es centrifuga a 3000 rpm durant 10 minuts i s'elimina el sobrenadant.

#### Rentats

El sediment, que conté el LPS, es renta amb fenol al 80% tres vegades. Cada vegada s'homogenitza amb espàtula i es centrifuga a 3000 rpm durant 10 minuts.

A continuació es duen a terme 3 rentats amb acetona i un rentat final amb acetona pura. Es deixa secar a 37°C durant una estona o bé a la campana d'extracció durant tota la nit.

#### Rendiment

Els rendiments que se solen obtenir mitjançant aquest mètode estan al voltant del 3%.

### ***9.1.3 Extracció de LPS a partir de membranes totals***

Aquest mètode va ser l'utilitzat en primer terme per a l'extracció d'LPS. S'obtingueren, però, rendiments força baixos i s'observà que les mostres d'LPS contenien impureses d'àcids nucleics i de proteïnes. Aquest mètode es basa en l'extracció d'LPS a partir de l'emboltura cel.lular a través d'un tractament amb fenol al 45% i precipitació de la fase aquosa amb  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ .

#### Obtenció de membranes totals:

- Partir d'un cultiu de 2l de la soca bacteriana de la qual es vol obtenir LPS.
- Centrifugar a 8000rpm durant 15 minuts a 4°C.
- Resuspendre en 125-150ml del tampó Tris-NaCl fred.
- Sonicar o passar la suspensió bacteriana per la French Press (French<sup>R</sup> Pressure cell Press SLM AMINCO) dues vegades.

-Centrifugar a baixa velocitat (6000 rpm) durant 15 minuts a 4°C

Recollir el sobrenedant.

-Centrifugar el sobrenedant durant 2 hores a 20000 rpm a 4°C. Es recull el pellet que conté les membranes totals.

### Extracció de LPS:

-Afegir 20 ml d'aigua desionitzada a les membranes totals i 1.28 volums de fenol al 80% per cada ml d'aigua.

-Incubar a 70°C durant 10minuts amb agitació.

-Repartir en tubs de vidre i deixar en gel durant 3-4minuts.

-Centrifugar a 10500 rpm durant 15 minuts a 4°C.

-Agafar la fase aquosa (superior) i guardar-la.

-Mesurar el volum de fase fenol (inferior) i afegir-li la mateixa quantitat d'aigua desionitzada (1:1), incubar la barreja a 70°C durant 10 minuts amb agitació.

-Repartir en tubs de vidre i deixar-los en gel durant 3-4 minuts.

-Centrifugar a 10500 rpm durant 15 minuts a 4°C.

-Recollir la fase aquosa i reunir-la amb l'anterior.

-Dialitzar la fase aquosa a 4°C davant d'aigua desionitzada durant 24 hores realitzant diversos canvis.

### Precipitació de l'LPS:

-Treure el contingut dels tubs de diàlisi i medir-lo en una proveta.

-Afegir la proporció adequada de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1M (2.5 ml de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  per cada 100 ml de fase aquosa) i es deixa 20 minuts en gel.

-Centrifugar a 17000 rpm durant 20 minuts en tubs no opacs.

-Resuspendre en 5ml de 0.01M d'EDTA pH=7.5.

-Dialitzar davant d'un litre d'EDTA 0.01M pH=7.5 a 4°C durant 24 hores. Realitzar diversos canvis.

-Dialitzar davant d'aigua desionitzada durant 24 hores amb 2-3 canvis.

-Congelar i liofilitzar.

## **9.2 Purificació del LPS**

Una vegada obtingut el LPS extret es va determinar la presència d'àcids nucleics i de proteïnes com a contaminants. La presència d'àcids nucleics es va determinar mesurant l'absorbància a 260nm. Per a la determinació de proteïnes es va determinar mesurant l'absorbància a 280 nm o bé es va seguir el procediment segons Bradford. Es va fer, en primer lloc, una recta de regressió utilitzant la proteïna BSA en tampó PBS pH=7.2. Les mostres a determinar contenien 20, 25 i 30  $\mu\text{l}$  d'una solució de LPS 5mg/ml. Aquests volums es van portar a un volum final de 100 $\mu\text{l}$ . Com a blancs es van utilitzar 100 $\mu\text{l}$  del tampó PBS pH=7.2. Es va afegir a cada tub 5ml del reactiu de Bradford (Bio-Rad<sup>R</sup> Protein Assay) -prèviament diluït i filtrat, es va agitar i es va mesurar a 595nm.



Si la concentració d'àcids nucleics i de proteïnes és elevada es duen a terme passos de purificació mitjançant tractaments amb DNAasa, RNAasa i Proteïna K. En primer lloc es va realitzar el tractament amb DNAasa i RNAasa en una solució de LPS de 5mg/ml i amb una concentració de cada enzim de 5mg/mL. Es va deixar incubar a 37°C durant 15 min. A continuació es va incubar amb una concentració de Proteïna K a una concentració de 1µg/ml durant 12 hores a 50-55°C.

### **9.3 Mètodes d'anàlisi colorimètrica del LPS**

#### **9.3.1 Determinació de Kdo**

Es va utilitzar un mètode posat a punt per Karkhanis *et al.* (1978) que constiueix una alternativa al mètode tradicional establert per Weissbach i Hurwitch i modificat per Osborne. En aquest mètode antic la mostra que contenia LPS s'hidrolitzava amb H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N a 100°C durant 20 minuts. Després es tractava amb HIO<sub>4</sub> i NaAsO<sub>4</sub>. L'àcid formilpirúvic format en aquesta reacció reaccionava amb l'àcid tiobarbitúric (TBA) generant un cromòfor de color vermell amb una absorció màxima a 548 nm. Aquest mètode, però, comporta una sèrie de desavantatges com per exemple l'aparició de terbolesa quan la barreja es deixa a temperatura ambient i en escalfar part del cromòfor es pot descomposar. El mètode segons Karkhanis consta dels passos següents:

#### Hidròlisi

-S'afegeixen 50µl de HCl 2M a 50µl d'una solució estàndard 10mM de Kdo. S'afegeixen 50µl de HCl 2M a 50µl d'una solució d'LPS 5mg/ml. Els dos tubs es tanquen hermèticament per fusió i s'escalfen 100°C durant 2 hores.

-Es preparen parells de tubs amb 1, 2, 3, 4 i 5 µl de la solució estàndard per fer la recta patró. Es fan servir tres tubs per fer el blanc. Els tubs amb les mostres d'LPS s'obren i es centrifuga el contingut fins obtenir un sobrenadant clar. Es transfereixen 5, 10 i 15 µl del sobrenadant a tubs nous.

-S'afegeixen 250 µl d'aigua destil·lada a tots els tubs.

#### Reacció colorimètrica

-S'afegeixen 125 µl d'àcid periòdic (H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub>) en 0.125N d'àcid sulfúric. Es deixa a 20-22°C durant 30 minuts.

-S'afegeixen 125 µl de NaAsO<sub>2</sub> 0.2M en 0.5M de HCl i 250µl d'una solució d'àcid tiobarbitúric acabada de preparar a 0-4°C.

-S'escalfen els tubs a 100°C durant 15 minuts i en calent s'afegeixen 500µl de dimetilsulfòxid (DMSO). Les solucions es van mesurar usant un espectrofotòmetre a 549 nm.

### **9.3.2 Determinació de glucosamina amb el carboni anomèric lliure**

En aquest procés es detecten només els residus de GlcN amb el carboni anomèric lliure (White, 1983). En aquest protocol no es duu a terme un pas d'hidròlisi.

-Es preparen parells de tubs amb 5, 10 i 15 µl d'una solució d'LPS 5mg/ml.

-Paral·lelament, es preparen parells de tubs amb 2, 4, 6, 8 i 10 µl d'una solució de GlcN 5mM per fer la recta patró i tres tubs per fer el blanc.

-S'afegeixen 50µl d'aigua destil·lada a tots els tubs.

-Es deixa en un dessecador amb buit durant 1 hora.

-S'afegeixen 60µl de la següent solució: 10µl de bicarbonat sòdic + 40µl d'aigua destil·lada + 10µl d'anhidrid acètic al 5% acabat de preparar en un bany de gel) i es deixa a 20-22°C durant 10 minuts.

-A continuació s'escalfen els tubs a 100°C durant 3 minuts.

Es deixen refredar els tubs i s'afegeixen 700µl del reactiu de Morgan-Elson ( 2parts de MER-16g de dimetilaminbenzaldehyd + 95 ml d'àcid acètic + 5ml d'HCl concentrat- + 5 parts d'àcid acètic). ES posen els tubs en un bany a 37°C durant 20 minuts. Es mesura en un espectrofotòmetre a 585 nm.

### **9.3.3 Determinació de glucosamina total**

Es va seguir el procediment d'Elson-Morgan modificat per White i Wass (1983). Aquest mètode es va utilitzar per detectar el contingut total de GlcN en la mostra.

-A 100µl d'una solució d'LPS 5 mg/ml s'hi afegeixen 100µl d'una solució d'HCl 8N. Els tubs es tanquen hermèticament i es posen a 100°C durant 12 hores.

-S'obren els tubs i es col·loca el contingut en tubs de centrifuga de 1.5 ml i es centrifuga fins obtenir un sobrenadant clar.

-Es pipetegen 5, 10 i 15 µl d'aquest sobrenadant en nous tubs. Paral·lelament, es preparen parells de tubs amb 2, 4, 6, 8 i 10 µl d'una solució de GlcN 5mM per fer la recta patró i tres tubs per fer el blanc.

-S'afegeixen 50µl d'aigua destil·lada a tots els tubs

-Es deixa en un dessecador amb buit durant 3-4 hores.

-S'afegeixen 50µl d'aigua destil·lada a tots els tubs i es repeteix l'operació anterior 3 vegades.

-S'afegeixen 60µl de la següent solució: 10µl de bicarbonat sòdic saturat + 40µl d'aigua destil·lada + 10µl d'anhidrid acètic al 5% acabat de preparar en un bany de gel) i es deixa a 20-22°C durant 10 minuts.

-Les solucions es s'escalfen a 100°C durant 3minuts i es deixen refredar.

-S'afegeixen 50µl de borat sòdic al 5% i s'escalfen els tubs a 100°C durant 7 minuts.

-Es deixen refredar les solucions i s'afegeixen 700µl del reactiu de Morgan-Elson ( 2parts de MER-16g de dimetilaminbenzaldehyd + 95 ml d'àcid acètic + 5ml d'HCl concentrat- + 5 parts d'àcid acètic). Es posen els tubs en un bany a 37°C durant 20 minuts. Es mesura en un espectrofotòmetre a 585 nm.

### 9.3.4 Determinació de fosfat total

La determinació de fosfat es va dur a terme segons Lowry *et al.* (1954).

-Es preparen parells de tubs amb 2, 4 i 8 µl d'una solució d'LPS 5 mg/ml.

-Paral·lelament, es preparen parells de tubs amb 2, 4, 6, 8 i 10 µl de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5mM per a la recta patró i tres tubs per fer el blanc.

-S'afegeixen 50µl d'aigua destil·lada a cada tub.

-Es deixa en un dessecador amb buit durant 12 hores.

-S'afegeix 500µl de l'agent alliberador del fosfat (62,7 ml H<sub>2</sub>O + 30,6 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>conc+6,7 ml 70%HCIO<sub>4</sub>) i s'escalfen els tubs a 100°C durant una hora i a continuació s'escalfen a 165°C durant 2 hores.

-Es deixen refredar els tubs i s'afegeix 1 ml de reactiu de color (1.0 ml de acetat sòdic IM + 1.0 ml d'una solució de molibdat amònic + 7.0 ml d'aigua destil·lada + 1 ml d'àcid ascòrbic al 10 % acabat de preparar a 0°C)

-Els tubs es deixen durant 90 minuts en un bany a 37°C. Les solucions es mesuren a l'espectrofotòmetre a 820 nm.

### 9.3.5 Determinació de fosfat inorgànic

Aquest mètode permet determinar el fosfat lliure, present en la mostra, que no forma part del LPS. Es detecta la presència de grups fosfat lliures, generats durant l'extracció que poden provenir d'altres constituents cel·lulars.

-Es preparen parells de tubs amb 10, 20 i 30 µl d'una solució d'LPS 5mg/ml.

-Paral·lelament, es preparen parells de tubs amb 2, 4, 6, 8 i 10 µl de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5mM i tres tubs per fer la recta patró.

-S'afegeix aigua destil·lada a cada tub fins obtenir un volum final de 100 µl S'afegeix en 900 µl del següent reactiu: 5.4ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.3N preparat en fred +0.6ml d'una solució de molibdat amònic 2.5%+ 3 ml d'àcid ascòrbic al 10% acabat de preparar. Es posen els tubs en un bany a 37°C durant 30 minuts.

-Es mesuren les solucions en un espectrofotòmetre a 820nm.

## **9.4 Mètodes de degradació del LPS**

### **9.4.1 Hidròlisi amb àcid acètic**

La hidròlisi amb àcid acètic al 1 % trenca els enllaços entre la GlcN i el Kdo i entre dues molècules de Kdo. Habitualment, aquesta hidròlisi es duu a terme en els casos en què la hidrazinolisi no és possible (per la presència d'àcids urònics, etc.). Després d'aquest tractament, el producte hidrolitzat es pot separar en una columna G-50 podent així separar les fraccions corresponents al nucli i al nucli més antigen O.

-A partir d'una mostra de LPS, s'afegeix un determinat volum d'àcid acètic al 1% fins obtenir una concentració final de 10mg LPS/ml.

-Les mostres s'incuben a 100°C durant aproximadament 1 hora i mitja (fins observar la formació del precipitat) amb agitació constant.

-A continuació, es centrifuguen les mostres a baixa velocitat i el sobrenadant es centrifuga a 100.000g durant 4 hores.

-Es recull el sobrenadant i es liofilitza.

### **9.4.2 Hidrazinolisi**

La hidrazina provoca una des-O-acilació dels àcids grassos units per enllaç ester. Es va dur a terme aquest procediment tal com el va descriure Haishima (1992). La hidrazina constitueix un potent nucleòfil capaç d'atacar el carboni del grup ester trencant, per tant, les unions entre els àcids grassos i els residus de GlcN. La hidrazinolisi constitueix el mètode d'elecció per estudiar la fracció polisacàridica del LPS. Ara bé, està totalment desaconsellat si es sospita de la presència d'àcids urònics ja que després de la hidrazinolisi s'utilitzen condicions bàsiques per hidrolitzar els enllaços amida que provoquen un procés de  $\beta$ -eliminació de l'H situat al costat del grup carboxil de l'àcid urònic. La  $\beta$ -eliminació provoca la ruptura de l'oligosacàrid.

-A partir de la mostra de LPS completament seca, s'afegeix, en gel, un volum d'hidrazina anhidre (Kodak<sup>R</sup>,USA) fins aconseguir una concentració final aproximada de 1mg/ml. Després de sonicar, s'incuben les mostres a 37°C durant 30 minuts. Durant aquest temps es pot sonicar les mostres diverses vegades.

- En gel, s'afegeix el contingut de les mostres a un tub de centrifuga (que contingui 10 vegades el volum de la mostra en acetona) en gel i gota a gota.
- Es deixa en gel durant 30 minuts per afavorir la precipitació del LPS des-O-acilat.
- Es centrifuga a una velocitat d'unes 3000rpm durant 30 minuts. S'elimina el sobrenadant i es renta de nou el pèllet amb acetona. Es poden dur a terme uns 3 rentats amb acetona.
- Finalment, es recull el pèllet amb acetona i s'evapora el dissolvent en un dessecador o en el Speed vac.

### **9.4.3 Tractament amb HF (Eliminació de grups fosfat)**

El tractament amb HF al 48% elimina els fosfats presents en la molècula de LPS. Aquest procediment es va dur a terme a petita i a gran escala.

- Es prepara un tub de plàstic amb la mostra de LPS completament seca i s'hi afegeix HF al 48% (Merck<sup>R</sup>) en gel fins a una concentració final de 50mg/ml. A continuació es deixa incubant durant 48 hores a 4°C amb agitació.
- Es neutralitzen les mostres amb NaOH al 50% amb agitació i en gel.
- Es dialitzen les mostres front a aigua bidestil.lada.
- Per comprovar que els fosfats han estat hidrolitzats, es pot dur a terme la determinació colorimètrica del fosfat total i del fosfat inorgànic.

### **9.5 Cromatografia per gel-filtració**

Es va utilitzar la Cromatografia de gel-filtració per purificar mostres de LPS, en alguns casos per separar diferents fraccions de polisacàrid i altres casos per eliminar contaminants com ara sals.

#### **9.5.1 Columna de Sephadex G-50**

Es va utilitzar aquesta columna per separar les diferents fraccions provinents de la hidròlisi amb acètic. En aquesta columna és possible separar la fracció corresponent al polisacàrid de l'antigen O, els oligosacàrids corresponents al nucli i una fracció corresponent a monosacàrids.

El volum mort de la columna és de 50 ml i es va utilitzar com eluent una solució d'acetat de piridina 0.05M. Les mostres es van córrer a un fluxe de 1ml/min. Es va utilitzar com a detector un refractòmetre. Les fraccions positives es van confirmar a través de cromatografia en capa fina.

### **9.5.2 Columna de Sephadex G-10**

Es va utilitzar aquesta columna per eliminar les sals contaminants de les mostres de LPS, normalment després d'una cromatografia d'intercanvi iònic. El volum mort de la columna va ser de 33 ml. L'eluent que es va utilitzar va ser acetat de piridina 0.05M i el fluxe va ser de 1ml/min. Es va utilitzar un refractòmetre com a detector. Les fraccions positives es van resoldre a través de cromatografia en capa fina.

### **9.5.3 Columna de Superdex 75**

Es va utilitzar aquesta columna per purificar LPS del tipus R, després de la hidròlisi amb acètic, en lloc de la columna G-50. Es va utilitzar com a eluent acetat de piridina 0.05M i un fluxe de 1ml/min. El seguiment de les fraccions positives es va dur a terme per reacció colorimètrica del Kdo.

### **9.5.4 Columna de BIO-Gel P-4**

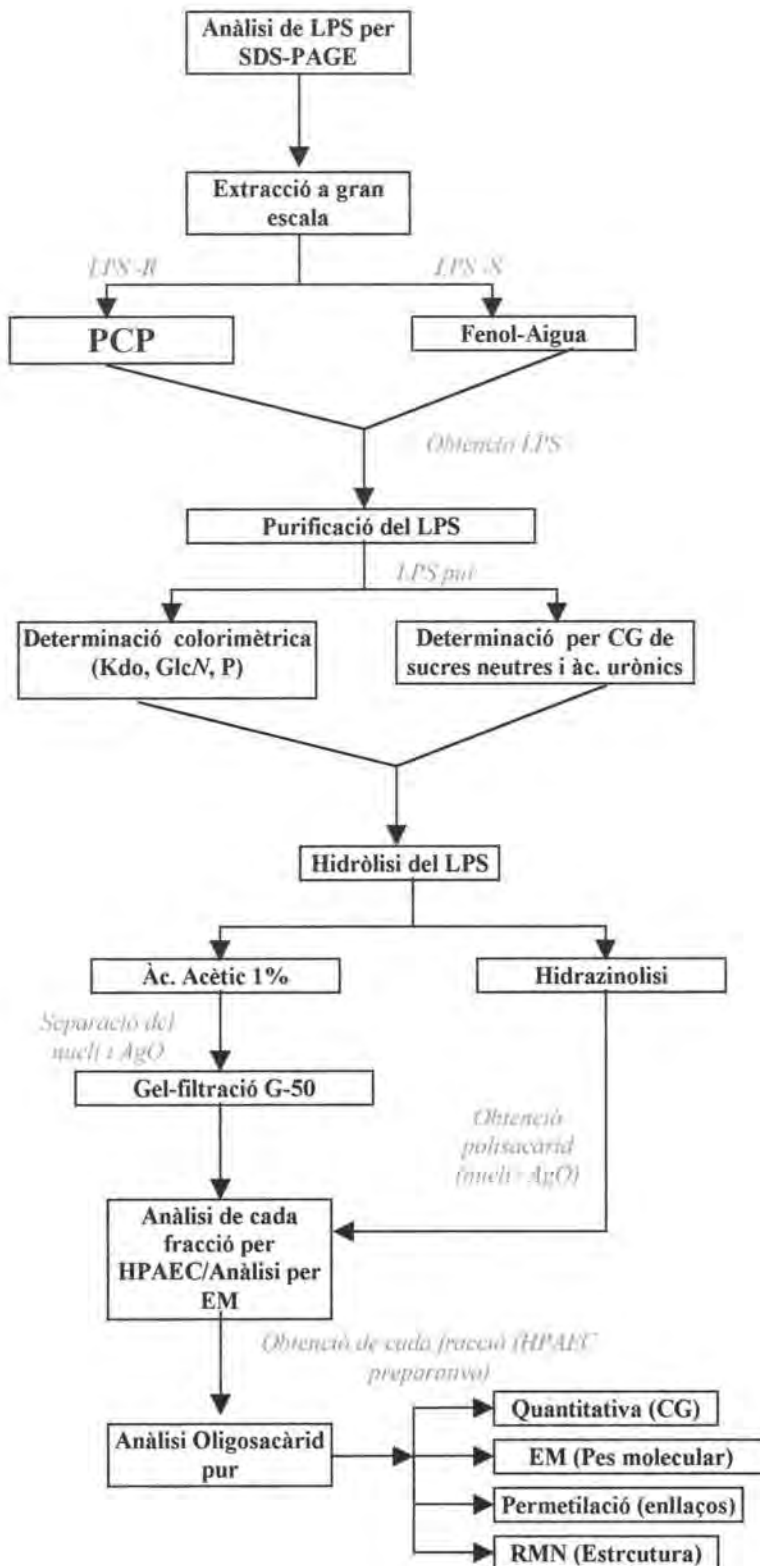
Aquesta columna es va utilitzar per tal de separar els diferents oligosacàrids provinents de la hidròlisi amb acètic i després de ser purificats en una columna de Superdex 75. Es va utilitzar com a eluent àcid acètic 0.1M i un fluxe de 0.5ml/min. El seguiment es va dur a terme per reacció colorimètrica del Kdo.

## **9.6 Cromatografia en capa-fina**

Es va utilitzar aquesta tècnica per tal de fer un screening de les fraccions positives provinents de les columnes anteriors. Es va utilitzar com a matriu TLC aluminium sheets, Silica gel 60, Merck<sup>R</sup>. Es va aplicar un volum de mostra de 9µl, es van submergir les mostres en àcid sulfúric al 10% en etanol i es van escalfar a 100°C.

De la mateixa manera, es va utilitzar la mateixa tècnica per determinar quantitativament els monosacàrids presents en una mostra de LPS.

Figura 10. Esquema dels passos seguits per a l'anàlisi de la part polisacàridica de la molècula de LPS.



En aquest cas, es va dur a terme la hidròlisi a 100°C durant 4 hores. Es va partir de 200 µg de mostra als quals es va afegir 1ml de HCl 1M. A continuació es va evaporar el contingut al rotavapor i es va rentar dues vegades amb aigua bidestil·lada.

Les mostres es van córrer sota una atmosfera saturada en acetonitril i aigua (80:15). La sembra de les mostres es va efectuar en plaques de Silica gel 60 (Merck<sup>R</sup>) junt amb els estàndards tractats prèviament de la mateixa manera que les mostres. Els estàndards usats van ser: Glc, Gal, Man, GalA, GlcA i ManA.

Les mostres es van córrer dues vegades amb un període de secat intermig.

A continuació es va dur a terme la tinció usant H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% en etanol i orcinol a una concentració de 1mg/ml. Finalment, es va escalfar a 150°C.

### **9.7 Cromatografia d'intercanvi iònic (DEAE)**

Es van utilitzar dos tipus diferents de matrius: DEAE TSK 650m (Merck<sup>R</sup>) o bé DEAE Sepharose CL 6B (Pharmacia<sup>R</sup>). En els dos casos es va utilitzar una columna d'un volum de 40 ml. L'eluent usat va ser aigua i concentracions creixents de NaCl (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5M). Es va utilitzar aquesta columna per separar polisacàrids neutres de polisacàrids àcids.

### **9.8 Cromatografia d'intercanvi iònic d'alta resolució (HPAEC)**

El 1959, Frahn i Mills van posar de manifest que els grups hidroxils dels carbohidrats es poden ionitzar en condicions alcalines fortes. Aquest fet es va utilitzar per separar carbohidrats a través de cromatografia d'intercanvi iònic a partir del 1962.

Abans que el sistema d'HPAEC es posés a punt, es duia a terme cromatografia líquida per separar carbohidrats utilitzant matrius de sílica o columnes d'intercanvi catiónic acoplades a detecció per índex de refracció o UV. Aquests sistemes presentaven molts inconvenients, com ara la baixa sensibilitat i resolució o la necessitat de derivatització.

La posada en funcionament de l'HPAEC va permetre una separació eficaç dels sucres. Acoplada a un detector amperomètric de pulsació (PAD), permet la quantificació directa de carbohidrats no-derivatitzats a nivells de picomols. La separació d'oligosacàrids i glicopèptids amb diferències estructurals mínimes és possible.



En HPAEC, s'utilitzen solucions bàsiques fortes com a eluents, normalment NaOH, tot i que també es pot dur a terme en condicions neutres. En els dos casos, s'utilitza un gradient d'acetat sòdic. En condicions bàsiques, els grups hidroxils dels carbohidrats es converteixen en oxianions. Per tant, és possible cromatografiar-los com a anions, sense necessitat de derivatització.

Existeixen petites diferències en el  $pK_A$  dels diferents grups presents en els carbohidrats. Aquestes diferències repercuteixen en la interacció de l'oxoanió amb la resina de la columna d'intercanvi i, per tant, això es veu reflectit en temps de retenció diferents. El  $pK_A$  per cada grup hidroxil està influït per l'entorn. Així, el grup hidroxil anomèric és més àcidic que la resta. En oligo i polisacàrids, les posicions de l'enllaç influeixen també en els temps de retenció.

Donat que HPAEC es duu a terme sovint en condicions alcalines, el mètode de detecció ha de ser compatible amb les condicions alcalines. El detector PAD, amb un electro d'or, compleix aquesta condició. Si l'eluent és bàsic (més de 0.1M NaOH) el detector pot funcionar sense bases addicionals. Ara bé, si l'eluent és neutre llavors s'ha d'usar una postcolumna en condicions alcalines. Cal tenir en compte, que les condicions alcalines són incompatibles amb algun tipus de sucre. És el cas dels àcids urònics, per exemple l'àcid galacturònic. En condicions bàsiques experimenten una  $\beta$ -eliminació i per tant la molècula d'oligosacàrid es trenca. També cal anar amb compte amb els residus de Kdo. La detecció amperomètrica normal no és útil per la detecció de carbohidrats perquè es produeix una contaminació irreversible de l'electrode deguda als productes d'oxidació. En el cas de l'amperímetre de pulsació triple, aquest problema no es dona donat que en aquest sistema es regenera l'electrode.

Per tal de separar els oligosacàrids corresponents a les nostres mostres, es van dur a terme separacions en condicions neutres i en condicions bàsiques. En els dos casos, es van dur a terme cromatografies analítiques (usant 150 $\mu$ g de mostra) (en una columna CarboPac PA100) i cromatografies preparatives (usant de 20 a 40 mg de mostra) (en una columna CarboPac PA1). En condicions neutres es va utilitzar un gradient de Acetat sòdic 1 M i en condicions bàsiques es va utilitzar un gradient d'Acetat sòdic 1M en 0,1 M de NaOH.

## 9.9 Cromatografia de gasos

Les mostres es van córrer prèvia preparació com a alditol acetats o sucres metilats (protocols descrits a continuació).

El programa de temperatures usat per Cromatografia de gasos va ser el següent:

150°C durant 5 minuts, 3°C/min fins a 300 °C i 300°C durant 5 minuts.

L'aparell usat va ser un Varian model 3700. Es va utilitzar H<sub>2</sub> com a gas portador a una pressió de 1,5 bar.

També es va usar l'aparell Hewlett-Packard (model 5890 Serie II ) usant He com a gas portador i el següent programa de temperatures:

175°C durant 2 minuts, 8°C/min fins a 240°C, 240°C durant 1 minut, 8°C/min fins a 265°C, 265°C durant 12 minuts.

### 9.9.1 Mètode de derivatització de monosacàrids a alditol derivats per a la determinació de sucres neutres

Es va dur a terme el procediment descrit per Vinogradov (1992) amb algunes modificacions en la hidròlisi. Aquest mètode consisteix, en primer lloc, en una hidròlisi en condicions àcides per tal d'obtenir monosacàrids lliures que, en solució, presenten l'equilibri entre les formes linials i cíclics. En la forma linial, el grup aldehid pot ser reduït a grup alcohol mitjançant NaBH<sub>4</sub>. Tots els grups hidroxils són acetilats mitjançant anídrid acètic en condicions bàsiques. Els monosacàrids permetilats són volàtils i poden ser analitzats mitjançant cromatografia de gasos.

#### Hidròlisi

A partir d'una solució de 5mg/mL d'LPS s'agafen 100µl i s'hi afegeix 1 ml de HCl 0.1M. Es deixa a 100°C durant 48 hores. La hidròlisi també es pot dur a terme afegint 1 ml de d'àcid trifluoroacètic (TFA) i deixar la mostra a 100°C durant 4 hores.

Es deixen refredar les mostres i s'afegeix 30µg de l'estàndard intern (xilosa). S'evapora al rotavapor.

#### Extracció dels àcids grassos

S'afegeix 1ml d'èter al 10% en hexà i es treu. Es repeteix l'extracció i s'evapora al rotavapor.

### Reducció dels grups aldehids a alcohol

S'alcalinitzen les mostres afegint-hi 500µl d'aigua destil.lada i unes gotes de NaOH 1N fins obtenir un pH de 8.

A continuació s'afegeix 2mg de NaBH<sub>4</sub> en gel.

Es deixa durant 4hores a 20-22°C o bé durant tota la nit a 4°C

### Eliminació del NaBH<sub>4</sub>

S'afegeix HCl 2M gota a gota fins que ja no es produeix més efervescència i s'evapora al rotavapor.

S'afegeix 1ml d'àcid acètic 5% en metanol i es barreja al vòrtex. Es repeteix l'operació tres vegades.

S'afegeix 1ml de metanol i es renta dues vegades.

### Peracetilació.

S'afegeix 200µL d'anhidrid acètic i s'escalfa a 85°C durant 15 minuts. S'asseca sota corrent de N<sub>2</sub>.

S'afegeix 200µl de piridina i 100µl d'anhidrid acètic. Es deixa a 85°C durant 30 minuts. S'asseca sota corrent de N<sub>2</sub>.

S'afegeixen unes gotes de CHCl<sub>3</sub> i es recull la fase orgànica. S'evapora sota corrent de N<sub>2</sub> i es resuspèn en 40 µl de CHCl<sub>3</sub>.

## ***9.9.2 Mètode de derivatització de monosacàrids a alditols derivats per a la determinació d'aminosucres***

Habitualment, els aminosucres no es detecten utilitzant el mètode de derivatització per a sucres neutres. Els aminosucres requereixen un pas extra per ser N-acetilats. Aquest pas es duu a terme abans de la reducció.

### Hidròlisi

Es parteix de 100µl d'una solució d'LPS 5mg/ml i s'hi afegeix 1ml de HCl 4M. Es deixa a 100°C durant 4 hores (o bé 18 si volem eliminar completament els sucres neutres).

A continuació s'afegeix la xilosa com a estàndard intern (30µg) i s'evapora.

Es duen a terme 4 rentants amb aigua destil.lada (75µl).

### N-Acetilació

S'afegeix 500µl de NaHCO<sub>3</sub> saturat a 0°C.

S'afegeix 25 µl d'anhidrid acètic a 0°C tres vegades.

Es deixa a temperatura ambient durant 30minuts.

Es neutralitza amb HCl 1M fins a un pH de 7 i s'evapora al rotavapor.

### Carboxireducció

S'afegeix 500µl d'aigua destil·lada i NaOH fins un pH de 8.

S'afegeix 3mg de NaBH<sub>4</sub> i es deixa a temperatura ambient durant 4 hores o bé a 4°C tota la nit.

S'afegeix HCl 2M gota a gota fins que deixa d'haver-hi efervescència.

Es fan tres rentats amb 500µl d'àcid acètic al 5% en metanol i s'evapora cada vegada al rotavapor.

Es fan dos rentats amb 500µl de metanol i s'evapora cada vegada al rotavapor.

### Peracetilació

S'afegeixen 200µl d'anhidrid acètic i es deixa a 85°C durant 15 minuts. S'asseca sota un corrent de N<sub>2</sub>.

S'afegeixen 200µl de piridina i 100µl d'anhidrid acètic i es deixa durant 30 minuts a 85°C. S'asseca sota un corrent de N<sub>2</sub>.

S'afegeix unes gotes de CHCl<sub>3</sub>, es recull la fase clorofòrmica i s'asseca sota corrent de N<sub>2</sub>.

S'afegeixen 40µl de CHCl<sub>3</sub> abans de la injecció. S'injecten entre 0.5 i 2µl de mostra.

## ***9.9.3 Mètode de derivatització de monosacàrids a alditols derivats per a la determinació d'àcids urònics***

Aquest procediment es basa en el mateix principi que el mètode per derivatitzar els sucres neutres. La única diferència consisteix a afegir un pas de metanolisi, reacció específica pels àcids urònics. Habitualment, l'àcid urònic derivatitzat apareix en el cromatograma en la mateixa posició que el sucre neutre del qual deriva. Per tant, la mesura de la concentració d'àcid urònic es realitza per diferència amb la concentració del sucre neutre mesurat pel sistema descrit anteriorment. El procediment, descrit per Süsskind (1998), és el següent:

### Metanolisi

A partir d'una solució de 5mg/mL d'LPS s'agafen 100µl, es col·loquen en un tub de vidre i es deixen secar en un dessecador. Quan la mostra està completament seca s'hi afegeixen 500 µl d'una solució de 0,5M de HCl en metanol. Aleshores, es tanca hermèticament el tub de vidre i es deixa 45min a 85 °C.

A continuació, s'evapora el contingut del tub mitjançant un rotavapor.

### Carboxireducció

S'afegeix 500µl d'aigua destil·lada i NaOH fins un pH de 8.

S'afegeix 3mg de NaBD<sub>4</sub> i es deixa a temperatura ambient durant 4 hores o bé a 4°C tota la nit.

S'afegeix HCl 2M gota a gota fins que deixa d'haver-hi efervescència.

Es fan tres rentats amb 500µl d'àcid acètic al 5% en metanol i s'evapora cada vegada al rotavapor.

Es fan dos rentats amb 500µl de metanol i s'evapora cada vegada al rotavapor.

### Hidròlisi

A partir d'aquest pas es procedeix igual que en el mètode dels sucres neutres. A la mostra que ja tenim hi afegim una segona mostra de LPS que no ha estat metanolitzat. A partir d'una solució de 5mg/mL d'LPS s'agafen 100µl i s'hi afegeix 1 ml de HCl 0.1M. Es deixa a 100°C durant 48 hores.

Es deixen refredar les mostres i s'afegeix 30µg de l'estàndard intern (xilosa). S'evapora al rotavapor.

### Extracció dels àcids grassos

S'afegeix 1ml d'èter al 10% en hexà i es treu. Es repeteix l'extracció i s'evapora al rotavapor.

### Reducció dels grups aldehids a alcohol

S'alcalinitzen les mostres afegint-hi 500µl d'aigua destil·lada i unes gotes de NaOH 1N fins obtenir un pH de 8.

A continuació s'afegeix 2mg de NaBH<sub>4</sub> en gel.

Es deixa durant 4hores a 20-22°C o bé durant tota la nit a 4°C

### Eliminació del NaBH<sub>4</sub>

S'afegeix HCl 2M gota a gota fins que ja no es produeix més efervescència i s'evapora al rotavapor.

S'afegeix 1ml d'àcid acètic 5% en metanol i es barreja al vòrtex. Es repeteix l'operació tres vegades.

S'afegeix 1ml de metanol i es renta dues vegades.

### Peracetilació.

S'afegeix 200µL d'anhidrid acètic i s'escalfa a 85°C durant 15 minuts. S'asseca sota corrent de N<sub>2</sub>.

S'afegeix 200µl de piridina i 100µl d'anhidrid acètic. Es deixa a 85°C durant 30 minuts. S'asseca sota corrent de N<sub>2</sub>.

S'afegeixen unes gotes de CHCl<sub>3</sub> i es recull la fase orgànica. S'evapora sota corrent de N<sub>2</sub> i es resuspèn en 40 µl de CHCl<sub>3</sub>.

## ***9.10 Cromatografia de gasos acoblada a Espectrometria de masses (GC-MS)***

Es va utilitzar per tal d'identificar amb exactitud els pics observats per cromatografia de gasos i per tal de determinar les posicions metilades dels sucres després del procés de permetilació. També es va usar aquest sistema per determinar la presència de residus de Ko i de arabinosamina.

Les mostres es van córrer un aparell Hewlett-Packard model 5989 A amb una columna capil·lar HP-5. El gradient de temperatura usat va ser de 150 a 320 °C a 5°C/min.

L'espectrometria d'impacte electrònic es va dur a terme a 70 keV i la ionització química es va dur a terme usant amoniac com a gas reactant.

### ***9.10.1 Anàlisi per GC-MS de monosacàrids metilats i acetilats parcialment.***

Es va seguir el procediment descrit per Holst *et al.* (1990). Aquest mètode, anomenat permetilació, consisteix en metilar, amb un agent metilant, tots els hidroxils lliures presents en un oligosacàrid. A continuació, s'hidrolitza l'oligosacàrid i es derivatitzen els monosacàrids a alditol-derivats. Aquest mètode serveix per conèixer les posicions implicades en els enllaços (posicions que, en la mostra, apareixeran com a grups acetils). Els passos que es van seguir es descriuen a continuació:

-A partir de 6-10 mg de mostra completament seca, s'afegeixen 500 µl de DMSO anhidre. S'afegeixen uns mg de NaOH i es tanca la mostra hermèticament.

-Es sotmet a mostra a una corrent de N<sub>2</sub> durant 10 minuts.

-S'afegeixen 500 µl de MeI i es deixa a temperatura ambient durant 15 minuts amb agitació. S'afegeixen 300 µl més de MeI i es deixa a temperatura ambient durant 1 hora amb a agitació.

-S'eliminen les restes de MeI sota un corrent de N<sub>2</sub>.

-A continuació es duu a terme una extracció amb aigua i cloroform per tal d'eliminar el DMSO. S'afegeix la mateixa quantitat d'aigua que de cloroform i s'agita. A continuació, es recullen les dues fases per separat. La fase aquosa es renta 3 vegades amb cloroform i la fase clorofòrmica es renta tres vegades amb aigua. Finalment, s'evapora la fase cloroform amb N<sub>2</sub>.

Aquest procediment enllaça amb el procediment habitual de preparació dels alditol derivats (hidròlisi, reducció, etc.)

## ***9.11 Espectrometria de masses***

### ***9.11.1 MALDI MS***

Les anàlisis que es van dur a terme per MALDI MS (Matrix-assited laser desorption ionization Mas Spectrometry) es van mesurar en un aparell Bruker-Reflex III (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, Alemanya) linealment i amb una configuració del reflector

TOF (time-of-flight) a un voltatge d'acceleració de 20 kV i amb una extracció iònica retardada.

Els compostos es van dissoldre en aigua destil·lada a una concentració de 20 µg/µl. Per eliminar cations, la mostra (15 µl) es va tractar amb petites quantitats d'una resina d'intercanvi catiònic (Amberlite IR-120, Merck, Darmstadt, Alemanya). 2 µl dels sobrenadants es van barrejar amb 2 µl de solució de la matriu 0.5M d'àcid 2,5-dihidroxibenzoic, DHB, (Aldrich, Steinheim, Alemanya) en metanol. Aliquotes de 0.5 µl es van dipositar en una peça metàl·lica i van ser analitzats immediatament després de ser secades sota corrent d'aire.

L'espectre en la modalitat TOF es va calibrar internament amb components similars d'estructura coneguda.

### **9.11.2 Electrospray (ESI)**

Les mostres de LPS purificades van ser analitzades per Electrospray Mass Spectrometry (ESI-MS) utilitzant un espectròmetre de masses VG Quattro (Fisons Instruments). Els espectres es van realitzar en el mode negatiu en una franja de  $m/z$  de 200-2200. Les mostres van ser dissoltes en aigua destil·lada fins a una concentració final de 1-3 µg/ml i es van injectar alíquotes de 3 µl mitjançant un injector Rheodyne en un corrent constant de H<sub>2</sub>O/acetonitril (1/1, vol/vol) contenint 10% de trietilamina. Un fluxe de 15 µl/min va ser mantingut durant l'anàlisi.

### **9.12 Ressonància magnètica nuclear (RMN)**

Els espectres de RMN van ser analitzats en una solució de 0.5ml de <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O en un aparell Bruker AVANCE DPX360 (amb freqüències de 360 MHz per <sup>1</sup>H-RMN i 90.6 MHz per <sup>13</sup>C-RMN) o bé en un aparell Bruker AVANCE DRX600 (amb freqüències de 600 MHz per <sup>1</sup>H-RMN i 125.77 Mhz per <sup>13</sup>C-RMN). Les mostres es van mesurar a 27 °C.

# Resultats

---



# 1. OBTENCIÓ DEL CÒSMID RECOMBINANT COSFGR2

La genoteca d'ADN cromosòmic de la soca *Serratia marcescens* N28b, utilitzant com a vector el còsmid recombinant Supercos 1 (Stratagene), es va introduir en *E. coli* NM554, sensible a la bacteriocina 28b, i els clons recombinants es van seleccionar en plaques de TSA suplementades amb Kanamicina (50µg/ml) com a marcador del còsmid supercos 1. Els clons obtinguts es van analitzar per determinar la resistència a la bacteriocina 28b. Es van identificar un total de 21 clons que presentaven diferents graus de resistència front la bacteriocina 28b (Resultats de la Tesi Doctoral de Joan Francesc Guasch, 1994). D'aquests clons se'n van escollir tres pel seu posterior estudi. La característica comuna d'aquests tres clons era que presentaven un nivell de resistència a la bacteriocina 28b elevat.

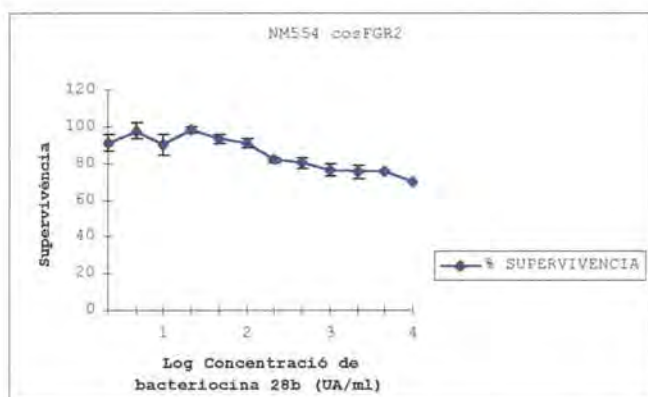
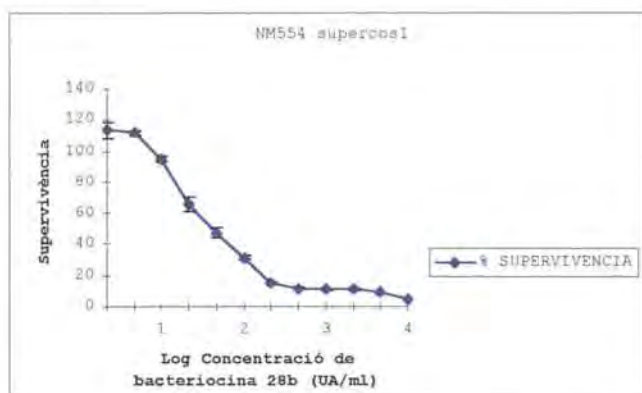
L'estudi dels tres clons recombinants va donar lloc a la caracterització genètica de la proteïna de membrana externa Omp4 (còsmid cosFGR4), (Guasch *et al*, 1995), a la caracterització de gens involucrats en la biosíntesi de l'antigen O (còsmid cosFGR2), (Rubires *et al*, 1997), (Saigi *et al*, 1999) i, en el present treball (publicat en part en l'article Guasch *et al*, 1996) a la caracterització de gens involucrats en la biosíntesi del nucli del LPS.

L'estudi del còsmid cosFGR2 va donar lloc a la seqüenciació del gen *kdtA* (*waaA*) a través del subclon pSKF41. La utilització dels dos vectors va permetre la seqüenciació d'una part important del cluster *waa*.

## ***1.1 Fenotips conferits pel còsmid cosFGR2.***

La soca NM554 cosFGR2 va presentar un nivell elevat de resistència a la bacteriocina 28b (Figura 1.1) i alhora va presentar una alteració de la mobilitat del LPS en gels de nucli (Figura 1.2).

**Figura 1.1** Corbes de resistència a la bacteriocina 28b per a les soques NM554 supercos1 i NM554 cosFGR2.



**Figura 1.2** Anàlisi del nucli del LPS mitjançant gels de nucli-Tricina de les soques NM554 (carril 1) i NM554 cosFGR2 (carril 2).



## ***1.2 Estudi dels sucres neutres per Cromatografia de gasos presents en el LPS de les soques NM554 supercos i NM554 cosFGR2.***

Per analitzar químicament els LPS corresponents a aquestes dues soques, es va realitzar un creixement de les soques a petita escala. Es van fer créixer les soques tota la nit, a 37°C, en un volum de 3l. Mitjançant el procediment d'extracció de Westphal modificat per Osborn (Apartat 10.1.3 de Material i Mètodes) es van obtenir 7,4 mg de LPS de la soca NM554 supercos i 7,0 mg de LPS de la soca NM554 cosFGR2. Es va utilitzar 1 mg de LPS de cada soca per dur a terme el procés d'hidròlisi i derivatització. Les mostres finals es van analitzar per Cromatografia de Gasos. L'anàlisi de les dues mostres va posar de manifest que el LPS de les dues soques contenia com a sucres majoritaris Hep i Glc. Es va determinar també per reaccions colorimètriques la concentració de Kdo. Es va detectar Glc, Hep i Kdo com a únics sucres presents en les dues mostres de LPS. En el cas del LPS pertanyent a la soca recombinant, es va observar un increment en la quantitat de Kdo, d'Hep i de Glc respecte al LPS de la soca control.

## ***1.3 El còsmid cosFGR2 conté una regió homòloga a la regió waa d'E. coli***

Els plàsmids pBA1767, pJK2252 i pCP2089 que contenen regions *rfa* d'*E. coli* (Veure taula 2.1 de Material i mètodes) es van digerir amb *SalI-EcoRI*, *SalI-EcoRI* i *SalI-SacI* respectivament. A partir del plàsmid pBA1767 es va obtenir una banda de 3,4 kb que contenia el gen *waaQ* (*rfaQ*) i una part del gen *waaA* (*kdtA*). A partir del plàsmid pJK2252 es va obtenir una banda de 5,5 kb que contenia la regió *waaZKLCF* i a partir del plàsmid pCP2089 es va obtenir una banda de 5,0 kb que cotenia els gens *waaGPSBI*. Aquestes bandes es van purificar i marcar amb digoxigenina i es van utilitzar per dur a terme experiments d'hibridació amb el plàsmid pSKF41, derivat del còsmid cosFGR2. Els resultats d'hibridació ens van indicar que en l'insert del plàsmid pSKF41 es trobaven gens homòlegs als gens d'*E. coli* *waaaQ* i *waaA*.

El fet que el cosFGR2 confereixi resistència a la bacteriocina 28b (que utilitza com a receptors les proteïnes OmpA i OmpF i el LPS ), provoqui una alteració en la mobilitat en gels de nucli i en la composició química del LPS quan s'expressa en *E. coli* implica que els gens continguts en cosFGR2 modifiquen el LPS d'*E. coli*.

Per altra banda, tant a *E. coli* com a *S. enterica* la majoria dels gens implicats en la biosíntesi d'aquesta estructura es troben agrupats en el cluster *waa*.

Per tant, era raonable suposar que en el còsmid cosFGR2 es trobava, com a mínim, una part d'aquest cluster de *S. marcescens*. Això va ser confirmat demostrant la presència en el cosFGR2 de gens capaços d'hibridar amb gens homòlegs d'*E. coli* mitjançant la hibridació Southern.

Aquest resultat ens va conduir a determinar la seqüència de nucleòtids de la major part de l'ínter del cosFGR2 per tal de descobrir i analitzar els gens del cluster *waa* de *S. marcescens* N28b.

## 2. ESTRATÈGIES DE SEQÜENCIACIÓ I ANÀLISI DE LA SEQÜÈNCIA

### 2.1 *Subclonatge i seqüenciació de l'insert del plàsmid pSKF41*

El subclonatge del còsmid cosFGR2 es va dur a terme per digestió del còsmid amb l'enzim *Bam*HI. Un fragment de 5.6 Kb es va lligar amb el vector pSK digerit amb *Bam* HI i defosforilat. El plàsmid resultant es va anomenar pSKF41. A través de la inserció amb el transposó *Tn5tac1* en el plàsmid pSKF41 es va realitzar la seqüenciació del gen *waaA* (Resultats de la Tesi Doctoral de Joan Francesc Guasch, 1994) (Guasch *et al.*, 1996).

A partir de la seqüència del gen *waaA* es va procedir a seqüenciar la zona contigua d'aquest gen continguda en el plàsmid pSKF41 mitjançant els cebadors F412 i S4M2 (Taula 2.1). Es va dur a terme una seqüenciació progressiva en les dues direccions del gen *waaA*. Una vegada es va obtenir un tram de seqüència, es van dissenyar nous cebadors, distals al punt d'origen. També es van dissenyar cebadors que van permetre la seqüenciació de la cadena complementària per tal de confirmar la informació obtinguda i resoldre ambigüetats i compressions.

Els oligonucleòtids usats per seqüenciar la resta del insert contingut en el plàsmid pSKF41 (Taula 2.1) es van obtenir de Pharmacia LKB i van ser dissenyats mitjançant el programa Amplify (University of Wisconsin, 445 Henry Mall, Madison 53706).

Es van seqüenciar un total de 5.175 pb i, a continuació, es va procedir a l'anàlisi de la seqüència.

Es van detectar les possibles pautes de lectura obertes o ORF (*Open Reading Frame*) i es van descartar inicialment totes les pautes de menys de 90 pb. Les ORFs considerades potencialment significatives es van sotmetre a una comparació davant de diferents bancs de dades de seqüències d'ADN o proteïnes utilitzant el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), del EBI Center, UK (<http://www.ebi.ac.uk>) amb la base de dades Swall.

L'anàlisi preliminar es va completar amb la localització de regions associables a promotors "caixes -35 i -10". En la Taula 2.2 es resumeixen les ORFs caracteritzades a partir de la seqüenciació del plàsmid pSKF41.

**Taula 2.1.** Oligonucleòtids usats en la seqüenciació del plàsmid pSKF41.

NOM DEL CEBADOR	SEQÜÈNCIA DEL CEBADOR
F500	5'-AAAGTCAGACACCGCCCG-3'
S4M2	5'- TGGAAGTTGAAATTTCTG-3'
F413	5'-CAAGCCATTCCGATCCCG-3'
F412	5'- TTTGCACCACGCCTCTGA-3'
S131	5'-AGCGCAGGCAGTCCGGCA-3'
F431	5'-CGCAGGCTGTATTTGCAA-3'
F415	5'-TATGCGACCGGGTGCTGT-3'
F416	5'-ACAGCGGGTGCTGACCA-3'
Univ2	5'-TGGCGCAAGCTGACCGA -3'
F1540	5'-CGCCAAAGTCTTCACGCA-3'
F2310	5'-GCATCTGGACAATGTGGA-3'
F980	5'-GAGCTGGTACAGAAGGCC-3'
F417	5'-GCGACGATATTTCTCCCC-3'
Univ3	5'-CGATCTGGTGTCTCCAA-3'
F440	5'-ACATCGGGCAGGAAAGGC-3'
Univ4	5'-GCTGGCTTTGATCGGCAC-3'

**Taula 2.2** Conjunt d'ORFs caracteritzades a partir de la seqüenciació del plàsmid pSKF41.

ORF	POSICIÓ	%G+C	PROTEÏNA CODIFICADA		pI <sup>a</sup>	GRAVY <sup>b</sup>
			AA	kDa <sup>a</sup>		
<i>waaB</i>	508-1608	59,5	366	40,3	9,14	-0,114
<i>waaQ</i>	1653-2666 <sup>c</sup>	55,4	337	38,2	8,97	-0,239
<i>waaA</i>	2802-4069	61,3	425	47,6	9,53	-0,055
<i>waaE</i>	4070-4843	61,4	257	29,2	8,82	-0,283
<i>kdtB</i>	4847-5332	60,2	161	17,6	5,55	0,242

a: massa molecular i punt isoelèctric calculat usant el programa ProtParam d'ExPassy.

b: Promig d'hidrofobicitat de la proteïna, utilitzant el mètode descrit per Kyte i Doolittle (Kyte i Doolittle, 1982).

c: cadena complementària d'ADN.

## 2.2 L'operó *waaA* conté tres gens en *Serratia marcescens*.

A diferència de l'operó *waaA* d'*E. coli* i *S. enterica* sv. Typhimurium, formats únicament pels gens *waaA* (*waaA* i *kdtB* en *E. coli* K-12), l'operó *waaA* en *Serratia*

*marcescens* va resultar contenir tres gens que es van anomenar *waaA*, *waaE* (prèviament descrit com a *kdtX*) i *kdtB*.

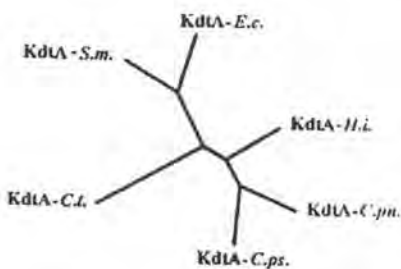
L'anàlisi de la seqüència de la regió "downstream" del gen *waaA* va permetre identificar dues ORFs transcrites en la mateixa direcció que el gen *waaA*. La primera ORF codificava per a una proteïna de 257 residus amb una massa molecular teòrica de 29,23 kDa. La segona ORF codificava per a una proteïna de 161 residus d'aminoàcids amb un pes molecular teòric de 18 kDa. Es va trobar el començament d'una tercera ORF transcrita en direcció oposada a les ORFs anteriors.

### 2.2.1 Característiques del gen *waaA*

El gen *waaA* va ser caracteritzat per Guasch (1996). La proteïna codificada per aquest gen presenta alts nivells de similitud amb les proteïnes WaaA de *Klebsiella pneumoniae* (83%), *E. coli* (88%) i *Salmonella enterica* (79%).

Amb la seqüència d'aminoàcids de la proteïna WaaA es va dur a terme una anàlisi filogenètica mitjançant el mètode parsimònic.

**Figura 2.1** Anàlisi filogenètica a partir de les seqüències d'aminoàcids mitjançant el mètode parsimònic utilitzant l'algoritme PROTPARS. *E. c.*=*E. coli*, *S. m.*=*S. marcescens*, *H. i.*=*H. influenzae*, *C. t.*=*Chlamydia trachomatis*, *C. pn.*=*Chlamydia pneumoniae*, *C. ps.*=*Chlamydia psittaci*.



### 2.2.2 Característiques del gen *waaE*

El pèptid de 257 aminoàcids codificat per la ORF identificada a continuació del gen *waaA*, anomenada com a gen *waaE*, va presentar un nivell d'identitat d'aminoàcids del 34% i un 49% de similitud amb la proteïna codificada pel gen *lgtF* de *Neisseria meningitidis* (Kahler, C. M., et al. 1996) i un 51% d'identitat i 65% de similitud amb la proteïna HIO653 d' *Haemophilus influenzae*, descrita com a glicosil transferasa. El gen *waaE* també ha estat descrit en *Klebsiella pneumoniae* (Climent, tesi doc., 2000). Les proteïnes WaaE de *S. marcescens* i de *K. pneumoniae* presenten alts nivells de similitud

i identitat (un 81% i un 70%, respectivament) (Figura 2.2). La comparació de clusters hidrofòbics entre les proteïnes WaaE de *S. marcescens* i LgtF de *N. meningitidis* posa de manifest la relació entre les dues proteïnes (Figura 2.3). A més, també va presentar un nivell d'identitat d'aminoàcids del 20% i un 48% de similitud amb la proteïna codificada pel gen *kdtB* d'*Haemophilus influenzae* i nivells similars amb la proteïna TrsB de *Yersinia enterocolitica* (Taula 2.3).

Donat que el gen *lgtF* correspon a una proteïna que transfereix un residu de Glc en posició  $\beta(1\rightarrow4)$  a la Hep I del nucli intern del LOS es pot suggerir que la proteïna WaaE podria correspondre a l'enzim que afegiria una Glc a la HepI del nucli intern en *Serratia marcescens*. A més, el gen *waaE* també s'ha descrit en *K. pneumoniae* i en *Proteus mirabilis* (Abitiu, tesi doc. en preparació). En aquestes espècies l'estructura del nucli del LPS està descrita i presenta, en els dos casos, una Glc unida a l'HepI del nucli intern en posició  $\beta(1\rightarrow4)$ . La funció del gen *waaE* ha estat objecte d'estudi en la present tesi doctoral.

**Taula 2.3** Proteïnes similars a la proteïna WaaE de *S. marcescens*.

PROTEÏNA	Nº D'AA	% SIMILITUD	% IDENTITAT
WaaE <i>K. pneumoniae</i>	258	80	70
HI0653 <i>H. influenzae</i>	254	65	51
LgtF <i>N. meningitidis</i>	252	49	34
$\beta(1,4)$ -glucosil-transferasa <i>Aquifex aeolicus</i>	251	56	33
IcsBA <i>N. meningitidis</i>	253	47	35
LpsC <i>Sinorhizobium meliloti</i>	305	45	27
Glicosil transferasa <i>Rickettsia prowazekii</i>	292	47	27
TrsB <i>Yersinia enterocolitica</i>	318	53	30
KdtB <i>H. influenzae</i>	156	48	20



**Figura 2.2** Alineament entre la seqüència d'aminoàcids corresponent a la proteïna WaaE de *Serratia marcescens* i la de la proteïna WaaE de *Klebsiella pneumoniae*.

WaaE Sm	MKAFLLAIVRRKYRPDGGGAERFVSRALKALEQQDLNLNVTREWQGDANPNWHIHCNPL	60
WaaE Kp	MSKFRLLALVRQKYRPDGGGAERFVSRALDSSHLQLNVITREWQGPVKPDWQIHCNPR	60
	* . * ** : ** : ***** : ** : . . * : ***** . : * : ** : ** *	
WaaE Sm	KLGRISRERGFVAARALWQKERFDLVQSHERIPGCDIYRAGDGVHRRWLLQRRALLPEW	120
WaaE Kp	KWGRISRERGFANAARALWQRESFDLVQSHERIPGCDLYRAGDGVHRRWLQQRSRILPAW	120
	* ***** * : ***** : ***** * : * : ** *	
WaaE Sm	RRKWLFSNRYHRYVMCAERAMYAAPCLKAVICNAEMIKREI IADFGVPADKITVIYNAID	180
WaaE Kp	KSRLLFSDRYHRYVMQAEREMYEDSHLRGVICNAEMIKREI IEDFGLPAEKIHVIYNAID	180
	: : ** : ***** ** * . . * : ***** * : * : ** *****	
WaaE Sm	NQKFPPEDEAQRRLREQYQIPQQAHLIFVGSGERKGLAAAIRAVAATDSHLLVVGKD	240
WaaE Kp	NQRFLPPDEDITFAALRAKWLPLQATCLIVVGSGERKGLAAAIRAIAPTDRYLLVVGKD	240
	** : * , ** * : * : * * * : ***** : * : * : *****	
WaaE Sm	KAEKRYRALAQLGCGDRIHFMGVQKQTLFPYQAADALLPTLYDPFPNVILEAMSCGLP	300
WaaE Kp	KDQPRYQALAKSLGCEARVRFQMGQSETLFPYQADGLLLPTLYDPFPNVILEAMACGLP	300
	* : ** : ** : ** * : * : * : * . ***** * , ***** : *****	
WaaE Sm	VITSTTCGGAEIFTPGQNGFVTDALDVPATEAIRALPRQALGSSMGEAARLRIMTATPA	360
WaaE Kp	VITTTGCGGAEIFVDGHNQYVCDALDIPALQQAVMALPPRALGSAEGGHARERIMACTSE	360
	*** : * ***** . * : ** * * : ** : * : * : * : * : * : * : * : * ,	
WaaE Sm	HLSEQLISLYNRLLD	375
WaaE Kp	RLSTQLLSLYQDLVN	375
	: ** * : ** : * : :	

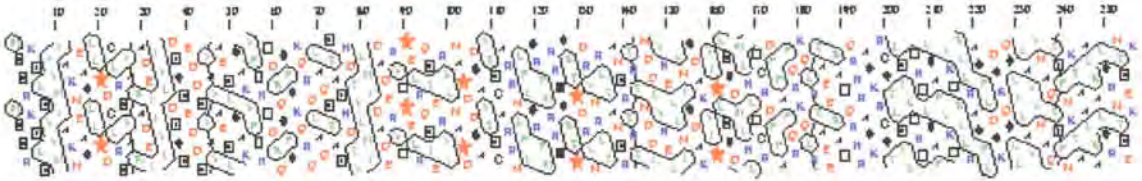
\*=aminoàcids idèntics.

: =aminoàcids molt similars quant a propietats fisico-químiques

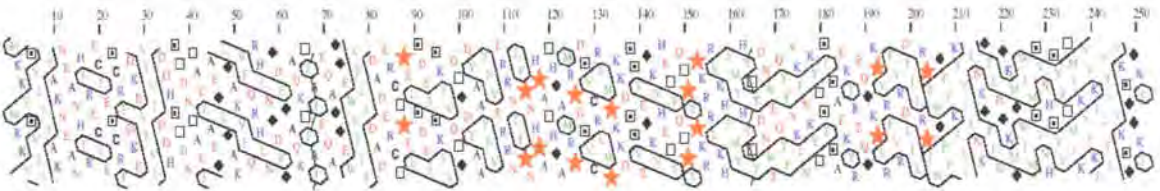
. =aminoàcids similars quant a propietats fisico-químiques

**Figura 2.3** Comparació de l'estructura secundària predita per anàlisi HCA (Gaboriaud *et al.*, 1987) entre la proteïna WaaE de *S. marcescens* i LgtF de *N. meningitidis*.

#### WaaE *Serratia marcescens*



#### LgtF *Neisseria meningitidis*



### 2.2.3 Característiques del gen *kdtB*

L'ORF situada a continuació del gen *kdtA* o *waaA* contenia 483pb i codificava per a una proteïna de 161 aminoàcids que presentava alts nivells de similitud i identitat amb la proteïna codificada pel gen *kdtB* de *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* K-12 i *Haemophilus influenzae* (Taula 2.4) i proteïnes similars de *Chromatium vinosum*, *Synechococcus* sp., *Synechocystis* sp i *B. subtilis*. La funció de la proteïna KdtB no es coneix però es pensa que podria estar involucrada en la biosíntesi del LPS. A més, sembla que el gen *kdtB* és essencial ja que no s'han aconseguit mutants fins al moment en *E. coli*.

**Taula 2.4** Proteïnes similars a la proteïna KdtB de *S. marcescens*.

PROTEÏNA	Nº D'AA	% SIMILITUD	% IDENTITAT
KdtB <i>S. marcescens</i>	161		
KdtB <i>K. pneumoniae</i>	159	90	77
KdtB <i>E.coli</i> K-12	159	90	77

KdtB <i>Haemophilus influenzae</i>	156	74	53
KdtB-like <i>Chromatium vinosum</i>	169	71	50
KdtB-like <i>Synechococcus</i> spp	167	69	49
KdtB-like <i>Synechocystis</i> spp	159	71	47
HP1475 <i>Helicobacter pylori</i>	157	67	46
Y1bI <i>Bacillus subtilis</i>	161	68	45
KdtB-like <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	161	64	42
KdtB-like <i>Borrelia burgdorferi</i>	163	58	35
KdtB <i>Mycoplasma capricolum</i>	140	57	31

### 2.3 Característiques del gen *waaQ*

En direcció oposada a l'operó *waaA* es va caracteritzar una ORF que codifica per a una proteïna de 337 aminoàcids (Taula 2.5). Aquesta proteïna presenta alts nivells de similitud i identitat amb ADP-Heptosa-LPS-heptosil transferases de diferents bacteries Gram negatives, especialment amb la proteïna WaaQ de *Klebsiella pneumoniae* (25 % d'identitat, 45 % de similitud). Alhora, aquesta proteïna presenta similitud amb la resta d'heptosil transferases descrites en *E. coli* i *S. enterica* (WaaF i WaaC).

**Taula 2.5** Proteïnes similars a la proteïna WaaQ de *S. marcescens*.

PROTEÏNA	Nº D'AA	% SIMILITUD	% IDENTITAT
WaaQ <i>S. marcescens</i>	337		
WaaQ <i>K. pneumoniae</i>	358	45	25
WaaQ <i>S. enterica</i>	344	43	24
WaaQ <i>E. coli</i> R4	340	41	23
WaaQ <i>E. coli</i> R1	340	40	23
WaaQ <i>E. coli</i> R3	340	39	23
WaaQ <i>E. coli</i> K-12	344	55	34
WaaF <i>Haemophilus Influenzae</i>	346	43	23
WaaF <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	336	45	28

WaaC <i>Campylobacter jejuni</i>	342	45	24
WaaF <i>E. coli</i> K-12	348	43	23
WaaC <i>K. pneumoniae</i>	323	41	20
WaaC <i>N. meningitidis</i>	326	44	26
WaaF <i>P. aeruginosa</i>	345	40	22
WaaF <i>S. enterica</i>	348	43	22
WaaC <i>E. coli</i> K-12	296	41	22
WaaF <i>K. pneumoniae</i>	346	47	25

## 2.4 Característiques del gen *waaB*

En direcció oposada al gen *waaQ* es va identificar una ORF que codifica per a una proteïna de 366 aminoàcids (Taula 2.6). Aquesta proteïna es va anomenar WaaB en tant que presentava un cert nivell de similitud i identitat amb les proteïnes WaaB d'*E. coli* K-12 (27 i 45%) i *S. enterica* (27 i 49%). No obstant això, però, els nivells més alts de similitud i identitat els presenta amb la proteïna WaaB de *K. pneumoniae* (64 i 77%). Aquest fet suggereix que les proteïnes WaaB podrien tenir una funció diferent en *S. marcescens* i *K. pneumoniae* en tant que les estructures químiques d'aquestes dues espècies presenten diferències importants amb les estructures d'*E. coli* i *S. enterica*. Alguns resultats obtinguts en el nostre grup d'investigació (Climent, Tesi doctoral, 2000 i Coderch, tesi doctoral en preparació) apunten que es podria tractar d'una transferasa que transfereix àcid galacturònic tant en *Serratia marcescens* com en *Klebsiella pneumoniae*. Alhora, la proteïna WaaB presenta un cert nivell de similitud amb la proteïna WaaG, tant de *S. marcescens* com de *K. pneumoniae* (Taula 2.6). Aquest fet, suggereix que les proteïnes WaaG i WaaB en *S. marcescens* i *K. pneumoniae* constitueixen un grup de proteïnes relacionades amb una funció similar.

**Taula 2.6** Proteïnes similars a la proteïna WaaB de *S. marcescens*.

PROTEÏNA	Nº D'AA	% SIMILITUD	% IDENTITAT
WaaB <i>S. marcescens</i>	366		
WaaB <i>K. pneumoniae</i>	364	71	59
WlaE <i>Campylobacter jejuni</i>	365	46	27

Cap <i>Aquifex aeolicus</i>	316	52	33
Transferasa <i>Streptomyces coelicolor</i>	697	47	28
Galactosil transferasa <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	383	47	27
Proteïna de biosíntesi del LPS <i>Thermotoga maritima</i>	388	47	26
RfbU <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	382	44	28
Proteïna biosíntesi Càpsula <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	405	42	29
Galactosil transferasa <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	356	58	38
LPS 1,6-Galactosil transferasa (WaaB) <i>S. enterica</i>	359	26	48
WaaB <i>E. coli</i> K-12	369	27	46
WaaB <i>E. coli</i> R-2	359	28	47
WaaG <i>S. marcescens</i>	375	42	26
WaaG <i>K. pneumoniae</i>	375	43	24

## 2.5. Seqüenciació de la regió distal al cluster waa. Anàlisi de la seqüència

El plàsmid subFGR2 es va construir a partir del còsmid original cosFGR2. Es va dur a terme una digestió del còsmid cosFGR2 amb *NotI*, obtenint 5 bandes de 15 kb, 7 kb, 4 kb, 2kb i 0,7kb. A continuació es va procedir a purificar al banda de 15 kb i es va lligar al vector pACYC184 digerit amb *EagI* i defosforilat. Una vegada realitzada la construcció, es va continuar les reaccions de seqüenciació utilitzant els oligonucleòtids de les regions distals del plàsmid seqüenciat inicialment, pSKF41. La seqüència obtinguda i la posició dels cebadors dissenyats es mostra en l'Annex I.

Els oligonucleòtids que es van dissenyar per la seqüenciació de l'insert del plàsmid subFGR2 es mostren en la Taula 2.7.

**Taula 2.7** Oligonucleòtids utilitzats en la seqüenciació del plàsmid subFGR2.

NOM DEL CEBADOR	SEQÜÈNCIA DEL CEBADOR
Fun1	5'-CACAGGGTCAGCACCCT-3'
Fun2	5'-TCACATTCGGGAACGGAT -3'
Tpg1	5'-GTAAACCTGCAGCTCCTG -3'
Tpg2	5'-GCAGGATCATACCGTTGTT -3'
Tpg3	5'-GGCTTAGTACGCTTGTT -3'
Tpg4	5'-GAGCCATCTCAGCAAACCTT -3'
Patet2	5'-GCGATCCTGTTCAAACATTA -3'
Tpg5	5'-TCGGCATGACTGGGTTCA -3'
Tpg6	5'-TCGTGTTCTCCCTGAAA -3'
Tpg8	5'-GCCATGAACCAGCAGATGTAT -3'
Tpg9	5'-TCCGGCAAACATATTGTGC -3'
Patet3	5'-GCTCTGTGCGGCTTATGT -3'
Patet4	5'-ATGCACCATCGTGGTTTCA -3'
Patet4.1	5'-TGGCCTTGATAATCGGAGTC -3'
HAM	5'-GCCACTCAGCAGCAGATTT-3'

La seqüenciació del plàsmid subFGR2 va permetre caracteritzar tots els gens implicats en la biosíntesi del nucli del LPS continguts en el còsmid original cosFGR2 així com els gens distals situats a continuació del gen *kdtB*. La seqüència completa de l'insert d'aquest plàsmid es mostra en l'Annex I.

La seqüenciació a partir del plàsmid subFGR2 va permetre caracteritzar una sèrie de ORF que, en principi, no codificaven per cap proteïna relacionada amb la biosíntesi del nucli del LPS. En la Taula 2.8 es descriuen algunes característiques d'aquestes ORF i la seva ubicació en la seqüència.

**Taula 2.8** Conjunt d'ORFs corresponents a la regió distal del cluster *waa* seqüenciades en plàsmid subFGR2.

ORF	POSICIÓ	% G+C	PROTEÏNA CODIFICADA		pI <sup>a</sup>	GRAVY <sup>b</sup>
			AA	KDa <sup>a</sup>		
<i>fpg</i>	5336-6161 <sup>c</sup>	60,4	271	30,5249	8,56	-0,339
<i>rpmG</i>	6233-6400 <sup>c</sup>	41,6	55	6,3435	10,25	-0,815

<i>rpmB</i>	6412-6648 <sup>c</sup>	24,0	78	8,9664	11,24	-0,635
<i>radC</i>	6911-7594 <sup>c</sup>	57,6	227	25,2752	7,21	0,087
<i>dfp</i>	7622-8995	61,5	457	49,1897	8,51	-0,041
<i>dut</i>	8973-9431	64,0	152	16,2025	5,25	0,064
<i>ttk</i>	9682-10278	56,6	198	23,0736	9,16	-0,323

a: massa molecular i punt isoelèctric calculat usant el programa ProtParam d'ExPassy.

b: Promig d'hidrofobicitat de la proteïna, utilitzant el mètode descrit per Kyte i Doolittle (Kyte i Doolittle, 1982).

c: cadena complementària d'ADN.

### 2.5.1 El gen *fpg*

L'ORF que es va identificar a continuació de l'operó *kdt* va codificar per a una proteïna que presentava similitud amb la proteïna Fpg d'*E. coli*, pressuntament involucrada en la reparació de l'ADN després de fenòmens de mutagènesi ocasionada per agents alquilants (Ishchenko *et al.*, 1999). En el cas de *Serratia marcescens*, aquesta ORF es transcriu en direcció oposada a l'operó *kdt* i codifica per a una proteïna de 271 aa que presenta un 76% d'identitat i un 86% de similitud amb la proteïna Fpg d'*E. coli*.

En la Figura 2.4 es mostra l'alineament realitzat amb aquesta proteïna.

Figura 2.4 Alineament realitzat a partir de les proteïnes similars a la proteïna Fpg de *S. marcescens*.



	161	.	.	.	2	.	.	.	240																																																																					
FPG <i>Serratia marcescens</i> , -	100.0%	M	D	N	K	L	V	V	G	V	N	I	Y	A	S	E	S	L	F	A	G	I	L	P	D	R	P	A	G	S	L	T	K	A	E	A	N	L	L	A	R	T	I	K	A	V	L	Q	R	S	I	E	Q	G	T	T	L	R	D	F	L	Q	S	D	G	K	R	M	F	A	Q	E	L	V	Y	G		
1 FPG <i>Escherichia coli</i> K-12	76.4%	M	D	N	K	L	V	V	G	V	N	I	Y	A	S	E	S	L	F	A	G	I	H	P	D	R	L	A	S	S	L	S	A	E	C	E	L	L	A	R	V	I	K	A	V	L	L	R	S	I	E	Q	G	T	T	L	R	D	F	L	Q	S	D	G	K	R	M	F	A	Q	E	L	V	Y	G			
2 FPG <i>Salmonella enterica</i>	74.9%	M	D	N	K	L	V	V	G	V	N	I	Y	A	S	E	S	L	F	A	G	I	H	P	D	R	L	A	S	S	L	S	E	E	C	D	L	L	A	R	V	I	K	A	V	L	L	R	S	I	E	Q	G	T	T	L	R	D	F	L	Q	S	D	G	K	R	M	F	A	Q	E	L	V	Y	G			
3 FPG <i>H. influenzae</i>	56.8%	M	D	N	A	V	V	V	G	V	N	I	Y	T	N	E	S	L	F	I	C	G	I	H	P	L	K	L	A	R	N	L	T	R	N	Q	C	F	S	L	V	N	T	I	K	D	V	L	R	K	A	I	Q	G	G	T	T	L	R	D	F	L	Q	P	D	G	R	I	M	F	A	Q	E	L	V	Y	G	
4 FPG <i>N. meningitidis</i>	53.1%	M	D	N	A	V	V	V	G	V	N	I	Y	A	N	E	S	L	F	R	A	G	I	S	P	H	R	N	R	L	R	K	K	E	C	A	L	L	V	E	T	V	K	A	V	L	R	A	I	E	T	G	S	T	L	R	D	F	M	S	D	G	K	R	M	F	A	Q	E	L	V	Y	G					
5 FPG <i>Bacillus firmus</i>	39.6%	L	D	Q	K	T	V	V	G	L	G	N	I	V	D	E	A	L	F	R	A	R	I	H	P	R	L	A	H	S	L	S	K	E	E	M	A	V	L	H	K	A	I	M	L	E	E	A	V	E	M	G	O	S	S	I	K	S	Y	N	G	G	E	M	G	H	F	Q	Q	L	G	V	Y	G				
6 FPG <i>Thermus aquaticus</i>	41.1%	L	D	Q	R	L	V	A	G	L	G	N	I	V	D	E	A	L	F	R	A	R	L	S	P	F	R	R	A	R	S	L	T	E	E	A	R	R	L	Y	R	A	L	R	E	V	L	A	E	A	V	E	L	G	S	T	L	S	D	Y	R	P	D	L	R	G	F	J	I	H	A	V	Y	G				
7 FPG <i>Synechocystis sp</i>	40.0%	L	D	Q	R	L	V	A	G	L	G	N	I	V	D	E	A	L	F	R	A	G	V	H	P	E	T	K	A	N	L	S	D	K	I	K	T	L	H	A	E	I	K	N	T	L	Q	E	A	I	D	A	G	S	T	V	R	S	Y	N	G	Q	E	I	G	M	F	Q	L	G	H	F	Y	G				
8 FPG <i>Bacillus subtilis</i>	37.0%	L	D	Q	K	T	V	V	G	L	G	N	I	V	D	E	A	L	F	R	A	G	V	H	P	E	T	K	A	N	L	S	D	K	I	K	T	L	H	A	E	I	K	N	T	L	Q	E	A	I	D	A	G	S	T	V	R	S	Y	N	G	Q	E	I	G	M	F	Q	L	G	H	F	Y	G				
9 FPG <i>Symomonas mobilis</i>	40.7%	L	D	Q	K	V	V	A	G	I	G	N	I	Y	A	C	E	A	L	H	Q	A	R	I	H	P	Q	R	P	R	N	L	N	F	D	E	I	T	S	L	V	F	S	I	K	N	L	Q	K	A	I	A	E	G	S	T	L	K	D	Y	A	R	P	N	G	E	L	G	Y	F	S	T	K	F	K	V	Y	G
10 FPG <i>Streptococcus mutans</i>	41.0%	L	D	Q	H	L	V	A	G	L	G	N	I	V	D	E	V	L	W	A	A	K	V	D	P	E	R	L	A	S	L	K	I	S	E	I	K	R	I	H	E	T	I	R	-	I	L	Q	I	A	E	K	G	S	T	I	R	S	Y	N	S	L	G	E	D	G	S	M	Q	D	L	Q	V	Y	G			

	241	:	.	.	.	]	271																				
FPG9 <i>Serratia marcescens</i> , -	100.0%	R	A	G	E	P	K	T	G	T	P	I	E	S	A	N	H	Q	R	S	T	F	F	R	R	Q	R
1 FPG <i>Escherichia coli</i> K-12	76.4%	R	K	G	E	P	K	V	G	T	P	I	V	A	T	H	A	Q	R	A	T	F	Y	R	Q	Q	K
2 FPG <i>Salmonella enterica</i>	74.9%	R	K	G	E	P	K	V	G	T	P	I	V	A	T	H	A	Q	R	A	T	F	Y	R	H	Q	K
3 FPG <i>H. influenzae</i>	56.8%	N	K	D	K	P	F	K	G	G	K	I	E	S	L	I	Q	R	N	S	F	F	P	K	Q	K	
4 FPG <i>N. meningitidis</i>	53.1%	R	H	N	Q	P	P	Q	G	L	V	V	K	E	L	Q	Q	R	G	T	F	Y	R	N	Q	K	
5 FPG <i>Bacillus firmus</i>	39.6%	R	R	N	E	P	T	Q	G	I	D	I	L	K	I	V	V	G	R	G	T	H	F	R	N	Q	-
6 FPG <i>Thermus aquaticus</i>	41.1%	R	E	G	L	P	A	G	R	F	V	E	R	R	V	V	A	G	R	G	T	H	F	P	Q	-	
7 FPG <i>Synechocystis sp</i>	40.0%	R	E	G	E	P	I	H	G	T	V	I	A	K	I	K	L	G	R	S	A	H	F	P	Q	-	
8 FPG <i>Bacillus subtilis</i>	37.0%	K	K	D	E	P	R	N	G	T	M	I	S	K	I	V	V	G	R	G	T	H	F	N	K	Q	-
9 FPG <i>Symomonas mobilis</i>	40.7%	K	E	G	E	Q	E	-	G	H	T	I	E	R	Y	L	G	R	S	T	F	L	S	S	Q	K	-
10 FPG <i>Streptococcus mutans</i>	41.0%	K	I	D	Q	P	A	R	A	T	P	I	E	K	I	R	V	G	R	G	T	H	F	R	S	Q	K

### 2.5.2 Els gens rpmG i rpmB

Les dues ORFs que es van identificar van donar nivells de similitud i identitat molt elevades amb les proteïnes RpmG i RpmB d'*E. coli*, codificades pels gens rpmG i rpmB (Taules 2.9 i 2.10). Aquests gens codifiquen per a les proteïnes ribosomals L33 i L28, respectivament. A l'igual que en *E. coli*, els gens rpmG i rpmB estan situats entre els gens fpg i radC i tots quatre formen un operó.

Taula 2.9 Proteïnes similars a la proteïna RpmG de *S. marcescens*.

PROTEÏNA	Nº AA	% SIMILITUD	% IDENTITAT
RpmG <i>S. marcescens</i>	55		
RpmG <i>E. coli</i> K-12	54	100	96
RpmG <i>H. influenzae</i>	56	90	79
RpmG <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	54	77	48
RpmG <i>Rickettsia prowazekii</i>	56	78	55
RpmG <i>Borrelia burgdorferi</i>	59	66	53



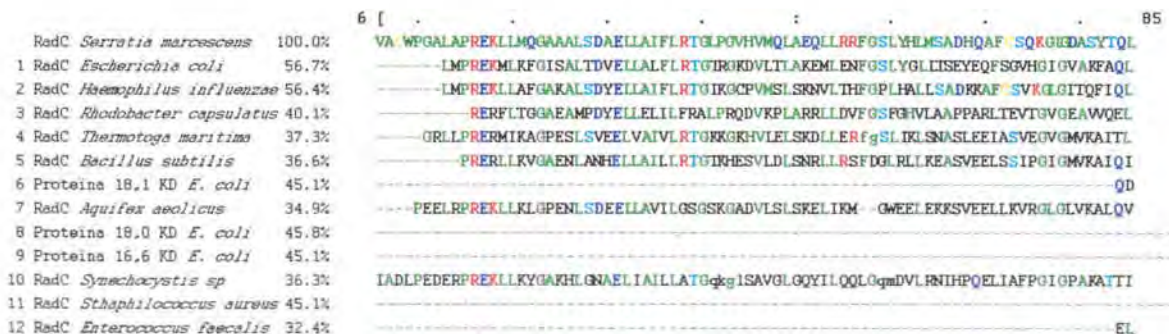
Taula 2.10 Proteïnes similats a la proteïna RpmB de *S. marcescens*.

PROTEÏNA	Nº AA	% SIMILITUD	% IDENTITAT
RpmB <i>S. marcescens</i>	78		
RpmB <i>E. coli</i> K-12	77	100	92
RpmB <i>Salmonella enterica</i>	77	100	90
RpmB <i>H. influenzae</i>	77	94	81
RpmB2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	78	70	46

### 2.5.3 El gen radC

Transcrita en la mateixa direcció que els gens *fpg*, *rpmG* i *rpmB* es va identificar una ORF que codificava per a un proteïna amb alta similitud amb la proteïna RadC d'*E. coli*, codificada pel gen *radC* (Figura 2.5). La proteïna RadC en *E. coli* duu a terme un funció de reparació de l'ADN. El gen homòleg de *Serratia marcescens* codifica per a una proteïna de 227 aa i presenta un 56 % d'identitat i un 80 % de similitud amb la proteïna RadC d'*E. coli*. Una mutació en el gen *radC* d'*E. coli* K-12 sensibilitza les cèl.lules a la radiació ultraviolada, radiacions ionitzants i agents alquilants (Felzenszwalb, 1992).

Figura 2.5 Alineament realitzat a partir de la proteïna RadC de *Serratia marcescens*.





Dfp <i>Aquifex aeolicus</i>	388	64	42
Dfp <i>Thermotoga maritima</i>	394	59	41
Dfp <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	444	57	39

A continuació, es va identificar una ORF que codificava per a una proteïna amb alts nivells de similitud amb la proteïna Dut (dUTPasa) d'*E. coli*. El gen *dut* d'*E. coli* (Taula 2.12) que codifica per a una proteïna (dUTPasa) responsable de la regulació cel.lular dels nivells de dUTP. Es tracta d'una deoxiuridin trifosfatasa que, junt amb l'acció de la dCTP deaminasa, genera dUMP. A part d'aquesta funció, sembla que aquesta proteïna podria dur a terme una funció essencial.

**Taula 2.12** Proteïnes similars a la proteïna Dut de *S. marcescens*.

PROTEÏNA	Nº AA	% SIMILITUD	% IDENTITAT
Dut <i>S. marcescens</i>	152		
Dut <i>E. coli</i> K-12	151	96	86
Dut <i>Haemophilus influenzae</i>	151	88	78
Dut <i>Coxiella burnetii</i>	152	82	63
Dut <i>Aquifex aeolicus</i>	150	63	46
Dut <i>Chlamydia pneumoniae</i>	145	64	48
Dut <i>Clorobium tepium</i>	152	61	44
Dut <i>Streptomyces coelicolor</i>	183	59	43

Dut <i>Chlamydia</i> <i>trachomatis</i>	145	61	41
---	-----	----	----

Finalment, la última ORF que es va identificar va codificar per a una proteïna amb nivells elevats de similitud amb la proteïna Ttk d'*E. coli*. El gen *ttk* també s'ha identificat en *Haemophilus influenzae* i no en *Salmonella enterica* (Taula 2.13). En cap cas no es coneix la funció del gen *ttk*. Es creu que es podria tractar d'un regulador transcripcional.

Aquestes tres ORF podrien estar formant un operó, a l'igual que en *E. coli*.

**Taula 2.13** Proteïnes similars a la proteïna Ttk de *S. marcescens*.

PROTEÏNA	Nº AA	% SIMILITUD	% IDENTITAT
Ttk <i>S. marcescens</i>	198		
Ttk <i>E. coli</i> K-12	198	95	85
Ttk <i>H. influenzae</i>	218	73	52

## 2.6 Obtenció del clon (*cosR11*) que es superposa al *cosFGR2*.

La seqüència descrita en l'apartat anterior conté tota la informació de l'insert del *cosFGR2* fins al punt de clonatge al vector (*Sau3A/BamHI*). Això indica que, tenint en compte la complexitat del nucli del LPS, altres gens implicats en la seva biosíntesi es troben en regions 5' de la seqüència del gen *waaB*. Per tal d'identificar clons que continguessin informació addicional a la del *cosFGR2*, es va partir de nou de la genoteca d'ADN cromosòmic de la soca *Serratia marcescens* N28b, utilitzant com a vector el còsmid recombinant supercos 1 (Stratagene) i introduïda en *E. coli* NM554 (Guasch, Tesi Doctoral, 1994). Es van seleccionar en primer lloc, aquells còsmids, que com el *cosFGR2*, presentaven un alt nivell de resistència a la bacteriocina i alteracions en la mobilitat en gels de nucli. Amb aquests clons, es va procedir a extreure ADN i a realitzar reaccions d'amplificació d'una regió situada en el gen *waaB*.

### 2.6.1 Reacció de PCR amb cebadors dissenyats utilitzant el cosFGR2 com a motllo.

Els cebadors que es van utilitzar es van dissenyar a partir de la seqüència del cosFGR2 com a motllo. Es va amplificar un fragment de 1053 pb pertanyent a la regió del gen *waaB*. La seqüència dels cebadors utilitzats (VAG1 i VAG2) s'indica en la Taula 2.14.

**Taula 2.14** Seqüència dels cebadors utilitzats en la reacció de PCR utilitzant diversos còsmids com a motllo.

CEBADOR	SEQÜÈNCIA	POSICIÓ EN EL cosFGR2
VAG1	5'-ACTGGATTAGCTATGCGTAT-3'	496
VAG2	5'-TTGCTGTTGATTTATCTGCG-3'	1548 <sub>c</sub>

c: cadena complementària

La reacció de PCR es va dur a terme utilitzant alguns dels còsmids recombinants i usant el còsmid cosFGR2 com a control positiu i el supercos1 com a control negatiu. La reacció de PCR es va realitzar utilitzant parafina per separar dues fases i per evitar l'evaporació una vegada iniciada la reacció. Les condicions que es van utilitzar van ser les indicades en la Taula 2.15 i els cicles que es van utilitzar es mostren en la Taula 2.16.

**Taula 2.15** Condicions utilitzades en la reacció de PCR per detectar regions homòlogues en còsmids procedents de la genoteca de *S. marcescens* N28b en la soca d'*E. coli* NM554.

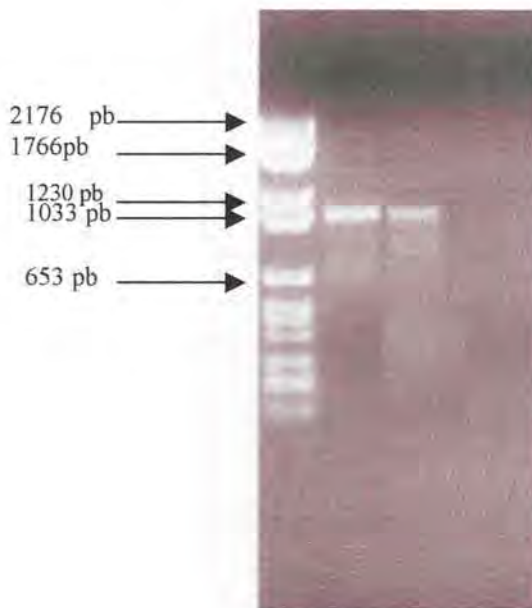
FASE SUPERIOR	Tampó de PCR	2,5 µl
	VAG1 (30 ng/µl)	1 µl
	VAG2 (30 ng/µl)	1 µl
	Taq polimerasa	0,25 µl (1,25 u)
	Aigua bidestil.lada	20,2 µl
PARAFINA		
FASE INFERIOR	Tampó de PCR	2,5 µl
	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µl
	dNTP's (2,5 mM)	5 µl
	ADN	3,8 µl (eq. a 0,4 µg)
	Aigua bidestil.lada	12,1 µl

**Taula 2.16** Cicles utilitzats en la reacció de PCR

	DESNATURALITZACIÓ	HIBRIDACIÓ	POLIMERITZACIÓ
1 cicle	95 °C, 4 min	56 °C, 4 min	60 °C, 1,5 min
30 cicles	95 °C, 1 min	56 °C, 1,5 min	60° C, 1,5 min

Dels còsmids assajats, vam trobar que el còsmid cosR11 amplificava la banda de 1053 Kb. Per tant, vam decidir continuar els nostres estudis de seqüenciació amb aquest còsmid (Figura 2.6).

**Figura 2.6** Gel d'agarosa al 1%. Marcador IV (Carril 1), cosFGR2 (Carril 2), cosR11 (Carril 3), supercos1 (Carril 4).



Amb aquest còsmid es va dur a terme una altra reacció de PCR per tal d'esbrinar si, a més de contenir la regió amplificada anteriorment, també contenia la regió corresponent a l'operó *waaAEkdtB*. Per dur a terme aquest experiment, es van utilitzar els cebadors F431 i S131 que amplifiquen una regió de 1940 pb situada entre els gens *waaQ* i *waaA*. Aquesta reacció es va dur a una temperatura d'hibridació de 58°C i un temps d'hibridació de 2,5 minuts. Aquesta reacció va donar positiva utilitzant el cosR11 com a ADN motllo.

### 2.6.2 Subclonatge del còsmid *cosR11*: obtenció del plàsmid *subR11*.

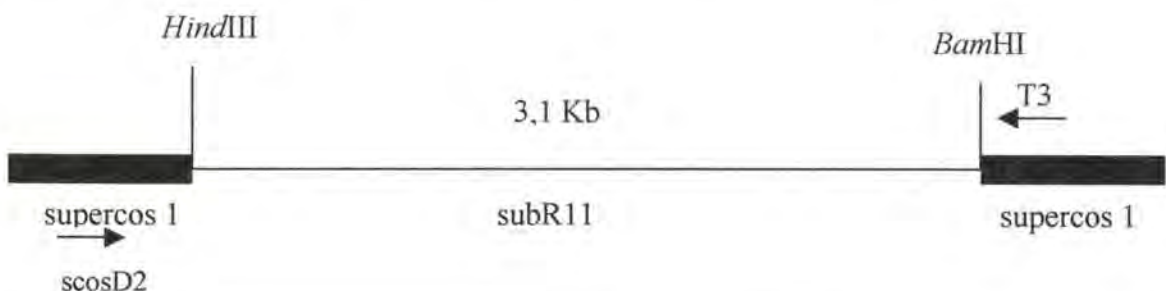
Donat que el *cosR11* contenia la continuació de la regió *waa*, es va provar en primer lloc de seqüenciar directament a partir del còsmid. Per això, es va dissenyar un cebador situat en la regió del gen *waaG* i utilitzant com a seqüència motllo la complementària del *cosFGR2*. El cebador Fun12 (5'-TAAGTGAAATACCCGCACGT-3') es va utilitzar per seqüenciar la continuació del gen *waaG*. Les seqüències obtingudes d'aquesta reacció no van ser suficientment bones, per la qual cosa es va decidir subclonar el còsmid i continuar la seqüenciació a partir del suclon.

En primer lloc, es va digerir el *cosR11* amb diversos enzims. La digestió amb *HindIII* va donar tres bandes: una de més de 20 kb, una d'unes 8 kb i la tercera d'unes 4 kb. A partir d'aquesta digestió, es va seleccionar el fragment que contenia el vector, supercos I. Per fer-ho, es va relligar la digestió i transformar en la soca NM554 amb selecció amb els antibiòtics Km i Amp. L'anàlisi dels diferents clons obtinguts per extracció d'ADN va permetre comprovar que el fragment relligat era el de 8 Kb. A aquest nou plàsmid se'l va anomenar *subR11*. A continuació es va procedir a seqüenciar a partir dels dos extrems del vector supercos mitjançant cebadors situats en els dos extrems.

### 2.6.3 Estratègies de seqüenciació.

Una vegada extret el plàsmid *subR11* a gran escala, es va procedir a seqüenciar els dos costats de l'insert utilitzant cebadors del supercos I. Per una banda es va utilitzar el cebador T3 (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3') i el cebador *scosD2* (5'-GTGTTCCGCTTCCTTTAG-3'), cebador interior del supercos, anterior a la diana *HindIII*. Aquests dos cebadors van permetre caracteritzar les regions de cada costat de la inserció del *subR11*.

**Figura 2.7** Representació esquemàtica de la regió d'ADN pertanyent al plàsmid *subR11*.



L'anàlisi de les seqüències a partir del cebador T3 van indicar que la regió *waa* no estava completa en el còsmid cosR11, ja que aquesta seqüència donava homologia amb el gen *waaF* d'*E. coli*. L'ORF corresponent a aquest gen estava incomplet en el cosR11. Per altra banda, la seqüenciació amb el cebador scosD2 va permetre constatar que per aquest costat es trobaven presents altres gens *waa*.

La seqüenciació completa de l'insert pertanyent al plàsmid cosR11 es va dur a terme a partir de l'extrem T3, mitjançant el disseny seqüencial de nous cebadors a mida que obteníem seqüències noves. En total, es van seqüenciar 3150 pb corresponents a l'insert del subR11. Es va realitzar la seqüenciació de les dues cadenes. Els cebadors utilitzats s'indiquen en la Taula 2.17.

**Taula 2.17:** Cebadors utilitzats per a la seqüenciació de l'insert del plàsmid subR11.

CEBADOR	SEQÜÈNCIA
SR11T3	5'-CTACGGCAGCCCAAATG-3'
SB7	5'-AACGCCGTGGTGGAGTAGAT-3'
SB8	5'-TTGTACTGGATGCTCATCG-3'
SB9	5'-GCGAACTCGACGTAAGCC-3'
SB10	5'-CATCCGTACAGCGTATTCT-3'
SB11	5'-GGATTGGCAGACCTGTGA-3'
RR11	5'-TGCACTCTCATCTGCCTT-3'
RR10	5'-ACGCCTTCCAGACCAAAA-3'
RR9	5'-TGGCTACTGTTGCTCGGTT-3'

La reacció de seqüenciació amb el cebador SB11 va permetre finalitzar la seqüenciació de l'insert, ja que es va trobar ja seqüència pertanyent al vector.

La finalització de la seqüenciació de la regió *waa* es va realitzar utilitzant dues reaccions de seqüenciació addicionals utilitzant del plàsmid original, cosR11, com ADN motllo. Aquestes dues reaccions van permetre seqüenciar un total de 879 pb que van enllaçar ja amb la seqüència del cosFGR2. Per tant, una vegada identificada la regió de l'enllaç ja no es va continuar seqüenciant més enllà del gen *waaG*. Els cebadors utilitzats per a la seqüenciació del cosR11 es mostren a la taula 10.3.3. La seqüència obtinguda i la posició dels cebadors es mostra en l'Annex II.



**Taula 10.3.3.** Cebadors utilitzats per a la seqüenciació de la regió *waaG* en el còsmid cosR11.

CEBADOR	SEQÜÈNCIA
SB11	5'-GGATTGGCAGACCTGTGA-3'
SB13	5'-CCCTTCCAAGCTGACTTT-3'
SB14	5'-AAACTCCGCCGCATCATT-3'
SB15	5'-ATCTGAACGTCATCACT-3'

#### 2.6.4 Anàlisi de les seqüències.

La seqüenciació d'aquesta regió va permetre identificar dos marcs de lectura oberta i l'inici d'una tercera ORF que estava incompleta. Aquesta ORF codificava per a una proteïna incompleta que presentava un 51% de similitud i un 29% d'identitat amb la proteïna WaaF de *Salmonella* i un 50% de similitud i un 29% d'identitat amb la proteïna WaaF d'*E. coli*. Les altres dues ORF es van poder caracteritzar per complet (Taula 2.18)

**Taula 2.18** Conjunt d'ORFs seqüenciades a partir del plàsmid cosR11.

ORF	POSICIÓ	%G+C	PROTEÏNA CODIFICADA		pI <sup>a</sup>	GRAVY <sup>b</sup>
			AA	kDa <sup>a</sup>		
$\Delta waaF$	1-961	58,00				
Espai intergènic	962-2136	57,35				
<i>waaQ-II</i>	2137-3219	60,46	360	40,17	7,22	-0,037
<i>waaG</i>	3216-4341	60,03	375	42,33	9,47	-0,201

a: Punt isoelèctric i pes molecular de la proteïna, calculat usant el programa ProtParam d'Expasy.

b: Promig d'hidrofobicitat de la proteïna, utilitzant el mètode descrit per Kyte i Doolittle (Kyte i Doolittle, 1982).

##### 2.6.4.1 Espai intergènic entre $\Delta waaF$ i el gen *waaQ*.

En aquesta regió no es va poder caracteritzar cap ORF relacionada amb gens *waa*. Es suggereix que aquesta regió, de 1211 pb podria contenir el gen que codifica per a la lligasa (*waaL*). S'ha vist que les diferents lligases caracteritzades en altres espècies presenten nivells molt baixos de similitud entre elles.

### 2.6.4.2 Característiques del gen *waaQ-II*

La primera ORF que es va identificar era de 1083 pb i codificava per a una proteïna de 360 aminoàcids i un pes molecular calculat de 40,17 kDa. La proteïna deduïda va donar un cert nivell de similitud i identitat amb la proteïna *waaQ* de *Klebsiella*, *E. coli* i *Salmonella* (Taula 2.19) i també amb la proteïna de *Serratia marcescens* WaaQ, caracteritzada en aquest treball (45% de similitud, 26% d'identitat) (Figura 2.8). El fet que en *Serratia marcescens* ja s'hagués identificat una altra ORF que donava homologia amb el gen *waaQ* d'*E. coli* i *Salmonella*, fa pensar que el nucli de *Serratia* podria contenir un altre residu de L,D-Hep en el nucli. Aquesta hipòtesi està avalada pels resultats de l'anàlisi química que es va dur a terme (Apartat 12). Així mateix, aquesta proteïna també presenta un cert nivell de similitud i identitat amb les altres heptosil-transferases que transfereixen residus de L,D-Hep al nucli intern (WaaC i WaaF).

**Taula 2.19** Proteïnes similars a la proteïna WaaQII de *S. marcescens*.

PROTEÏNA	Nº D'AA	% SIMILITUD	% IDENTITAT
WaaQ II <i>S. marcescens</i>	360		
WaaQ <i>K. pneumoniae</i>	358	78	64
WaaQ <i>E. coli</i> R4	340	63	46
WaaQ <i>E. coli</i> R3	340	63	46
WaaQ <i>E. coli</i> R1	340	63	46
WaaQ <i>S. enterica</i>	344	63	45
WaaQ <i>E. coli</i> R2	344	61	42
WaaQ <i>E. coli</i> K-12	344	61	42
WaaQ <i>S. marcescens</i>	337	45	26

HI026 <i>Haemophilus influenzae</i>	347	46	23
WaaC <i>Aquifex aeolicus</i>	317	48	26
WaaF <i>K. pneumoniae</i>	352	43	32
WaaF <i>E. coli</i> K-12	348	43	27

**Figura 2.8** Alineament realitzat entre la proteïna WaaQ i WaaQII de *S. marcescens*.

```

WaaQ      -----MKNILIIIRRDNIGDLVCTTPLIEGVKIAVYPAKVVLLINKVSQDVVK 47
WaaQII    MMNDAPALTSAPSVQRILIIKLRHGGDMLLVTPVISSLRQNYPQARIDVLLYQETQEMLA 60
           ::.****:  : **:: .**:*...: **::: :*: : :*:::

WaaQ      NNPHLEKVFVYKAKHKAKNETTLG--VYFERLMIFLKLRKIKFDAVILANPVPCKYSLR 105
WaaQII    SNPELSTLFAIDRQWKKQGARAHLGHELALLRRLKAQRYDLVVNLADQWRSIIITRLTGA 120
           .**.*...*. .: :*  .: **  : : *  : : : *  ..: : :

WaaQ      LAKMAGATHIIGADLGTKDIQRPFKDDFRGLHQVEHTYSYLSAITDQAIPIPPVRVFLT 165
WaaQII    RIRLGFDFPKRRGFLWRHCHTQLVPVDNHAHLHIVEQNLSLLAPLNLPAL-NEHVIMSYD 179
           ::.      . *  : : . *. . ** **:. * *:.. * : * :

WaaQ      PEERQLAAQRLQERLPSVERVCAVHISSRSPKRRWPFVERYAEIINRLTADPRTGVLI FWS 225
WaaQII    PQDWQICEQLLQKQG-VAGSYIVVQPTSRWFFKCWSEEKMAATLTALQADGHQLVITSGP 238
           *:: * . * **:: . . .*: :**  : * . * : * . : * ** : * : .

WaaQ      PQGTLAPDDIGDQRAEQLLALCQNERVALYP-TASVRELLGGFDLCDRVLCSDGGQMH 284
WaaQII    -----DAR-EKAMVERILALCPPQGVISLAGQLTLRQLAALIDHAKLFIGVDSVPMHM 290
           *  :: .*: :****  : * .  :*: * . :* .. : : * . ** :

WaaQ      AAALNKDMVVFFGDTDKTSWHPWTGRHHILQS-----ESGHCEDVSVDEVWQMQALS- 337
WaaQII    AAALQIPCVALFGPSKLTFRWPQATGAVIWAGDFGELPDPDAIDTGTDERYLDLIPTDA 350
           ****:.  *.:** :. * ** . . : : : . . *...** : . : .

WaaQ      -----
WaaQII    VIAAARSTLA 360
    
```

\*=aminoàcids idèntics.

:=aminoàcids molt similars quant a propietats físico-químiques

. =aminoàcids similars quant a propietats físico-químiques

### 2.6.4.3 Característiques del gen *waaG*

L'anàlisi de la seqüència va determinar l'existència d'una segona ORF de 1125pb que codificava aparentment per a una proteïna de 375 aminoàcids, amb una massa molecular calculada de 42,33 kDa. Se'l va designar inicialment com a *waaG*. La proteïna codificada per aquest gen va presentar uns nivells elevats de similitud (82.1%) i identitat (70,7%) amb l'ORF4 de *Klebsiella pneumoniae* (Núria Climent, Tesi doctoral). Sorprenentment, els nivells de similitud i identitat amb les proteïnes *waaG* d' *E. coli* R2, K-12, R4 i R3 i *Salmonella* eren força més baixos (Taula 2.20) Paral·lelament, es va observar que les proteïnes deduïdes a partir del gen *waaB* (caracteritzat a partir del plàsmid subFGR2) i la proteïna *waaG* presentaven també nivells de similitud i identitat (42% i 26%) (Figura 2.9).

**Taula 2.20** Proteïnes similars a la proteïna WaaG de *S. marcescens*.

PROTEÏNA	Nº D'AA	% SIMILITUD	% IDENTITAT
WaaG <i>S. marcescens</i>	375		
WaaG <i>K. pneumoniae</i>	375	82,1	70,7
WaaG <i>S. enterica</i>	373	45	27
WaaG <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	373	45	27
WaaG <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAK	373	44	25
WaaG <i>E. coli</i> R2	374	46	28
WaaG <i>E. coli</i> K-12	374	44	27
WaaG <i>E. coli</i> R4	374	46	27
WaaG <i>E. coli</i> R3	374	43	26
WaaG <i>E. coli</i> R1	374	46	28

**Figura 2.9** Alineament realitzat amb la proteïna WaaG de *S. marcescens* i la proteïna WaaB de *S. marcescens*.

```

waaG      MKAFLLAIVRRKYRPDGGAEFVSRALKALEQQDLDLNVITREWQGDANPNWHIHLGNPL 60
waaB      --MRILMIIDG--LPGGAEKVVLLCQGMQQQGHVSLIS----LRDVCNYPPIPSGIDY 52
           :* *:      *,****:,*      :.:**,*.:*:      *:*

waaG      KLGR-ISRERGFAVAARALWQKERFDLVQSHERIPGCDIYRAGDGVHRRWLLQARLLPE 119
waaB      QVVADRSRAPWRKLTLSRRAAALDRAIAEHERQHGFALVFSNLHKIDRIVSRKRLAS 112
           ::  **      :: :      : ,*** * .      .: :      :.:*::*..

waaG      WRRKWLFSNRVHRYVMCAERAMYAAPELKAVICNAEMIKREIIADFGVPADKITVIYN-- 177
waaB      DR-LWFCIHGILSTSYLGHRKGLDRWLKQRKIANVYQGRNIVAVSQAVGGDLQQNLP I RP 171
           * *: :      ..*      : *,* .      .: : ..* . *      :

waaG      ---AIDNQKFPPEAQAQRRLREQQYQIP-QQAHCLIFVGSQFERKGLAAAIRAVAATDSH 233
waaB      RRLAVINPFIDIDAIRQQAAPCELAGQDYLVHVGFRFHATKRHDRLKAYVQSGIQAPLA 231
           *: *: *      *:      :      .* * .: . : * * : : :

waaG      LLVVGKDKAEKRYRALAQLGCGDRIFMGVQKQTLFPYQAADALLPTLYDPPFNVILE 293
waaB      LIGTGDDARVAEVKRLAADLGLAERVLFLGFQANPYPIRHASLLVLSSEDFGNVLE 291
           *: .*,*      . : ** .** .: *: * . * .: . * * : * . * : * : * * : *

waaG      AMSCGLPVITSTTCGGAEFITPGQNGFVTDALDVPAITEAIRALPRQALGSSMGEAARLR 353
waaB      SLLCGTPVVSTRCPGPAEILEKAG---MANALAEALNAASLAERMAEIIYANPPQINQQQ 347
           :: ** *:::      ** . *      .      * :. :. * *      : :. : : :

waaG      IMTATPAHLSEQLISLYNRLLD 375
waaB      LLSYGLEPICRQYIELKEK--- 366
           : : :      :..* * . * : :
    
```

\*=aminoàcids idèntics.

: =aminoàcids molt similars quant a propietats físico-químiques

. =aminoàcids similars quant a propietats físico-químiques

A partir dels nivells de similitud i identitat d'aquesta proteïna amb proteïnes anàlogues de *Klebsiella*, *Salmonella* i *E. coli*, es pot suggerir que aquesta proteïna no deu realitzar la mateixa funció que duu a terme en *Salmonella* o en *E. coli* (glucosil transferasa que transfereix un residu de Glc a l'HepII). Tal i com, es prediu en el cas de *Klebsiella pneumoniae* (Climent, N., Tesi Doctoral, 2000), es podria tractar d'una transferasa d'àcid galacturònic, ja que en el cas de *Klebsiella pneumoniae* existeix un residu de GalA en lloc d'una Glc unida a l'Hep II. El fet que en el nucli de *Serratia marcescens*, també s'hagin trobat residus de GalA reforça aquesta hipòtesi (Apartat 6 de Resultats). El gen *waaG* és capaç de complementar un mutant R de *Serratia marcescens* 2170 (serotip O:8) (Apartat 3 de Resultats).

### **3 EL GEN *waaG* COMPLEMENTA UN MUTANT R de *S. marcescens* 2170**

Al llarg d'aquest treball, es va obtenir un mutant amb un nucli més curt de *S. marcescens* 2170 (serotip O<sub>8</sub>) mitjançant resistència a bacteriòfags.

Com s'ha descrit en l'apartat de la introducció (Apartat 3.3 i 3.4), molts bacteriòfags utilitzen l'antigen O i el nucli del LPS com a receptors. Per tant, molts mecanismes de resistència vénen donats per l'alteració en la biosíntesi de l'antigen O i del nucli del LPS. L'obtenció de mutants defectuosos en antigen O i amb estructures de nucli més curtes que la soca salvatge ha permès en *E. coli* (Hancock, 1976) i *Salmonella* definir una sèrie de quimiotips basant-se en la seva estructura química. Així mateix, s'ha intentat utilitzar mutants R d'algunes espècies com a possibles vacunes (Stanislavsky, 1997).

En el nostre cas, l'interès per generar mutants R tenia com a objectiu la generació de mutacions en els gens implicats en la biosíntesi del nucli del LPS que ens permetessin estudiar la funció dels diferents gens. El primer pas va consistir en aïllar bacteriòfags específics sobre diferents soques de *S. marcescens*.

#### **3.1 Aïllament de bacteriòfags específics sobre *Serratia marcescens* N28b i 2170 O<sup>-</sup>**

Per a l'aïllament de bacteriòfags es va utilitzar la soca *Serratia marcescens* N28b, soca de la qual havíem caracteritzat els gens *waa*. També es va utilitzar la soca *Serratia marcescens* 2170 (serotip O<sub>8</sub>), ja que disposàvem d'un mutant deficient en antigen O però amb el nucli complet (Palomar, 1996). L'absència d'antigen O hauria de facilitar la recerca de mutants R. La utilització d'un serotip diferent a l'utilitzat per seqüenciar els gens *waa* venia avalat pels resultats de variabilitat generats en el nostre laboratori (Abitiu, Tesi doctoral en preparació) en què la regió *waa* seqüenciada fins al moment estava conservada en tots els serotips de *Serratia marcescens*.

Els bacteriòfags es va obtenir a partir de mostres d'aigües del riu Besós i Llobregat proporcionades pels estudiants de pràctiques de l'assignatura de Microbiologia general. Es van obtenir 10 fags per a la soca N28b i 8 fags per a la soca 2170 O<sup>-</sup> (Taula 3.1)

**Taula 3.1:** Bacteriòfags obtinguts a partir de les soques *Serratia marcescens* N28b i *Serratia marcescens* 2170 O<sup>-</sup>.

BACTERIÒFAGS OBTINGUTS AMB LA SOCA N28b	TITULACIÓ	BACTERIÒFAGS OBTINGUTS AMB LA SOCA 2170 O <sup>-</sup>	TITULACIÓ
23.3	7,2. 10 <sup>8</sup>	4.2	1,9. 10 <sup>11</sup>
1.2	7,05. 10 <sup>8</sup>	1.3.1	6,3. 10 <sup>9</sup>
1.1.1	2,4. 10 <sup>9</sup>	1.2.1	4,5. 10 <sup>10</sup>
21.1.1	5,3. 10 <sup>8</sup>	1.1	3,7. 10 <sup>9</sup>
23.2	9,4. 10 <sup>8</sup>	4.1	1,6. 10 <sup>10</sup>
21.1.3	6. 10 <sup>6</sup>	1.3.2	1,1. 10 <sup>10</sup>
4.0	1,0. 10 <sup>11</sup>	13.2.1	2,3. 10 <sup>10</sup>
26.2	2,0. 10 <sup>10</sup>	13.2.2	2,0. 10 <sup>8</sup>
15.13	4,3. 10 <sup>10</sup>		
15.12	9,3. 10 <sup>3</sup>		

L'aspecte de les calbes de lisi va diferir segons la soca. En el cas de la soca N28b les calbes produïdes pels bacteriòfags van donar un aspecte tèrbol indicant que el bacteriòfag duia un procés lisogènic. En canvi, els bacteriòfags que infectaven la soca 2170 O<sup>-</sup> van produir calbes molt clares indicant que els bacteriòfags produïen un forta activitat lítica.

### 3.2 *Obtenció de mutants resistents als bacteriòfags.*

L'obtenció de mutants es va dur a terme seleccionant les colònies que van créixer a les zones de lisi. Aquestes colònies es van aïllar i es va comprovar la resistència al bacteriòfag a través d'un creixement confluent de la soca resistent i l'addició d'una gota del bacteriòfag a la superfície de la placa.

En el cas de la soca 2170 O<sup>-</sup> es van obtenir 8 soques resistents (2 resistents al bacteriòfag 1.1, 3 resistents al bacteriòfag 1.3.1 i 3 resistents al bacteriòfag 4.2).

En la soca N28b, es van obtenir 14 soques resistents (2 resistents al bacteriòfag 1.1.1, 5 resistents al bacteriòfag 1.2, 2 resistents al bacteriòfag 21.1.1, 1 resistent al bacteriòfag 23.2 i 4 resistents al bacteriòfag 23.3).



Els diferents mutants i les soques 2170, 2170 O<sup>-</sup> es van assajar en front a tots els mutants de què disposàvem. Com es pot comprovar en la taula 12.2.1, els mutants obtinguts presentaven nivells de resistència elevats a gairebé tots els bacteriòfags.

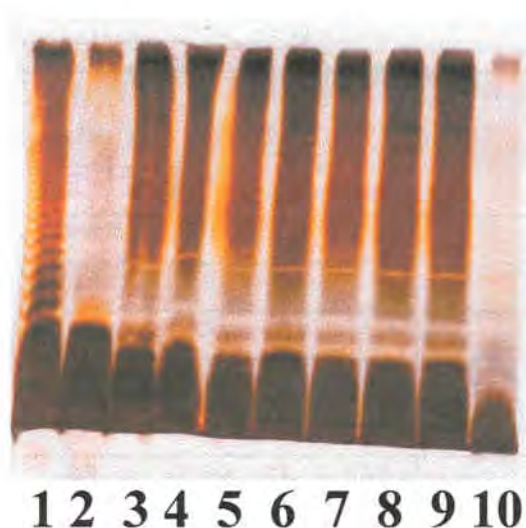
**Taula 3.2** Sensibilitat de diverses soques als bacteriòfags aïllats. RR=Alt nivell de resistència, R=Resistència intermitja, S=Sensibilitat.

SOCA/ FAG	2170	2170 O <sup>-</sup>	2170 O <sup>-</sup> 1.1 M <sub>5</sub>	2170 O <sup>-</sup> 4.2 M <sub>3</sub>	N28b	N28b 1.2 M <sub>4</sub>	N28b 1.2 M <sub>5</sub>
1.1	S	R	RR	RR	S	RR	RR
4.2	S	S	RR	RR	S	RR	RR
13.2.2	S	S	RR	RR	S	RR	RR
1.2.1	S	S	RR	RR	S	RR	RR
4.1	S	S	RR	RR	S	RR	RR
1.3.2	S	R	RR	RR	S	RR	RR
1.3.1	S	S	RR	RR	S	RR	RR
13.2.1	S	S	RR	RR	S	RR	RR
23.3	R	S	RR	RR	S	RR	RR
21.1.3	RR	R	RR	RR	S	RR	S
1.1.1	R	S	RR	RR	S	RR	RR
1.2	R	S	RR	RR	S	RR	RR
21.1.1	RR	R	RR	RR	S	R	S
23.2	RR	R	RR	RR	S	RR	RR
15.12	RR	S	RR	RR	S	RR	RR
26.2	RR	S	RR	RR	S	RR	RR
4.0	R	S	RR	RR	S	RR	RR
15.13	R	S	RR	RR	S	RR	RR

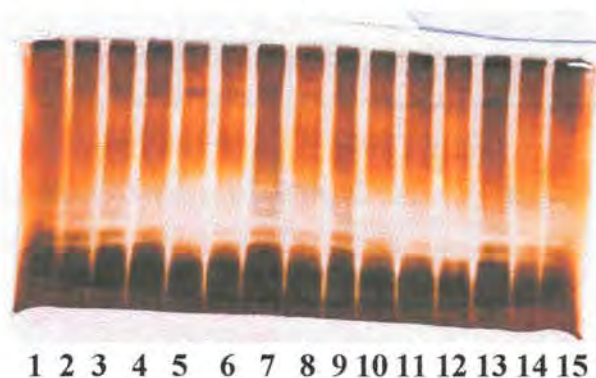
### 3.3 *Obtenció del mutant R de Serratia marcescens 2170 4.2 M<sub>3</sub>.*

El LPS de tots el mutants obtinguts es va analitzar a través de gels de LPS. Tal com es pot observar en les figures 3.1 i 3.2, es va obtenir un mutant deficient amb antigen O i amb un nucli més curt de la soca 2170 O<sup>-</sup>. Es tracta del mutant 2170 O<sup>-</sup> 4.2 M<sub>3</sub>. Per tal de comprovar que el nucli era diferent respecte la soca parental 2170 O<sup>-</sup>, es va analitzar el LPS de les dues soques per gels de nucli.

**Figura 3.1** Anàlisi del LPS de soques de *Serratia marcescens* 2170 resistents a diversos bacteriòfags. *S. marcescens* 2170 (Carril 1), *S. marcescens* 2170 O(Carril 2), *S. marcescens* 2170 1.1 M<sub>3</sub>(Carril 3), *S. marcescens* 2170 1.1 M<sub>4</sub>(Carril 4), *S. marcescens* 2170 1.3.1 M<sub>8</sub>(Carril 5), *S. marcescens* 2170 1.3.1 M<sub>7</sub>(Carril 6), *S. marcescens* 2170 1.3.1 M<sub>3</sub>(Carril 7), *S. marcescens* 2170 4.2 M<sub>2</sub>(Carril 8), *S. marcescens* 2170 4.2 M<sub>1</sub>(Carril 9), *S. marcescens* 2170 4.2 M<sub>3</sub>(Carril 10).



**Figura 3.2** Soques de la soca de *Serratia marcescens* N28b resistents a diversos bacteriòfags. *S. marcescens* N28b (Carril 1), *S. marcescens* N28b 1.1 M<sub>2</sub> (Carril 2), *S. marcescens* N28b 1.2 M<sub>4</sub> (Carril 3), *S. marcescens* N28b 1.1 M<sub>7</sub>(Carril 4), *S. marcescens* N28b 1.2 M<sub>5</sub> (Carril 5), *S. marcescens* N28b 1.2 M<sub>6</sub> (Carril 6), *S. marcescens* N28b 1.2 M<sub>8</sub> (Carril 7), *S. marcescens* N28b 1.2 M<sub>7</sub> (Carril 8), *S. marcescens* N28b 21.1.1 M<sub>4</sub> (Carril 9), *S. marcescens* N28b 23.2 M<sub>8</sub> (Carril 10), *S. marcescens* N28b 21.1.1 M<sub>7</sub> (Carril 11), *S. marcescens* N28b 23.3 M<sub>2</sub> (Carril 12), *S. marcescens* N28b 23.3. M<sub>4</sub> (Carril 13), *S. marcescens* N28b 23.3 M<sub>5</sub> (Carril 14), *S. marcescens* N28b 23.3 M<sub>3</sub> (Carril 15).



### 3.4 Caracterització del mutant per complementació amb diferents plàsmids.

Per tal d'establir en quin gen s'havia produït la mutació del mutant 2170 4.2 M<sub>3</sub>, es va dur a terme un estudi de complementació amb diferents plàsmids generats al llarg d'aquest treball i d'altres generats en el nostre grup d'investigació.

En primer lloc, es va transformar el mutant per electroporació amb els següents plàsmids: cosR11, pNP9, pSKF41, pWSK1848, pGEMT-*waaQ* (Coderch, Tesi doctoral en preparació). A través de l'anàlisi del LPS de les soques transformades, es va determinar que només la soca 2170 4.2 M<sub>3</sub> que contenia el cosR11 complementava la mutació (Figura 3.3).

**Figura 3.3** Gel de LPS a partir del LPS de les soques *S. marcescens* 2170 4.2 M<sub>3</sub> pGEMT-*waaQ* (Carril 1 i 2), *S. marcescens* 2170 4.2 M<sub>3</sub> pSKF41 (Carril 3 i 4), *S. marcescens* 2170 4.2 M<sub>3</sub> cosR11 (Carrils 5 i 6), *S. marcescens* 2170 4.2 M<sub>3</sub> pNP9 (Carril 7 i 8), *S. marcescens* 2170 (Carril 9 i 10).



**1 2 3 4 5 6 7 8 9 10**

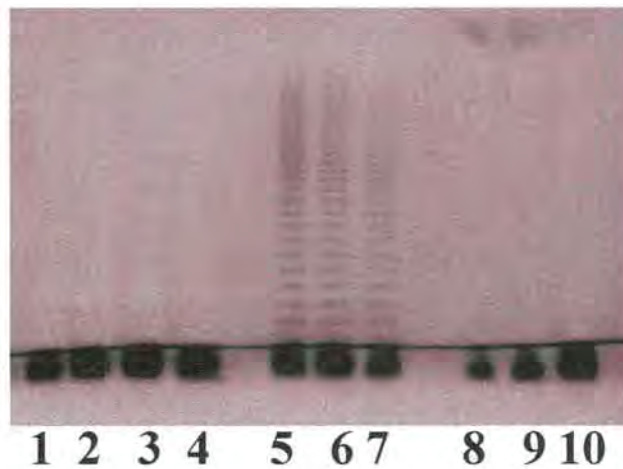
Donat que el plàsmid pNP9 no complementava la mutació i el còsmid cosR11 sí que la complementava, es va establir que els possibles gens que podrien complementar la mutació haurien de ser els presents en el plàsmid cosR11 (*waaG* i *waaQ*-II) i absents en el plàsmid pNP9 (que conté només una part del gen *waaG*).

Per tant, es va procedir a transformar els plàsmids pGEMT-*waaG* i pGEMT-*waaQ*-II (Coderch, Tesi doctoral en preparació) en el mutant. Igualment, els transformants que contenien els plàsmids es van analitzar a través de gels de LPS. Es va poder observar

que el mutant transformant amb el plàsmid pGEMT-*waaG* complementava la mutació i regenerava l'antigen O.

Això suggereix que el gen *waaG* podria estar mutat en el mutant R.

**Figura 3.4** Anàlisi dels LPS del mutant de *S. marcescens* 2170 4.2 M<sub>3</sub> transformat amb amb els plàsmids pGEMT-*waaQII* i pGEMT-*waaG*: *S. marcescens* 2170 4.2 M<sub>3</sub> pGEMT-*waaQII* (Carrils 1, 2, 3 i 4), *S. marcescens* 2170 4.2 M<sub>3</sub> pGEMT-*waaG* (Carrils 5, 6 i 7), *S. marcescens* 2170 4.2 M<sub>3</sub> (Carrils 8, 9 i 10).



La relació entre mutació en el gen *waaG* i resistència a determinats bacteriòfags encaixaria amb l'efecte pleiotròpic observat en mutants *waaG* d'altres espècies (Parker, 1992 ). L'efecte pleiotròpic d'aquests mutants inclou la pèrdua de flagell, pilis, fimbries i supressió de l'expressió de proteïnes de membrana externa.

## 4. IDENTIFICACIÓ DELS GENS *waa* DE *S. marcescens* RESPONSABLES DE LA MODIFICACIÓ DEL LPS EN *E. coli*

Identificada una part important dels gens implicats en la biosíntesi del nucli del LPS de *S. marcescens*, es va decidir determinar quins d'aquests gens eren els responsables de modificar el LPS d'*E. coli* per tal de conferir resistència a la bacteriocina 28b.

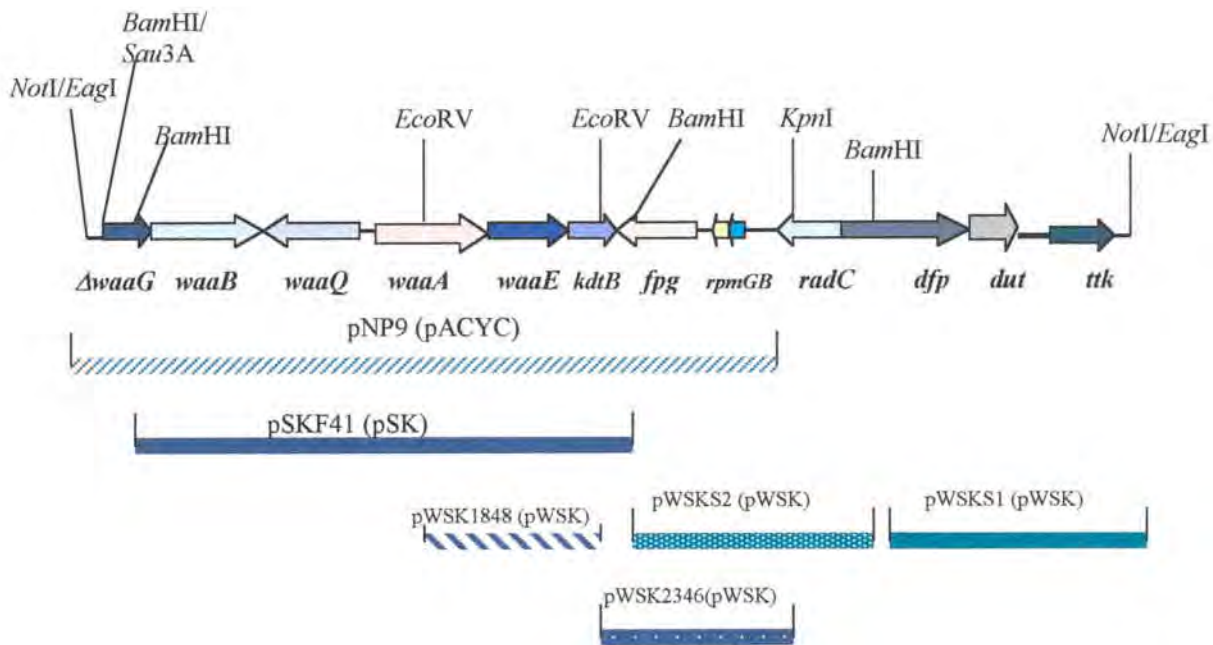
Esbrinar quins eren aquests gens i determinar com alteren el LPS d'*E. coli* ens hauria de donar una bona idea de quina podia ser la seva funció en la biosíntesi del nucli de *Serratia marcescens*.

Per abordar aquest estudi, es va procedir en primer lloc a la construcció d'un total de 6 subclons que, juntament amb el pSKF41, cobrien tota la regió estudiada per seqüenciació. Amb cadascun d'aquests subclons es va determinar si eren capaços de modificar el LPS d'*E. coli* analitzant els fenotips de resistència a la bacteriocina i la mobilitat electroforètica del LPS.

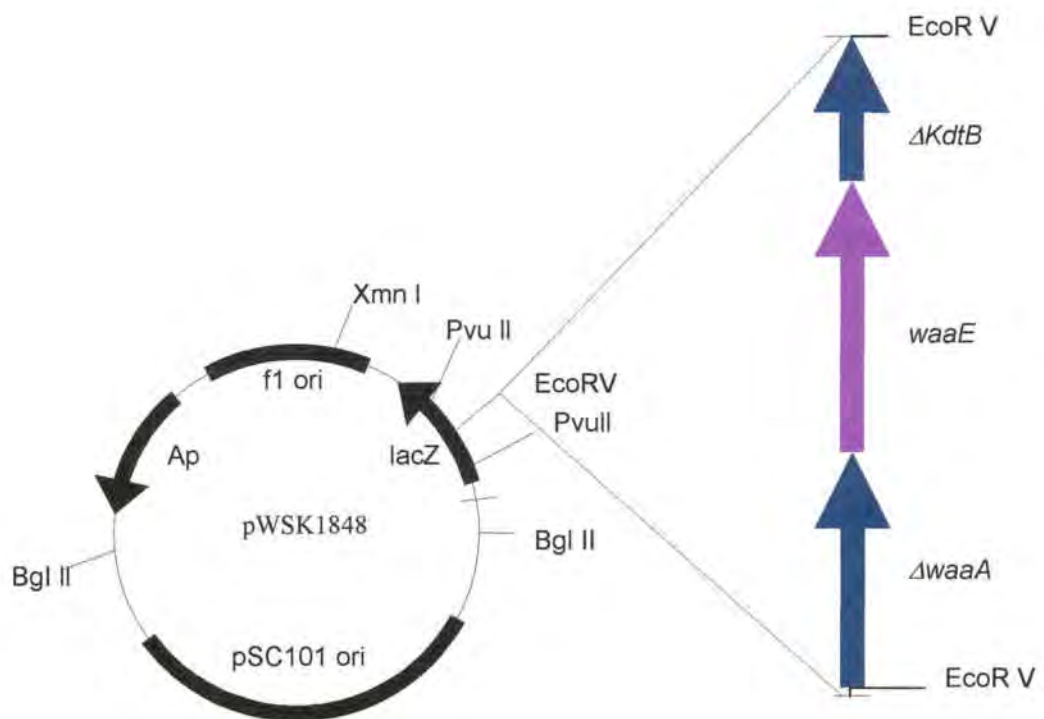
### 4.1 Construcció de subclons

Els subclons construïts a partir del plàsmid subFGR2 i els gens que contenen s'indiquen de forma esquemàtica en la Figura 4.1. El plàsmid pNP9 es va obtenir per digestió del plàsmid subFGR2 amb els enzims *SalI-KpnI* i relligació d'una banda de 11Kb que contenia un insert de 7,1 Kb. El subclonatge del gen *waaE* es va dur a terme per digestió d'una banda *EcoRV-EcoRV* de 1,8 Kb a partir del plàsmid pSKF41. Aquesta banda es va lligar al plàsmid pWSK29 (Figura 4.2). El subclonatge de gens distals va generar els plàsmids pWSKS1, pWSKS2 i pWSK2346 (Figura 4.1).

**Figura 4.1** Construcció de sucions a partir del plàsmid subFGR2.



**Figura 4.2** Esquema del plàsmid pWSK1848 que conté el gen *waaE*.



## 4.2 Fenotips conferits pels subclons a *E. coli*

Amb els diferents subclons es va analitzar la mobilitat del LPS en gels de poliacrilamida SDS-PAGE-Tricina i el nivell de resistència a la bacteriocina. Amb algunes de les soques que presentaven nivells de resistència superiors a la soca control es va dur a terme una extracció de LPS pel mètode de PCP i es va analitzar la composició en sucres neutres i Kdo.

### 4.2.1 Fenotip de resistència a la bacteriocina i de mobilitat en gels de poliacrilamida SDS-PAGE. Estudis de composició.

Tots els plàsmids generats van ser transformats a la soca d'*E. coli* NM554 i es van estudiar els fenotips de resistència a la bacteriocina i el patró de mobilitat del LPS en gels de poliacrilamida SDS-PAGE (Figura 4.5)

En línies generals, es va detectar que canvis aparents en la mobilitat del LPS en gels de poliacrilamida SDS-PAGE-Tricina coincidien amb un nivell elevat de resistència a la bacteriocina. Canvis poc aparents es van correlacionar amb un fenotip de resistència parcial a la bacteriocina. Finalment, en les soques que no es van detectar canvis de mobilitat del LPS tampoc es van detectar nivells de resistència a la bacteriocina. En la Figura 4.4 es mostra alguns perfils de resistència/sensibilitat a la bacteriocina 28b. Aquests experiments es van dur a terme com s'ha descrit en l'apartat de material i mètodes (5.2).

En aquells casos que tant els canvis de mobilitat com els nivells de resistència van ser considerables es va analitzar la composició en sucres del LPS (Taula 4.2). En aquesta taula no es mostra la composició del LPS de la soca NM554 pWSK1848 que transporta el gen *waaE* ja que aquest LPS es va analitzar més extensament posteriorment (apartat 5 de Resultats)

En la Figura 4.3 es descriuen els diferents fenotips observats per totes les soques recombinants que contenen gens involucrats en la biosíntesi del nucli del LPS. En línies generals es va detectar nivells de resistència elevats en les soques que transportaven els plàsmids cosR11, cosFGR2, subFGR2 i pNP9 i nivells de resistència parcial en les soques que transportaven els plàsmids pSKF41 i pWSK1848. Les soques que transportaven plàsmids amb gens distals van presentar un fenotip de sensibilitat a la bacteriocina. En les soques control es va observar un perfil compost per dues bandes. En les soques amb resistència elevada a la bacteriocina es va observar un perfil format

per només una banda. En els casos de resistència parcial a la bacteriocina, els canvis de mobilitat van ser poc aparents.

L'anàlisi de composició de sucres neutres i de Kdo no va aportar molta informació sobre els canvis que es poden produir en les alteracions de la mobilitat del LPS.

**Figura 4.3** Fenotips presentats per totes les soques recombinants d'*E. coli* NM554 que transporten plàsmids derivats dels còsmids originals cosFGR2 i cosR11.

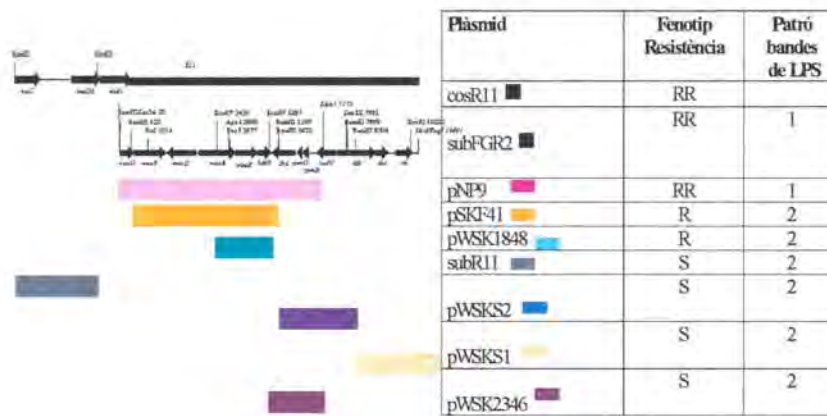
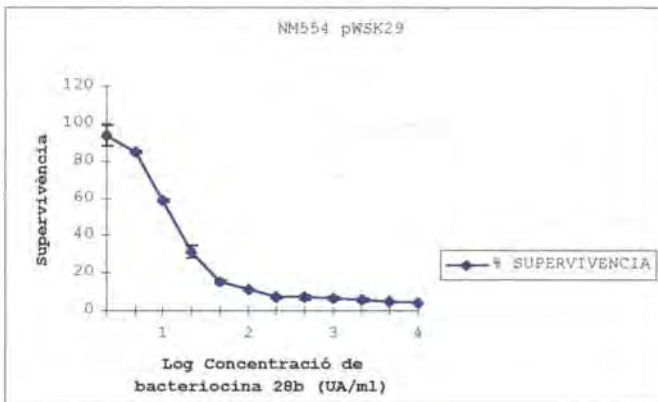
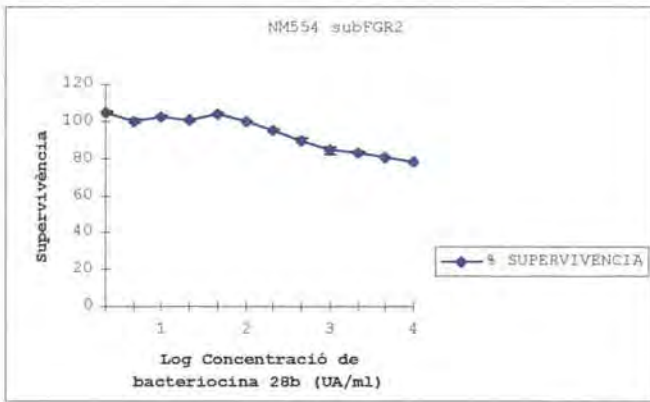
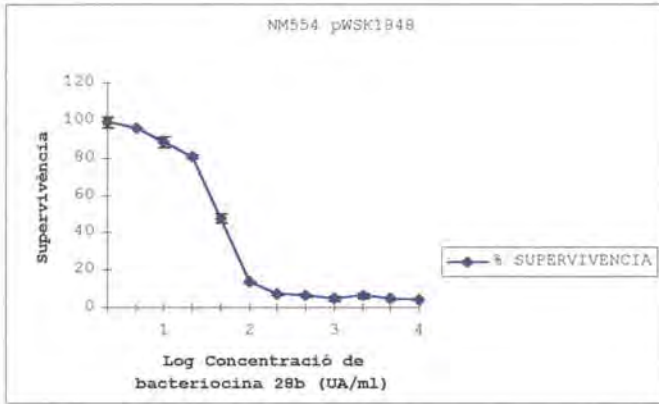
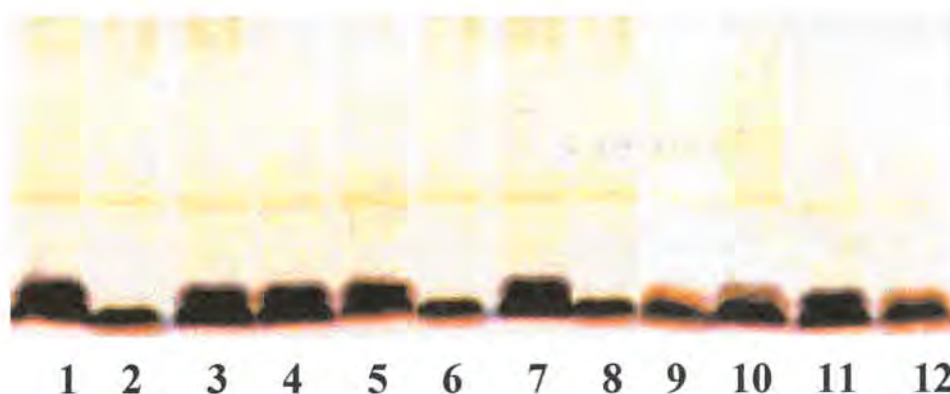




Figura 4.4 Assaigs de sensibilitat a la bactericina 28b de les soques NM554 subFGR2, NM554 pWSK i NM554 pWSK1848.



**Figura 4.5** Anàlisi del LPS mitjançant gels de SDS-Tricina-PAGE de les soques d'*E. coli* NM554 supercos (Carril 1), NM554 cosR11 (Carril 2), NM554 supercos (Carril 3), NM554 subR11 (Carril 4), NM554 supercos (Carril 5), NM554 cosFGR2 (Carril 6), NM554 pACYC (Carril 7), NM554 subFGR2 (Carril 8), NM554 pNP9 (Carril 9), NM554 pSKF41 (Carril 10), NM554 pWSK (Carril 11) i NM554 pWSK1848 (Carril 12).



Els resultats obtinguts suggereixen que el gen *waaE* per si sol confereix un nivell de resistència a la bacteriocina 28b significatiu. El fet que no s'aprecien modificacions importants en el perfil electroforètic del LPS suggereix que les modificacions han de ser molt subtils.

**Taula 4.1** Rendiments obtinguts amb l'extracció de LPS i quantificació de sucres neutres i Kdo.

SOCA	CÈL·LULES DESHIDRATADES	LPS OBTINGUT	RENDIMENT
NM554 pACYC	1,21 g	10,8 mg	0,89 %
NM554 pNP9	1,04 g	34,2 mg	3,28 %
NM554 pSK	1,25 g	9,0 mg	0,72 %
NM554 pSKF41	1,55 g	10,3 mg	0,66 %

A partir de 1mg de cada LPS, es va dur a terme el procediment de derivatització a aldítols derivats i a continuació es va analitzar per Cromatografia de Gasos. A partir de

0,5 mg de LPS es va quantificar la quantitat de Kdo total mitjançant el mètode colorimètric (Taula 4.2 )

**Taula 4.2** Composició quantitativa dels LPS de les soques recombinants NM554 pACYC, NM554 pNP9, NM554 pSK i NM554 pSKF41.

LPS	Glc (nmols/mgLPS)	L,D-Hep (nmols/mgLPS)	Kdo (nmols/mgLPS)
NM554 pACYC	215,47	380,60	125,00
NM554 pNP9	384,35	1492,96	267,46
NM554 pSK	208,70	358,70	150,98
NM554 pSKF41	450,89	1650,98	230,76

#### 4.2.2 *Estudis fenotípics en la soca NM554 que transporta dos plàsmids.*

Per tal d'estudiar la influència dels gens distals, no relacionats en principi amb la biosíntesi del nucli del LPS, es van dur a terme estudis fenotípics amb la soca d'*E. coli* NM554 transformada amb dos plàsmids: un que transportava gens *waa* i l'altre que transportava gens distals. Per aquests experiments es van utilitzar els plàsmids descrits anteriorment pWSKS1 i pWSKS2. Com a plàsmid que transportés gens *waa* es va utilitzar l'insert contingut en el plàsmid pSKF41, el qual es va alliberar a través de digestió amb *Bam*HI i es va lligar al plàsmid pACYC184. El plàsmid generat (anomenat pACYCF41) es va transformar en la soca NM554. La soca resultant es va transformar per una banda amb el plàsmid pWSKS1 i pWSKS2. Tal com es pot comprovar en la taula 4.2, no es van observar canvis en els fenotips de les soques resultants.

**Taula 4.2** Estudis fenotípics de les soques NM554 pACYCF41-pWSKS1 i NM554 pACYCF41-pWSKS2.

SOCA	PLÀSMIDS	BACTERIOCINA	PATRÓ DE BANDES DE LPS
NM554	pACYCF41 pWSKS1	R	2
NM554	pACYCF41 pWSKS2	R	2

### 4.3 Anàlisi mutacional del plàsmid pNP9

El plàsmid pNP9 va resultar ser el subclon més petit que confereix el nivell de resistència més gran a la bacteriocina 28b i modifica clarament la mobilitat del LPS d'*E. coli*. Per confirmar els resultats de l'apartat anterior, es va procedir a mutagenitzar aquest plàsmid amb el transposó miniTn5. Aquest plàsmid contenia la majoria dels gens que volíem estudiar quant a la seva influència en el fenotip de resistència a la bacteriocina i a l'alteració de la mobilitat de LPS en gels de poliàcrilamida. Per una banda, volíem descartar que els gens *fpg*, *rpmG* i *rpmB* poguéssin intervenir d'alguna manera en la producció d'aquest fenotips. Per altra banda, volíem obtenir mutants per inserció tant dels gens de la regió *kdt* (especialment del gen *waaE*) i dels gens *waaB* i *waaQ*.

Els experiments de mutagènesi per transposició es van realitzar per conjugació tal com es descriu en l'apartat 8.12.3 del capítol de Material i mètodes. La selecció de les colònies conjugants es va realitzar amb els antibiòtics Kanamicina i Cloramfenicol. Com a soca receptora es va utilitzar la soca *E. coli* NM554 pNP9 i com a soca donadora es va utilitzar la soca *E. coli* SM10( $\lambda$  *pyr*). Els plàsmids obtinguts es van caracteritzar, en primer lloc, per restriccions i a continuació es va identificar el punt d'inserció mitjançant reaccions de seqüenciació amb les cebadors del transposó ISI i ISO (Taula 4.3) a una temperatura d'hibridació de 50 °C.

**Taula 4.3** Seqüència dels cebadors utilitzats per determinar la posició de les insercions de miniTn5.

CEBADOR	SEQÜÈNCIA
ISI	5'-CTGTCTCTTGATCAGATCT-3'
ISO	5'-ACTTGTGTATAAGAGTCAG-3'

En total, es van obtenir 44 plàsmids diferents, cadascun d'ells amb una inserció. Per tal de caracteritzar-los, es van dur a terme restriccions amb els enzims *Bam*HI i *Eco*RV. El patró de restricció del plàsmid pNP9 amb l'enzim *Bam*HI va donar 3 bandes de 5180 pb (on es troba la regió *kdt*), 4069 (regió on hi ha el vector pACYC184), 1797 (regió on es troben els gens *fpg*, *rpmG* i *rpmB*). També es va usar l'enzim *Eco*RV que talla el plàsmid pNP9 en tres fragments: un de 6,8 Kb (conté el vector més els gens *waaB* i *waaQ*), un de 2,3 Kb (conté els gens *fpg*, *rpmG* i *rpmB*) i un de 1,8 Kb (conté la regió *kdt*). L'alteració en el patró de restricció en una d'aquestes bandes va permetre conèixer

en quina regió es trobava la inserció. Les insercions que es van produir en la regió del vector no van ser caracteritzades.

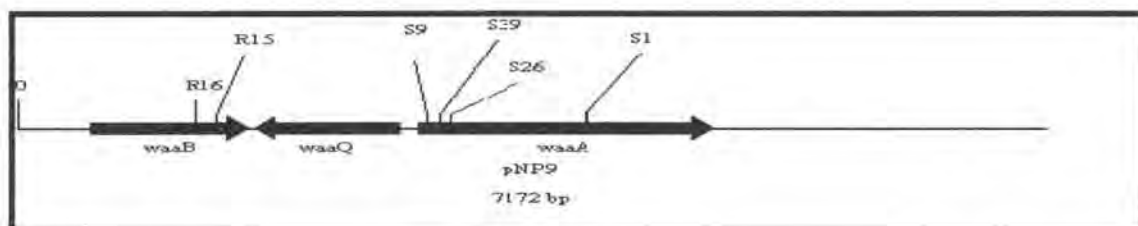
En la Taula 4.4 i en la Figura 4.6 es mostra la localització de les insercions d'alguns dels plàsmids aïllats i caracteritzats.

**Taula 4.4** Plàsmids derivats del plàsmid pNP9 que contenen insercions amb mini Tn5.

RR= elevat nivell de resistència a la bacteriocina 28b. o=orientació de transposó en què el gen de resistència a la Kanamicina es transcriu en la mateixa direcció que el gen *waaA*. •=orientació del transposó en què el gen de resistència a la Kanamicina es transcriu en direcció oposada al gen *waaA*.

PLÀSMID	POSICIÓ	REGIÓ	R/S A LA BACTERIOCINA	ORIENTACIÓ
pNP9R16	1235	<i>waaB</i>	RR	o
pNP9R15	1390	<i>waaB</i>	RR	o
pNP9S28	2820	<i>waaA</i>	S	•
pNP9S9	2844	<i>waaA</i>	S	o
pNP9S39	2950	<i>waaA</i>	S	o
pNP9S30	2954	<i>waaA</i>	S	o
pNP9S26	3020	<i>waaA</i>	S	o
pNP9S40	3065	<i>waaA</i>	S	•
pNP9S37	3088	<i>waaA</i>	S	•
pNP9S29	3092	<i>waaA</i>	S	•
pNP9S44	3110	<i>waaA</i>	S	•
pNP9S27	3130	<i>waaA</i>	S	o
pNP9S42	3510	<i>waaA</i>	S	o
pNP9S36	3700	<i>waaA</i>	S	o
pNP9S1	3963	<i>waaA</i>	S	•
pNP9R20		pACYC184	RR	
pNP9R25		pACYC184	RR	
pNP9R35		pACYC184	RR	

Figura 4.6 Mapa d'algunes de les insercions en el plàsmid pNP9.



Malhauradament, tal com es mostra en la Taula 4.4 i en la Figura 4.6, només es van trobar insercions en els gens *waaB* i *waaA*. No es van trobar insercions en els gens *waaE* ni en els gens distals que volíem estudiar.

Aquests resultats suggereixen que l'expressió del gen *waaB* de *Serratia marcescens* en *E. coli* NM554 no està involucrat en els fenotips de resistència a la bacteriocina. El gen *waaA*, en canvi, sí que hi podria estar involucrat o bé aquesta mutació podria tenir efectes polars sobre l'expressió del gen *waaE* ja que l'expressió del gen *waaA* (tant de *S. marcescens* com de *K. pneumoniae*) en *E. coli* NM554 no produeix cap alteració, ni en gels de LPS ni quant a resistència a la bacteriocina. Tenint en compte els resultats de l'apartat anterior, el gen *waaE* podria ser el responsable del canvi de fenotip. Els resultats obtinguts suggereixen que el gen *waaE* és capaç de modificar el LPS d'*E. coli* per conferir resistència a la bacteriocina 28.

L'anàlisi per gels de LPS va demostrar les soques amb un fenotip de resistència a la bacteriocina presentaven alteracions en la mobilitat dels gels de LPS. Les soques sensibles a la bacteriocina no presentaven alteracions.

## 5 MODIFICACIONS PRODUÏDES PEL GEN *waaE* DE *S. marcescens* EN EL LPS D'*E. coli* I DE *Salmonella*

Donat que el gen *waaE* produïa un fenotip de resistència parcial a la bacteriocina en la soca d'*E. coli* NM554 es va procedir a estudiar els LPS de la soca control i de la soca recombinant. A més, també es va estudiar els efectes produïts per aquest gen en soques de *S. enterica* que tenien mutacions en diversos gens *waa*.

### 5.1 Efecte produït sobre mutants de *Salmonella*

Dels resultats obtinguts exposats en els capítols anteriors se'n desprenia que el gen *waaE* era responsable dels fenotips de resistència a la bacteriocina i de l'alteració de la mobilitat en gels de poliacrilamida SDS-PAGE. Per tal de descobrir el nivell d'actuació d'aquest gen en la molècula de LPS substrat, es va dur a terme la transformació del plàsmid pWSK1848 en diferents soques mutants de nucli de LPS de *Salmonella enterica* Typhimurium LT2. Els diferents mutants posseïen els quemotips Re, Rd1, Rd2 i Rc. En la Taula 5.1 es resumeixen les soques utilitzades i l'estructura del nucli del LPS de cadascuna.

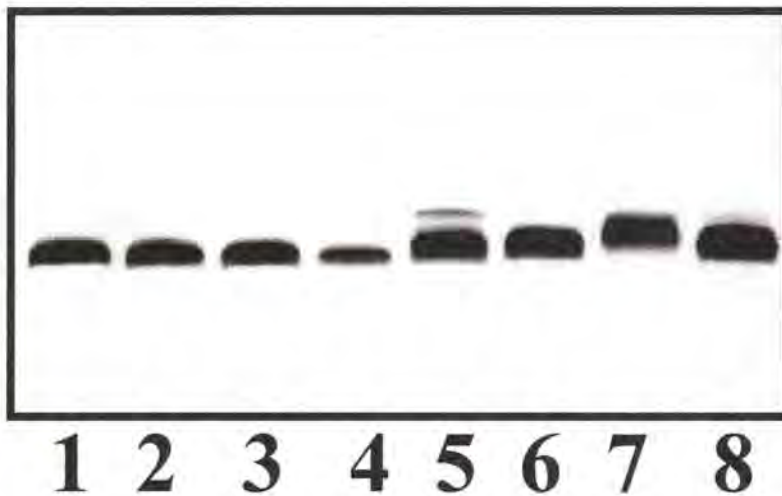
**Taula 5.1** Característiques de les soques de *Salmonella enterica* que van ser transformades amb el plàsmid pWSK1848 que transporta el gen *waaE* de *S. marcescens*.

NOM DE LA SOCA	MUTACIÓ	QUIMIOTIP	ESTRUCTURA DEL NUCLI
SA1377	<i>rfaC630</i>	Re	(Kdo)-Kdo-Kdo
SL3789	<i>rfaF511</i>	Rd2	Hep   Kdo-Kdo-(Kdo)
SL3854	<i>rfaG489 gal1-851</i>	Rd1	Hep - Hep   Hep   Kdo-Kdo-(Kdo)
SA2381	<i>galE409</i>	Rc	Glc   Hep - Hep   Hep   Kdo-Kdo-(Kdo)

Cadascuna d'aquestes soques va ser estudiada junt amb la soca recombinant que transportava el plàsmid pWSK1848. El LPS de les respectives soques es va estudiar a través de gels de poliacrilamida SDS-PAGE-Tricina (gels de nucli). Tal com es pot observar en la Figura 5.1, el patró obtingut de LPS es veu modificat en les soques SL3854 i SA2381 quan expressen el gen *waaE*. No s'observen canvis en les soques SA1377 i SL3789.

Aquests resultats suggereixen que les modificacions ocasionades per la proteïna WaaE estarien a nivell de la HepI o de la HepII.

**Figura 5.1.** Gel de SDS-PAGE en tampó tricina en què es mostren els LPSs de les soques: SA1377 (carril 1), SA1377 pWSK1848 (carril 2), SL3789 (carril 3), SL3789 pWSK1848 (carril 4), SL3854 (carril 5), SL3854 pWSK 1848 (carril 6), SA2381 (carril 7), SA2381 pWSK1848 (carril 8)



### 5.1.1 Anàlisi química del LPS de la soca recombinant de *Salmonella*.

Donat que la soca de *Salmonella waaG*, amb un quimiotip Rd1, presentava alteracions en la mobilitat del LPS en gels de poliacrilamida quan expressava el plàsmid



pWSK1848, es va decidir també analitzar el LPS, juntament amb el LPS de la soca control (*Salmonella waaG*<sup>-</sup>).

Es van dur a terme cultius a 37°C durant tota la nit de 5 l de TSB. Donat que, en els dos casos, es tractava de LPS de tipus R, es va utilitzar el procediment d'extracció amb PCP (Apartat 9.1.2 de Material i Mètodes). Les quantitats obtingudes en cada cas es mostren en la Taula 5.2.

**Taula 5.2** Quantitats obtingudes en l'extracció del LPS a partir de 5 l de cultiu.

SOCA BACTERIANA	GRAMS DE CÈL·LULES DESHIDRATADES	mg DE LPS OBTINGUTS	RENDIMENT
<i>Salmonella enterica waaG</i> <sup>-</sup>	3,88 g	106,7 mg	2,75 %
<i>Salmonella enterica waaG</i> <sup>-</sup> pWSK1484	2,17 g	36,6 mg	1,68 %

Una vegada obtingut el LPS, es va partir de 1 mg de mostra per dur a terme el procediment de derivatització a alditol derivats. A continuació, es van analitzar els sucres neutres per Cromatografia de Gasos i a partir de 500 mg de LPS procedent de les dues soques es va dur a terme la determinació colorimètrica de Kdo. Les concentracions obtingudes de nmols de sucre per mg de LPS en cada cas es mostren en la Taula 5.3.

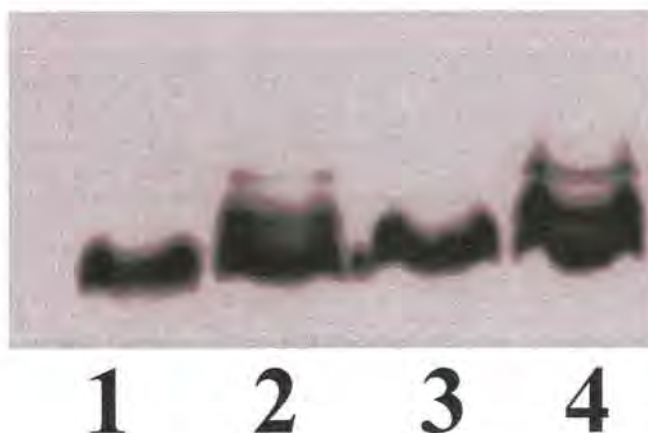
**Taula 5.2** Composició en sucres neutres i Kdo del LPS de les soques de *Salmonella waaG*<sup>-</sup> i *Salmonella waaG*<sup>-</sup> pWSK1848.

LPS	Glc (nmols/mgLPS)	L,D-Hep (nmols/mgLPS)	Kdo (nmols/mgLPS)
LPS <i>Salmonella enterica waaG</i> <sup>-</sup>	31,87	186,57	159,59
LPS <i>Salmonella enterica waaG</i> <sup>-</sup> pWSK1484	227,87	250,00	155,58

Tal com es pot observar en la Taula 5.3, existeixen diferències importants en la composició del LPS de les dues soques. En la soca control, la presència de Glc és molt baixa i, per tant, es pot considerar com a contaminant de la preparació de LPS. La soca

recombinant, en canvi, va donar nivells elevats de Glc. Aquest fet suggereix que l'expressió del gen *waaE* en mutants de *Salmonella* podria donar lloc a la transferència d'un residu addicional de Glc en el LPS d'aquestes soques. Per tant, el producte gènic podria tenir la funció de glucosil transferasa.

**Figura 5.3** Anàlisi del LPS després de l'extracció amb PCP. LPS de la soca *Salmonella enterica waaG* pWSK1484 (Carrils 1 i 3) i *Salmonella enterica waaG*<sup>-</sup> (Carrils 2 i 4).



## 5.2 Anàlisi química del LPS de les soques NM554 pWSK i NM554 pWSK1848.

Donades les diferències fenotípiques observades prèviament entre la soca NM554 pWSK i la soca NM554 pWSK1848 (que expressa el gen *waaE*) es va decidir analitzar químicament la molècula del LPS corresponent a les dues soques.

En els dos casos l'extracció de LPS es va dur a terme pel mètode del PCP (descriu en l'apartat 9.1.2 de material i mètodes). Es va dur a terme, en primer lloc, un cultiu de 30 litres a partir del qual es van obtenir aproximadament 20g de cèl.lules deshidratades. L'obtenció de LPS es va dur a terme mitjançant diversos processos d'extracció amb PCP. En molts dels processos el rendiment obtingut va ser aproximadament del 3%. En els casos en què es va detectar una presència elevada de proteïnes i àcids nucleics va ser necessari dur a terme un pas posterior de purificació del LPS mitjançant tractament amb enzims (nucleasa, DNAasa, RNAasa i Proteïnasa K) i ultracentrifugació tal i com es

descriu en l' apartat de material i mètodes. A partir dels LPS purificats es va dur a terme l' anàlisi química.

### ***5.2.1 Determinació colorimètrica del contingut en Kdo, glucosamina i fosfat.***

Aquestes determinacions es van dur a terme mitjançant els procediments descrits en l' apartat de Material i mètodes (apartat 9.3) Els valors obtinguts es mostren en la Taula 5.4.

**Taula 5.4** Anàlisi de la composició del LPS de les soques NM554 pWSK i NM554 pWSK1848 mitjançant mètodes colorimètrics.

<b>LPS</b>	<b>Kdo (nmols/mgLPS)</b>	<b>GlcN (nmols/mgLPS)</b>	<b>Ptotal (nmols/mgLPS)</b>	<b>Pinorgànic (nmols/mgLPS)</b>
NM554 pWSK	481,20	417,19	1285,80	96,84
NM554 pWSK1848	473,00	415,36	1410,79	78,45

Com es pot observar, en cap dels casos les diferències van ser molt importants.

### ***5.2.2 Determinació per Cromatografia de gasos del contingut en sucres neutres i àcids urònics.***

La determinació quantitativa per Cromatografia de Gasos es va dur a terme després del tractament de les mostres destinat a convertir els monosacàrids en alditol derivats (apartat 9.8.1 de material i mètodes)

Els valors obtinguts són els que mostra la Taula 5.5. En el cas de la determinació d' àcids urònics no es va detectar presència d' àcids urònics en cap dels casos.

Donat que la determinació quantitativa dels components presents en les mostres no ens va aportar la suficient informació per detectar diferències es va procedir a l' anàlisi de les mostres per Espectrometria de Masses.

**Taula 5.5** Anàlisi de composició mitjançant Cromatografia de gasos dels LPS de les soques NM554 pWSK i NM554 pWSK1848.

LPS	Glc (nmols/mg LPS)	L,D-Hep (nmols/mg LPS)
NM554 pWSK	287,44	200,95
NM554 pWSK1848	287,64	304,55

### 5.2.3 O-desacilació dels LPS i anàlisi per MALDI-TOFF

El tractament dels LPS amb hidrazina va permetre hidrolitzar els dos enllaços ester presents en el lípid A i per tant aconseguir un augment de la solubilitat de les mostres. Es va partir d'uns 100 mg de LPS i després de la hidrazinolisi es van obtenir uns 75 mg de mostra dels quals es van utilitzar 0.5 mg per a l'anàlisi per espectrometria de masses. El tractament previ a l'anàlisi està descrit en l'apartat de material i mètodes.

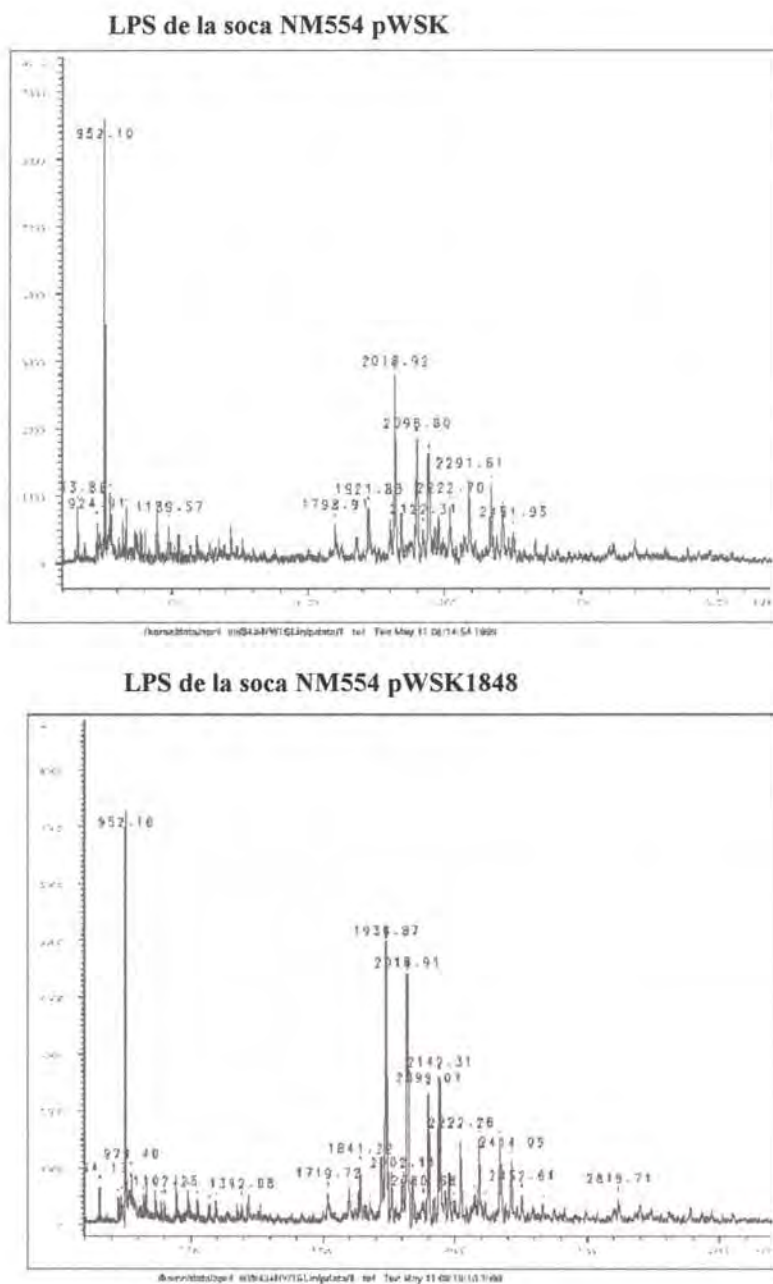
En la Figura 5.4 es mostren els dos espectres obtinguts. Com es pot veure, en primer lloc es pot apreciar la presència d'una heterogenicitat elevada que, donada la composició fixa del lípid A, correspon al nucli. En segon lloc, es pot apreciar una diferència en els dos espectres. En concret en la mostra corresponent a la soca NM554 pWSK1848 apareix un pic d'una massa molecular de 1938.8 en la qual un grup fosfat hi estaria absent (Taula 5.6) Aquest fosfat que manca correspon a un fosfat del nucli donat que els dos fosfats del lípid A hi són presents (massa molecular del lípid A des-O-acilat correspon al primer pic i és igual a 952.1). L'espectre obtingut dels dos LPS permet establir amb exactitud la distribució de pics en la soca control NM554. Aquest espectre posa de manifest la presència de Glc i de fosfat. La distribució de pics mostra que la presència del segon grup fosfat només es dona si hi ha la presència dels tres residus d'Hep. Aquest fet dona informació sobre l'ordre que es deu dur a terme en la biosíntesi del nucli del LPS.

En la Taula 5.6 es resumeixen les masses moleculars obtinguts en els dues mostres i la possible composició a què corresponen.

**Taula 5.6** Composició proposada a partir dels espectres realitzats amb els LPS des-O-acilats de les soques NM554 pWSK i NM554 pWSK1848.

LPS	MASSA MOLECULAR	COMPOSICIÓ PROPOSADA	
NM554 pWSK	952,1	lipiA-O-desacilat	
	1798,9	Glc,Hep <sub>2</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
	1921,9	P,Glc,Hep <sub>2</sub> ,Kdo,lipiA-O-desacilat	
	2018,9	PGlcHep <sub>2</sub> Kdo <sub>2</sub> lipiA-O-desacilat	
	2098,7	P <sub>2</sub> GlcHep <sub>2</sub> Kdo <sub>2</sub> lipiA-O-desacilat	
	2142,1	P,PE,Glc,Hep <sub>2</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
	2178,8	P <sub>3</sub> ,Glc,Hep <sub>2</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
	2222,6	P <sub>2</sub> ,PE,Glc,Hep <sub>2</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
	2291,0	P <sub>2</sub> ,Glc,Hep <sub>3</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
	2371,0	P <sub>3</sub> ,Glc,Hep <sub>3</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
	2424,0	P <sub>2</sub> ,PE,Glc,Hep <sub>3</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
	2450,6	P <sub>4</sub> ,Glc,Hep <sub>3</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
	NM554 pWSK1848	952,1	lipiA-O-desacilat
		1718,5	Glc,Hep <sub>2</sub> ,Kdo,lipiA-O-desacilat
1798,9		P,Glc,Hep <sub>2</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
1921,9		P,Glc,Hep <sub>2</sub> ,Kdo,lipiA-O-desacilat	
1938,8		Glc,Hep <sub>2</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
2018,8		P,Glc,Hep <sub>2</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
2098,7		P <sub>2</sub> GlcHep <sub>2</sub> Kdo <sub>2</sub> lipiA-O-desacilat	
2142,2		P,PE,Glc,Hep <sub>2</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
2178,8		P <sub>3</sub> ,Glc,Hep <sub>2</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
2222,8		P <sub>2</sub> ,PE,Glc,Hep <sub>2</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
2291,0		P <sub>2</sub> ,Glc,Hep <sub>3</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
2370,6		P <sub>3</sub> ,Glc,Hep <sub>3</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
2424,0		P <sub>2</sub> ,PE,Glc,Hep <sub>3</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	
2450,6		P <sub>4</sub> ,Glc,Hep <sub>3</sub> ,Kdo <sub>2</sub> ,lipiA-O-desacilat	

**Figura 5.4** Espectres obtinguts després del tractament dels LPS amb hidrazina i anàlisi per MALDI. Un pic majoritari de 1938,7 Da s'observa en el LPS de la soca recombinant i està absent en el LPS de la soca control.

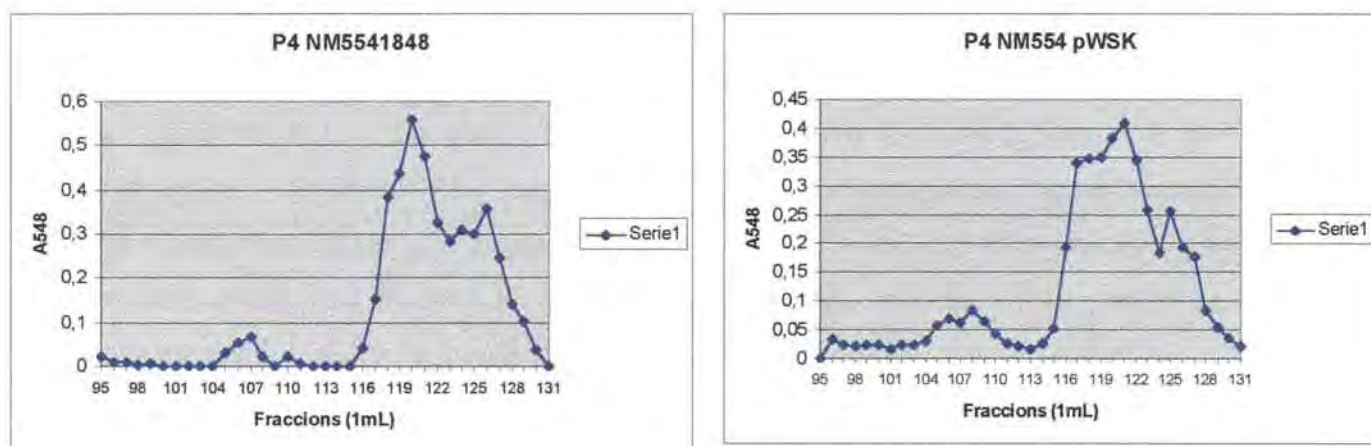


### 5.2.4 Anàlisi per ESI

Paral·lelament, les mostres de LPS van ser hidrolitzades amb àcid acètic, purificades en una columna de Superdex H-75 i a continuació amb Bio-gel P4 (Figura 5.5). El cromatograma obtingut no permet distingir diferències importants. La separació dels oligosacàrids mitjançant aquesta columna permet obtenir una resolució més bona que una columna G-50. Tot i això, no és suficient per separar els oligosacàrids que componen el nucli. L'única forma efectiva de fer-ho és mitjançant HPAEC.

A continuació, les diferents fraccions van ser analitzades per Electro spray (ESI) en els condicions descrites en l'apartat 9.11.2 de materials i mètodes. Els resultats obtinguts, estan d'acord amb els anteriors. Un pic diferent s'observa en el LPS de la soca recombinant en que un grup fosfat no hi és present.

**Figura 5.5** Perfil obtingut després de córrer els nuclis dels LPS en una columna de gel-filtració Bio-gel P4.



Partint que la diferència fins al moment observada corresponia a la pèrdua d' un grup fosfat en el cas del LPS corresponent a la soca NM554 pWSK1848, es va procedir a dur una sèrie de tractaments de les mostres per tal d' observar si hi havia diferències en la unió d' algun dels sucres presents en el nucli, glucosa o heptosa. En concret, es pretenia determinar si la glucosa present en el LPS corresponent a la soca recombinant estava unida per un enllaç  $\alpha$  o bé per un enllaç  $\beta(1\rightarrow4)$ . Per això es va dissenyar una sèrie d' experiments que ens permetessin distingir les posicions involucrades en els enllaços dels diferents monosacàrids (estudis de permetilació).

### ***5.2.5 Anàlisi dels monosacàrids Permetilats per Cromatografia de Gasos acoblada a Espectrometria de Masses.***

Per tal de dur a terme l'anàlisi per permetilació va ser necessari dur a terme el següent ordre d'experiments. En primer lloc, des-O-acilació per tal de fer més solubles les mostres i augmentar el rendiment del següent pas: la defosforilació (pas necessari per estudiar les posicions d'enllaç de les heptoses). A continuació, es va dur a terme un tractament amb àcid acètic per tal d'hidrolitzar el lípid A. Finalment, es va dur a terme un procés de reducció per tal de protegir els grups del Kdo de possibles oxidacions durant el procés de permetilació. El procés de permetilació en si consta del tractament amb l'agent metilant, hidròlisi i derivatització a alditols derivats.

Aquest és l'ordre que es va seguir. Els passos descrits no es van dur a terme en un altre ordre ja que alguns d'ells poden ser incompatibles. Per exemple, no es pot dur a terme un procés de defosforilació després del tractament amb àcid acètic perquè les condicions àcides fortes en què es duu a terme la defosforilació podrien afectar l'estabilitat del Kdo.

Es va iniciar el tractament amb uns 50 mg de mostra en cada cas i es van obtenir uns 5 mg de mostra al final del procés, els quals es van utilitzar per a la permetilació. Les mostres, després de la permetilació i de la derivatització a alditol derivats, es van córrer per Cromatografia de Gasos en les condicions normals. Els temps de retenció dels sucres permetilats són inferiors als temps dels sucres derivatitzats pels sistema habitual. A continuació, es van analitzar per Cromatografia de Gasos acoblada a Espectrometria de Masses.

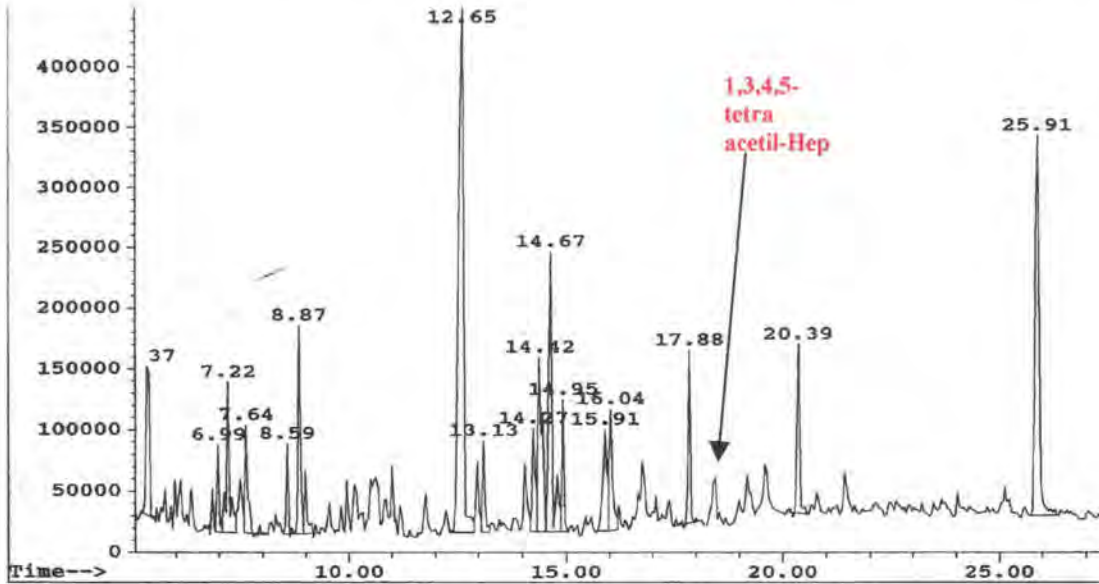
L'espectre obtingut després de la permetilació va indicar que els sucres majoritaris són els mateixos en les dues mostres i estan units a través dels mateixos enllaços. Malgrat això, es va detectar, encara que en una presència baixa, la 1,3,4,5-tetraacetil-Heptosa en el LPS corresponent a la soca recombinant i no es va detectar en la soca control (Figura 5.6). Aquesta Hep correspondria a l'Hep I unida per enllaç  $\beta(1\rightarrow4)$ . En els dos casos, es va observar els mateixos nivells de 1,5,7-triacetil-Hep i 1,3,5,7-tetraacetil-Hep que correspondrien a l'HepII. Per tant, encara que en poca proporció, l'HepI de la soca recombinant estaria substituïda en posició 4.

Aquest fet podria justificar la hipòtesi que el gen *waaE* podria actuar com a glucosil transferasa afegint un residu de glucosa en posició  $\beta(1\rightarrow4)$ . Tot i això no es podria



descartar la possibilitat que la presència de 1,3,4,5-tetraacetil-Heptosa fos deguda a un enllaç amb algun fosfat remanent o bé a la unió amb un residu de glucosa.

**Figura 5.6** Cromatograma obtingut del LPS de la soca NM554 pWSK1848 després dels tractaments de permetilació i derivatització a alditol derivats on es va detectar la presència de 1,3,4,5-tetraacetil-Hep.

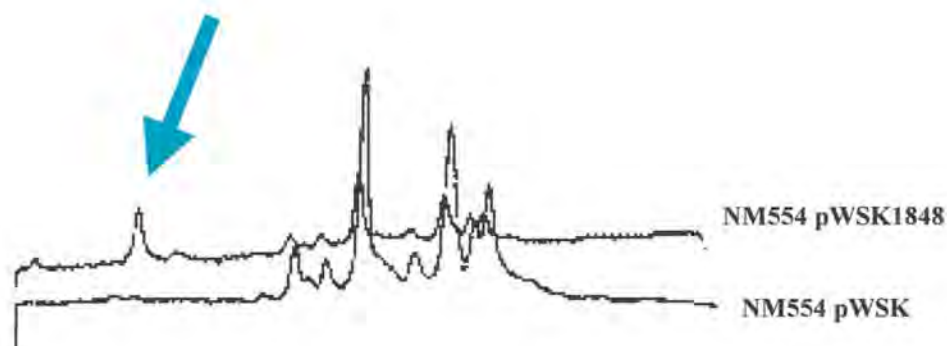


### 5.2.6 Anàlisi dels LPS per HPAEC

A més de les anàlisis de permetilació, es va intentar analitzar les mostres per HPAEC. Per tal de veure si hi havia diferències degudes a una diferent distribució dels monosacàrids, es va dur a terme el procés de defosforilació i després el tractament amb àcid acètic. Les mostres obtingudes es van analitzar mitjançant HPAEC en condicions alcalines. Usant diferents gradients d'acetat sòdic en condicions alcalines (pH=12) es va poder observar que els cromatogrames mostraven un pic diferent, present en el LPS de la soca recombinant i no present en el LPS de la soca control.

A més, també es va estudiar la distribució de pics en els dos LPS després d'un procés d'hidròlisi amb acètic. L'anàlisi per HPAEC va posar de manifest la presència d'un pic en el LPS de la soca NM554 pWSK1848 i absent en la soca NM554 pWSK (Figura 5.7) D'acord amb les altres dades obtingudes fins al moment aquest pic hauria de contenir un residu de Glc unit per enllaç  $\beta(1\rightarrow4)$  unit a l'Hep I i no hauria de contenir un residu de fosfat en aquesta posició.

**Figura 5.7** Anàlisi per HPAEC dels LPS hidrolitzats amb àcid acètic de les soques NM554 pWSK i NM554 pWSK1848. Condicions: gradient de 0-100% de NaOAc 1M/NaOH 0,1 M en 55 min.



### ***5.2.7 Anàlisi del pic diferencial present en el LPS de la soca que transporta el gen waaE***

El pic observat en la figura 5.7 va ser aïllat mitjançant una columna d'HPAEC preparativa. Per fer-ho es va partir de 500 mg del LPS de la soca NM554 pWSK1848 i van ser hidrolitzats amb àcid acètic. La fracció polisacàridica es va córrer en la columna preparativa i a continuació es va purificar la fracció mitjançant una columna G-10 per tal d'eliminar les sals. Es va obtenir 1 mg d'aquesta fracció i es va analitzar per H-RMN. L'espectre va presentar una senyal situada en la regió  $\beta$ . Aquest residu podria pertànyer a una Glc. Per tal de constatar-ho s'han dut a terme anàlisis de RMN en dues dimensions que establiran les posicions d'aquesta residu invocrades en l'enllaç.

### 5.2.8 Relació entre estructura i fenotips

Aquests resultats ens van indicar que segurament la diferència bàsica entre els dos LPS corresponia a una manca de fosfat en el LPS de la soca recombinant. La falta de fosfat i la presència d'un residu de Glc en el seu lloc, podria explicar el fenotip observat d'alteració de la mobilitat en gels de LPS ja que la relació càrrega-massa es veuria alterada.

Per altra banda, el fenotip de resistència a la bacteriocina observat en la soca NM554 pWSK1848 també es podria explicar a través dels resultats obtinguts. S'ha observat que mutants de *Salmonella enterica* i d'*E. coli* K-12 deficients en grups fosfats en el nucli intern presenten un fenotip "deep-rough". Aquest fenotip produeix una disminució en les proteïnes OmpF i OmpA (Schaitman, 1993; Raetz, 1996). Donat que aquestes proteïnes constitueixen un dels llocs d'unió de la bacteriocina 28b, la seva disminució produïda per l'estructura de LPS descrita en la soca NM554 pWSK1848 explicaria el fenotip de resistència a la bacteriocina que presenta aquesta soca respecte a la soca control.

## 6 ANÀLISI QUÍMICA DEL NUCLI DEL LPS DE *Serratia marcescens*

Donat que els estudis realitzats fins al moment estaven encaminats a caracteritzar genèticament els gens implicats en la biosíntesi del nucli del LPS, es va considerar oportú dur a terme una anàlisi química del nucli del LPS de *Serratia marcescens*. Estudis previs ja s'havien dut a terme per Wang *et al.* (Wang *et al.*, 1974) i per Radziejewska-Lebrecht (Radziejewska-Lebrecht *et al.*, 1990) i havien posat de manifest que en el nucli de *Serratia marcescens* (O:8) hi havia present residus de GalA i de D,D-Hep com a trets distintius.

L'anàlisi del nucli del LPS ens havia permetre tenir una idea més clara de la possible funció dels gens seqüenciats. A més, la producció de mutants de cadascun d'aquests gens requeria conèixer l'estructura del LPS de la soca parental per després poder analitzar l'estructura química del LPS del mutant i per tant desxifrar la funció del gen en qüestió. A més, fins al moment, no es coneixia l'estructura del LPS en cap dels serotips de *S. marcescens*. Donades les semblances genètiques entre *Serratia marcescens* i *Klebsiella pneumoniae* era d'esperar que l'estructura del nucli del LPS en *Serratia marcescens* fos semblant a les estructures descrites en *Klebsiella pneumoniae* serotip O:1 i serotip O:8.

### 6.1 Característiques del LPS extret

Per a l'extracció del LPS es va partir de 30 l de cultiu líquid. A partir de les cèl·lules deshidratades, es va procedir a l'extracció a través del mètode fenol-aigua (descriu en l'apartat de material i mètodes). A partir d'aquest cultiu es van obtenir 300 mg de LPS. Es va utilitzar el mètode de fenol-aigua donat que el LPS de la soca *Serratia marcescens* N28b havia de ser un LPS de tipus S amb un antígen O la composició de la qual ja estava descrita (Oxley, 1988).

Una vegada extret el LPS i purificat amb enzims i ultracentrifugació es va dur a terme una anàlisi prèvia a través de gels de poliacrilamida SDS-PAGE. L'aspecte del LPS es mostra en la Figura 6.1.

**Figura 6.1** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE del LPS extret (Carrils 1 i 2).

En aquest gel, es va observar que el LPS semblava posseir la fracció corresponent a l'antigen O en més baixa proporció del que és habitual. Per altra banda, es va poder comprovar que la fracció corresponent al nucli presentava a més algunes bandes que podien correspondre a LPS de tipus RS, és a dir, amb alguna repetició d'antigen O.

### 6.1.1 Composició quantitativa del LPS sencer

Amb el LPS sencer es va dur a terme una anàlisi quantitativa dels seus components a través de mètodes colorimètrics o bé a través de Cromatografia de Gasos. Per a l'anàlisi de la composició en sucres neutres i àcids urònics es va partir de 0,5 mg de LPS.

En la Taula 6.1 es mostra la concentració en sucres neutres i àcids urònics i en la Taula 6.2 es mostra la concentració de fosfat, GlcN i Kdo. Tal com es pot observar, el sucre majoritari present en el LPS sense hidrolitzar és la glucosa. Aquest LPS es caracteritza per la presència de D,D-Hep i d'àcids urònics (GalA). La concentració de fosfat és baixa i la concentració de fosfat orgànic (total-inorgànic) coincideix aproximadament amb la concentració de GlcN unida pel carboni anomèric (GlcN total-GlcN lliure). Això suggereix que el fosfat detectat està unit a la GlcN i, per tant, no pertany a la fracció polisacàridica sinó que pertany al lípid A. L'absència de fosfat en el nucli del LPS constitueix una altra característica important d'aquest LPS, que el diferencia dels LPS caracteritzats en *E. coli*, *Salmonella* i *Shigella* i l'acosta als LPS de *Klebsiella*, *Proteus* i *Yersinia*.

**Taula 6.1** Composició quantitativa en sucres neutres i àcids urònics en el LPS sencer de *S. marcescens*.

Conc. (nmols/mg LPS)	Rha	Man	Glc	Gal	L,D-Hep	D,D-Hep	GalA
LPS <i>S. marcescens</i>	165,45	52,96	822,97	342,00	239,60	32,9	383

**Taula 6.2** Composició quantitativa en Kdo, fosfat i GlcN del LPS sencer de *S. marcescens*.

Concentració (nmols/mg LPS)	Kdo	Fosfat total	Fosfat inorgànic	GlcN lliure	GlcN total
LPS <i>S. marcescens</i>	139,44	300,31	50,00	109,22	480,37

## 6.2 Hidròlisi del LPS amb àcid acètic. Separació de les diferents fraccions

La hidròlisi amb àcid acètic al 1% permet separar la part polisacàridica del lípid A a través de la ruptura de l'enllaç entre el Kdo i la glucosamina.

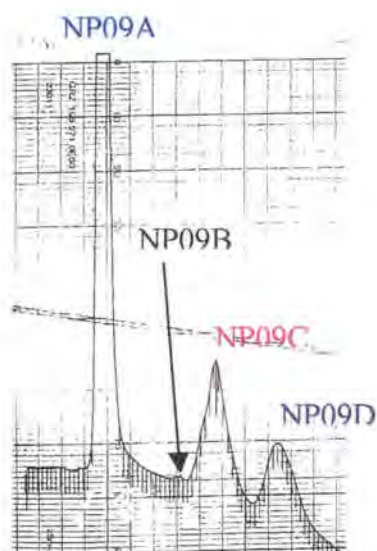
Habitualment, es duu a terme un procés d'hidròlisi amb hidrazina seguit d'una hidròlisi amb KOH que permet eliminar els àcids grassos però mantenir el disacàrid corresponent al lípid A. En el nostre cas, aquest tractament no va ser possible ja que vam detectar la presència d'àcids urònics (GalA). Els àcids urònics en condicions bàsiques poden sofrir un procés de  $\beta$ -eliminació, fet que dona lloc a la degradació de la molècula. Per tant, l'única alternativa per hidrolitzar el LPS era a través de la hidròlisi amb àcid acètic.

Abans de realitzar la hidròlisi amb tot el material de que disposàvem, vam dur a terme una hidròlisi prèvia partint de 20 mg. Les condicions d'hidròlisi van ser: 90 °C i 90 minuts. Després de la ultracentrifugació es va liofilitzar el sobrenadant i es va aplicar a una columna de Sephadex G-50. El cromatograma obtingut en aquesta columna va posar de manifest la presència de 4 pics, dos dels quals eren majoritaris. Les fraccions obtingudes es van anomenar: NP09A, NP09B, NP09C, NP09D. En la Figura 6.2 es mostra el patró obtingut.

**Taula 6.3** Quantitats obtingudes de cada fracció, després del tractament amb àcid acètic i de la separació en la columna G-50.

<b>Lípid A:</b> 106.18 mg (42.5%)
<b>Fracció polisacàridica:</b> 118.81 mg (47.5%)
NP09A: 23.47 mg
NP09B: 1.77 mg
NP09C: 42.82 mg
NP09D: 23.02 mg

**Figura 6.2** Pics obtinguts per cromatografia de gel-filtració (G-50) després de la hidròlisi amb àcid acètic. La fracció NP09C correspon a l'oligosacàrid del nucli.



Després d'analitzar per CG les diferents fraccions obtingudes, es va dur a terme una hidròlisi en les mateixes condicions però a gran escala. Es va partir de 250 mg de LPS i es van obtenir les quantitats que s'indiquen en la Taula 6.3 de cada fracció després del pas d'ultracentrifugació i d'aplicació en la columna G-50 (Figura 6.2).

**Taula 6.3** Quantitats obtingudes de cada fracció, després del tractament amb àcid acètic i de la separació en la columna G-50.

**Lípid A:** 106.18 mg (42.5%)

**Fracció polisacàridica:** 118.81 mg (47.5%)

NP09A: 23.47 mg

NP09B: 1.77 mg

NP09C: 42.82 mg

NP09D: 23.02 mg

A partir d'aquestes quantitats es va posar de manifest que es tractava d'un LPS de tipus R o RS ja que la fracció corresponent al nucli estava en una proporció molt elevada respecte a la resta de fraccions, especialment respecte a la primera fracció (NP09A) que en altres condicions hauria d'haver correspost a l'antigen O (Taula 6.3).

### 6.3 Caracterització per Cromatografia de Gasos de les fraccions poli i oligosacàridiques

A partir de 0.5 mg de cada fracció es va dur a terme el procés d' hidròlisi i de transformació a alditol derivats. A través de Cromatografia de gasos, es va poder determinar la composició quantitativa en sucres neutres. Les quantitats obtingudes es mostren en la Taula 6.4.

**Taula 6.4.** Composició quantitativa en sucres neutres de les fraccions obtingudes després de la hidròlisi amb acètic. La concentració de Gal pot incloure també GalA.

Concentració (nmols/ mgLPS)	Rha	Man	Glc	Gal	D,D-Hep	L,D-Hep
fracció A (NP09A)	664,54	394,75	1788,80	1310,30		151,45
fracció B (NP09B)	235,78	156,94	811,70	475,49		262,53
fracció C (NP09C)	161,44	84,49	1124,06	723,90	367,98	2427,88
fracció D (NP09D)	41,14		111,99	38,10		109,20

A partir d' aquestes concentracions, es va posar de manifest que la fracció NP09A no corresponia a l'esperat antígen O ja que hi havia a més de glucosa i ramnosa la presència de galactosa. La fracció NP09B contenia els mateixos sucres neutres que la fracció NP09B i per tant va deixar-se d' estudiar. Pel que fa a la fracció NP09C, es va posar de manifest que es tractava de la fracció corresponent a l' oligosacàrid del nucli del LPS ja que s'hi va detectar la presència tant de L,D-Hep com de D,D-Hep.

A més, també es va detectar la presència de GalA en la fracció corresponent al nucli. Es va mesurar per reacció colorimètrica la presència de fosfat. La concentració obtinguda va donar un valor molt baix (50,89 nmols/mg LPS).

Els sucres presents en la fracció NP09D van fer pensar que en aquesta fracció es trobaven sucres hidrolitzats i no un polisacàrid ni un oligosacàrid.



### 6.4 Estudi de la primera fracció (NP09A).

L' estudi de la fracció NP09A es va dur a terme per esbrinar si en alguna proporció l' antigen O s' havia expressat. Tenint en compte que si el polisacàrid corresponent a l' antigen O estava present en aquesta fracció, aquest havia de ser neutre. Donat que altres sucres estaven presents, era possible que en aquesta fracció existís una barreja de polisacàrids, alguns d' ells provinents possiblement de la càpsula. Tal com s' ha descrit en l' apartat de la introducció (Apartat 3.2.4), existeixen diferents polímers àcids d' origen capsular que s' expressen conjuntament amb l' antigen O. Per tant, era d' esperar que en aquesta fracció existís algun polímer àcidic.

Per tal de separar polímers neutres de polímers àcids, es va utilitzar una columna d' intercanvi iònic (DEAE Sepharose CL6B). Es van aplicar 17.22 mg de fracció NP09A. Es va córrer la mostra utilitzant un gradient que anava des de condicions neutres (usant aigua com a eluent) fins a concentracions creixents de NaCl (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 i 0.5M). Es va detectar la presència de sucres per TLC en la fracció neutra i en les condicions 0.2M. Aquestes dues fraccions es van anomenar NP09Aneu i NP09A0.2. Aquestes fraccions es van purificar per diàlisi i es van analitzar per Cromatografia de gasos i RMN.

La composició en sucres neutres i àcids urònics per les dues fraccions es mostra en la Taula 6.5.

**Taula 6.5** Composició quantitativa de sucres de les dues fraccions separades per una columna d'intercanvi iònic DEAE CL6B.

Concentració (nmols/mg LPS)	Rha	Man	Glc	Gal	GalA
NP09A-0.2M	634,5	301,87	2046,84	1200,6	164,8
NP09Aneu			3530,7		

Pel que fa a la fracció neutra es va demostrar que no corresponia a l' esperat antigen O ja que només es va observar la presència de glucosa. En el cas del polímer àcidic es va comprovar que posseïa àcid galacturònic a més de ramnosa, manosa, glucosa i galactosa.

## 6.5 Estudi de l' oligosacàrid corresponent al nucli del LPS. Separació per HPAEC.

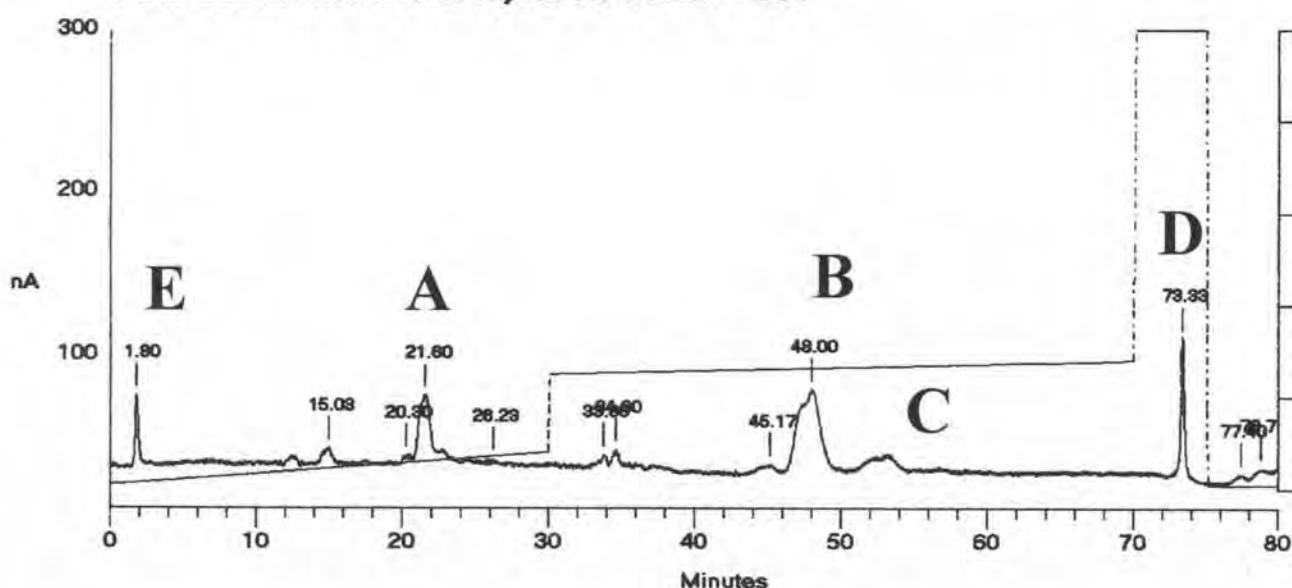
Per tal d' estudiar el nivell d' heterogenicitat del nucli, es va dur a terme una separació per HPAEC a nivell analític. En primer lloc, es va córrer una petita part (15 µg ) de la fracció en condicions neutres. Es van utilitzar condicions neutres ja que en condicions alcalines la presència d' àcid galacturònic podria provocar la roptura del polímer a través d' un mecanisme de  $\beta$ -eliminació. Es van provar diferents gradients de solució salina. Finalment, es va aconseguir un gradient en que els diferents pics quedaven ben separats. Les condicions utilitzades van ser les següents:

1% d' acetat sòdic, gradient fins al 8% en 30 minuts; del 25% al 28% des del minut 30 fins al minut 70; 100% d' acetat sòdic fins al minut 80.

La Figura 6.3 mostra cromatograma amb la separació dels diferents pics.

**Figura 6.3** Cromatograma obtingut per HPAEC on se separen els oligosacàrids que componen el nucli del LPS. La separació es va realitzar en condicions neutres.

*File: 99031601.D04 Sample: NP09C5 - B01*



Una vegada obtingudes les condicions idònies, es va córrer la mostra corresponent al nucli en una columna preparativa en les mateixes condicions analítiques.

Es van aplicar 42.82mg de mostra i es van obtenir un total de 6 fraccions ja que la fracció A es va poder separar en dos pics donant la fracció A més la fracció F. Cada fracció obtinguda es va purificar per gel-filtració a través d'una columna G-10 per tal d'eliminar el contingut en sals. Per comprovar que cada fracció corresponia al pic descrit inicialment es va recromatografiar una part de cada fracció per comprovar que els temps de retenció per a cada fracció eren els mateixos.

Les quantitats obtingudes per a a cada fracció són les que s'indiquen en la Taula 6.6.

**Taula 6.6** Quantitats obtingudes de les fraccions que componen el nucli del LPS de *S. marcescens* N28b.

<b>FRACCIÓ A:</b> 2.15mg
<b>FRACCIÓ B:</b> 5.28mg
<b>FRACCIÓ C:</b> 3.7mg
<b>FRACCIÓ D:</b> 14.76 mg
<b>FRACCIÓ E:</b> 0,48 mg
<b>FRACCIÓ F:</b> 1.03mg

D'acord amb els quantitats obtingudes, es va decidir analitzar els fraccions A, B, C i D i descartar les fraccions E i F ja que la quantitat obtinguda limitava les anàlisis que es podien realitzar.

## 6.6 Anàlisi quantitativa de les fraccions que componen el nucli del LPS

Les fraccions purificades es van analitzar per Cromatografia de Gasos. Es van quantificar els sucres neutres i els àcids urònics a partir de 250 µg d'oligosacàrid. També es va determinar la concentració de Kdo i GlcN (total-lliure) mitjançant reaccions colorimètriques. Les concentracions obtingudes es mostren en la Taula 6.7.

**Taula 6.7** Composició quantitativa en sucres neutres i àcids urònics de les diferents fraccions.

Conc (nmols /mgOS)	Rha	GalA	Glc	D,D-Hep	L,D-Hep	Kdo	GlcN
fracció A	462,83	405,13	1749,01		1009,11	254,76	198,07
fracció B		558,15	453,94	204,91	839,62	187,98	300,09
fracció C			465,82	209,73	1057,94	179,08	245,98
fracció D		792,80	562,60	254,40	674,13	200,78	225,09

Tal com es pot comprovar en la Taula 6.7, només es va detectar la presència de Rha en la fracció A. Cal destacar que en aquesta fracció no es va detectar D,D-Hep. Les fraccions B,C i D contenen D,D-Hep i, en canvi, no contenen Rha. Aquest fet suggereix que la fracció A podria contenir algunes repeticions d'antigen O (formades per Rha-Glc-1:1-). Les fraccions amb D,D-Hep estarien mancades de repeticions d'antigen O. Aquest resultat reforça la hipòtesi proposada en el cas del nucli de *Yersinia enterocolitica* en què es proposa la regió de D,D-Hep com a antigen ancestral.

## 6.7 Anàlisi per Espectrometria de Masses de les fraccions del nucli

Els oligosacàrids obtinguts per separació per HPAEC es van analitzar per Espectrometria de masses a través del sistema MALDI-MS. Es van analitzar 50 µg de les fraccions A, B, C i D. Les masses moleculars obtingues es mostren en la Taula 6.9 i en la Figura 6.4. L'oligosacàrid més gran correspon a la fracció A, fracció que segons els estudis de composició podria contenir dues repeticions d'antigen O ja que conté dos mols de Rha. El pes molecular d'un oligosacàrid es va calcular sumant les masses moleculars dels monosacàrids més la massa molecular de la molècula d'aigua. El pes molecular dels monosacàrids es mostra en la Taula 6.8 i no inclou la massa d'una molècula d'aigua.

**Taula 6.8** Masses moleculars dels principals monosacàrids no-derivatitzats.

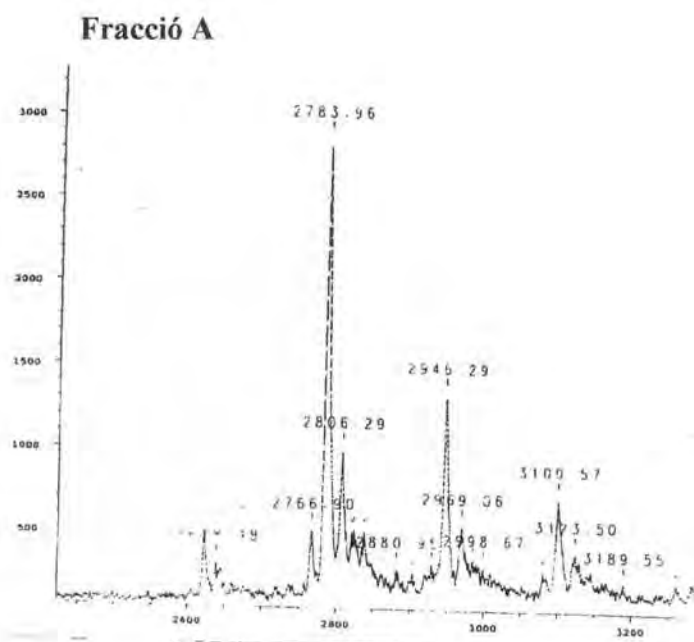
Monosacàrid	Massa molecular del monosacàrid no-derivatitzat
Deoxihexosa C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> Rha	146,05
Hexosamina C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub> GalN, GlcN	161,06
Hexosa C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> Gal, Glc, Man	162,05
Àcid hexurònic C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> GalA	176,03
Heptosa C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub> D,D-Hep, L,D-Hep	192,06
2-ceto-3-deoxioctuloseonat (Kdo) C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	220,05

**Taula 6.9** Masses moleculars obtinguts per les diferents fraccions aïllades del nucli del LPS de *Serratia marcescens*.

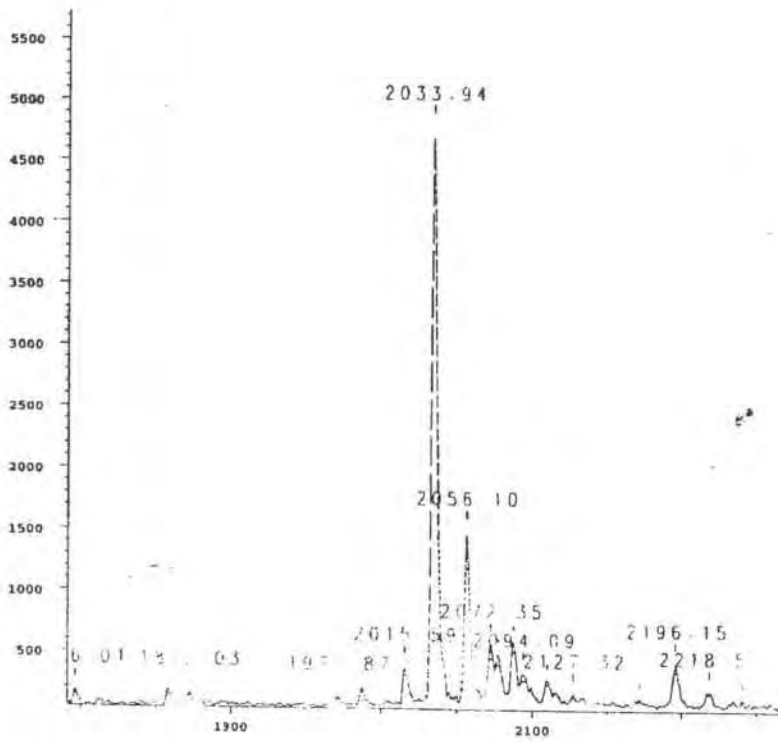
Fracció	Massa molecular obtinguda (Da)	Composició predita	Massa molecular teòrica
A	2783,96	Glc <sub>6</sub> GalA <sub>2</sub> (L,D-Hep) <sub>4</sub> KdoGlcNRha <sub>2</sub>	2783
B	2033,94	Glc <sub>2</sub> GalA <sub>2</sub> D,D-Hep(L,D-Hep) <sub>4</sub> KdoGlcN	2035
C	1872,13	GlcGalA <sub>2</sub> D,D-Hep(L,D-Hep) <sub>4</sub> KdoGlcN	1873
D	2018,67	Glc <sub>2</sub> GalA <sub>3</sub> D,D-Hep(L,D-Hep) <sub>3</sub> KdoGlcN	2019

La composició predita es va fer en funció de les dades de Cromatografia de Gasos, els valors del pes molecular i les dades de RMN. Tot i que la composició de cada fracció és diferent, existeixen relacions entre elles. Per exemple, la diferència entre la fracció B i la C és un residu d'hexosa, possiblement una Glc (segons resultats de Cromatografia de Gasos). La fracció A posseeix una composició força diferent a causa de la presència de residus de Rha, possiblement formant part de dues repeticions d'antigen O. En el cas de la fracció D, no es detecta la presència del quart residu de L,D-Hep. Això suggereix que es podria tractar d'una substitució no-estequiomètrica. El mateix ocorre amb el tercer residu de GalA, només present en la fracció D.

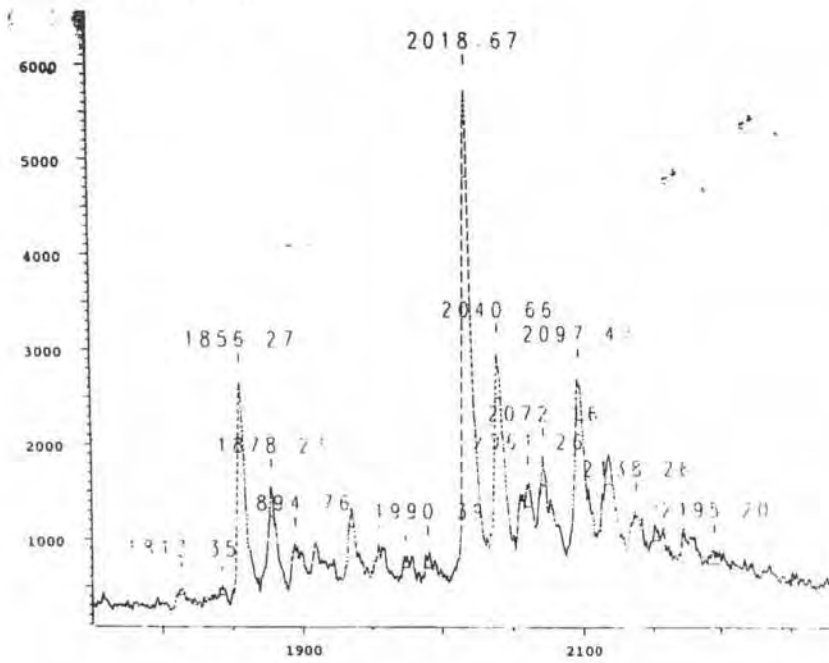
**Figura 6.4** Espectre obtingut per MALDI-MS de les diferents fraccions.



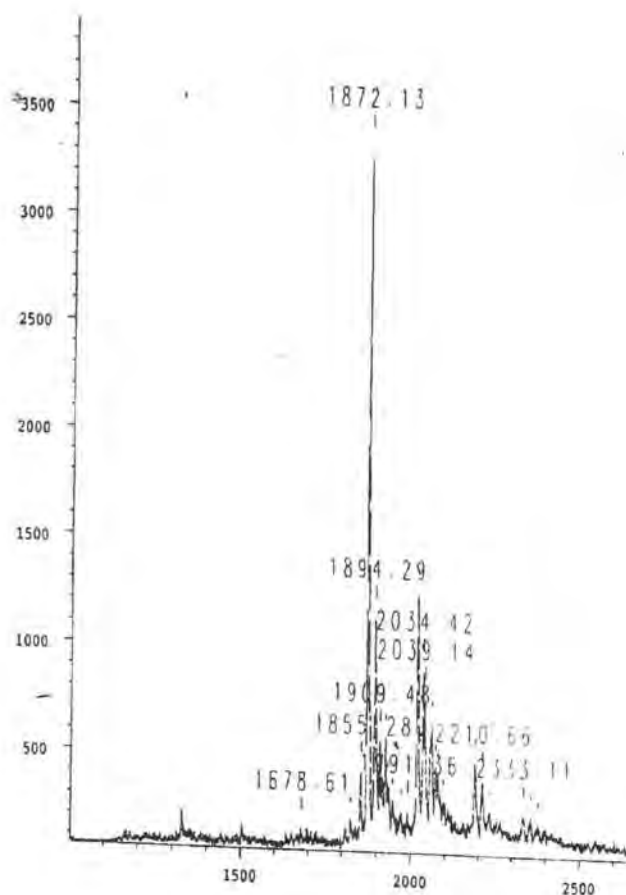
Fracció B



Fracció D



## Fracció C



### 6.8 Anàlisi per RMN

L'anàlisi per RMN d'una sola dimensió va permetre establir el número d'unitats que contenia cada fracció i va permetre identificar-los. Els espectres de RMN- $H^1$  van permetre identificar el H del carboni anomèric de cada sucre. La regió de l'espectre on es apareixen els H corresponents al C anomèric està compresa aproximadament entre 6-4 ppm. També es va poder distingir entre els sucres units amb enllaç  $\alpha$  (regió compresa entre 6-4,7) i els sucres units amb enllaç  $\beta$  (regió compresa entre 4,7-4,3) (el pic que apareix al voltant de 4,7 correspon als H de l'aigua). També es va poder distingir entre els sucres amb configuració *manno* (Heptoses) i els sucres amb configuració *gluco* (

Glc, GlcN, etc.). La configuració *manno* es caracteritza per posseir constants d'acoplament ( $J_{H1-H2}$ ) molt baixes ( $< 1\text{Hz}$ ). La configuració *gluco*, en canvi, es caracteritza per posseir constants d'acoplament ( $J_{H1-H2}$ ) més altes (de 4-9 Hz). En la regió al voltant de 2 ppm es va poder identificar els senyals corresponents als H axials i equatorials del Kdo.

L'espectre de  $^{13}\text{C}$ -RMN va permetre identificar les C anomèrics en la regió entre 90-100 ppm. Els senyals al voltant de 170 ppm són característiques de grups àcids (de Kdo, Ko o àcids urònics) i el senyal a aproximadament 20 ppm és característic del grup  $\text{CH}_3$ - de deoxisucres tals com la Rha.

L'anàlisi per RMN en dues dimensions va permetre establir les interaccions entre els hidrògens d'una mateixa unitat i entre els hidrògens de diferents unitats així com les relacions entre els hidrògens i els àtoms de carboni. Així, els experiments de COSY (Correlated Spectroscopy) aporten informació sobre els hidrògens veïns en una mateixa molècula de sucre. Els experiments de TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) indiquen les relacions entre tots els hidrògens d'una mateixa unitat de sucre. Els experiments de NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy), tant RCT1 com RCT2, aporten informació sobre els hidrògens d'unitats de sucre diferents i, per tant, permeten establir els tipus d'enllaços. Finalment els experiments de HMQC (Heteronuclear multiple quantum coherence) permeten determinar les relacions entre els carbonis i els hidrògens en una mateixa unitat de sucre.

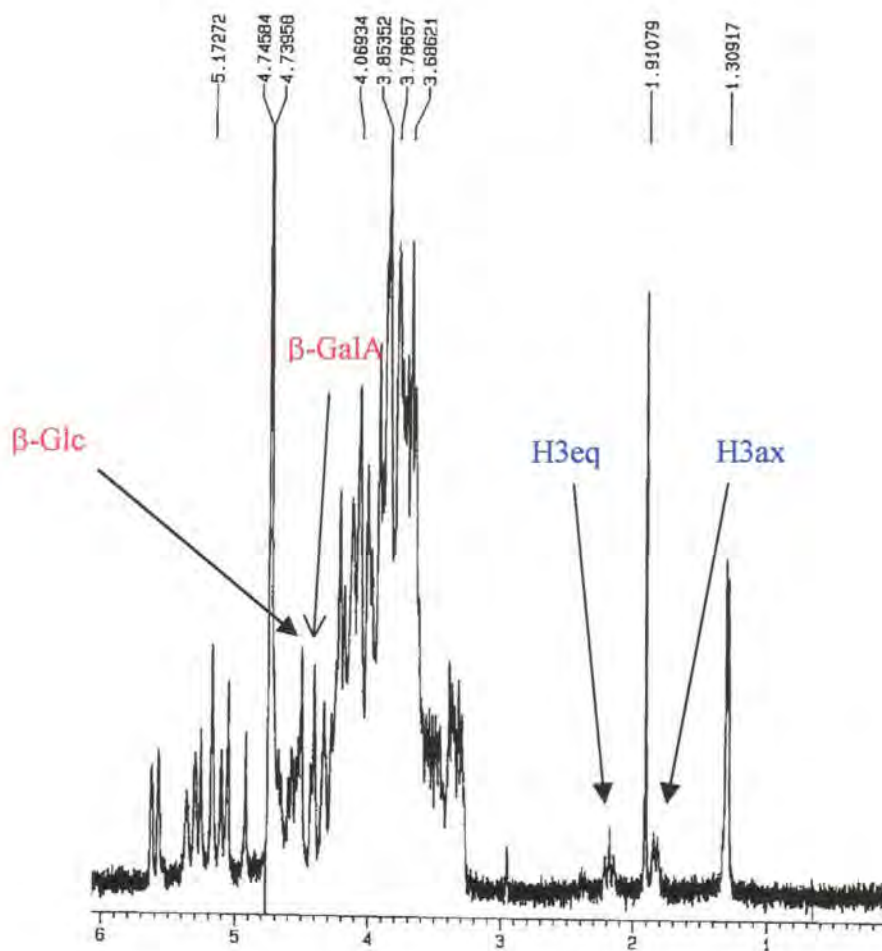
### **6.8.1 Anàlisi de la fracció A**

L'anàlisi per  $^1\text{H}$ -RMN de la fracció A va permetre identificar els senyals característics de l'hidrogen axial i equatorial del Carboni 3 de la unitat de Kdo, situats aproximadament a 2ppm, formant un triplet i un quadruplet característic (Figura 6.5). Per altra banda, es van identificar dos senyals situats a la regió anomèrica  $\beta$ . Aquests dos senyals podrien pertanyen a una Glc (4,5 ppm) i un GalA (4,4 ppm). D'acord amb les dades de cromatografia de gasos i espectrometria de masses, en la regió anomèrica  $\alpha$  es trobarien els senyals corresponents a les Hep,  $\alpha$ -GalA, GlcN, Rha i Glc.



L'espectre de C-RMN de la fracció A va permetre identificar igualment la regió corresponent als carbonis anomèrics (entre 90-100 ppm) i alguns senyals característics: es va poder identificar el carboni 6 de la Rha (-CH<sub>3</sub>) amb una senyal característica a 19,1 ppm. Per altra banda, es van poder identificar 3 senyals característiques entre 160-170 ppm. Aquestes senyals corresponen a grups àcids que, en cas, podrien correspondre al grup carboxil del Kdo i dels dos residus identificats de GalA. Per a la fracció A es van dur a terme experiments de RMN en dues dimensions (NOESY, COSY, TOCSY i HMQC) els espectres dels quals hauran de permetre elucidar els les posicions d'enllaç entre totes les unitats de la fracció A.

Figura 6.5 Espectres de H-RMN de la fracció A.

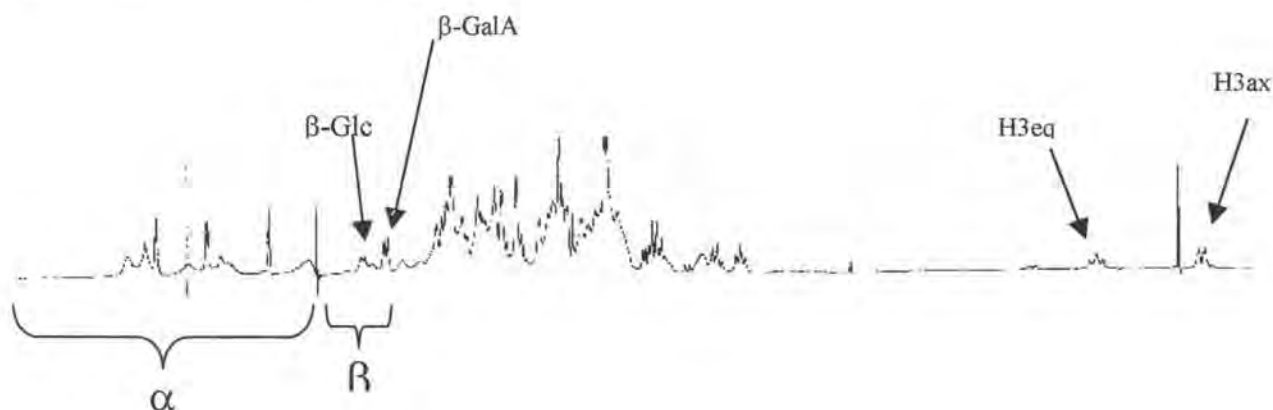


### 6.8.2 Anàlisi de la fracció B

D'acord amb els dades d'Espectrometria de Mases i de Cromatografia de Gasos, l'oligosacàrid corresponent a la fracció B estaria formada per 11 residus de sucres. A través de l'espectre de H-RMN es va poder identificar el residu de Kdo (a 2,15 ppm els H<sub>3</sub> axials i a 3,81 ppm els H<sub>3</sub> equatorials). A l'igual que en fracció A, en la regió anomèrica β es van identificar dues senyals que podrien correspondre a Glc i GalA. Els altres 8 senyals correspondrien a residus amb enllaç α ja que es van identificar en la regió anomèrica situada entre 5 i 5,5 ppm. En la Figura 6.6 es mostren les possibles assignacions de cada pic.

Pel que fa a l'espectre C-RMN, no es va apreciar la presència de la senyal característica del carboni CH<sub>3</sub> de la Rha. Aquesta dada encaixa amb les dades obtingudes per cromatografia de gasos i espectrometria de mases en què no es contempla la presència de Rha en aquesta fracció. Per a la fracció B també es van dur a terme experiments de RMN en dues dimensions.

**Figura 6.6** Espectre de H-RMN de la fracció B.



### 6.8.3 Anàlisi de la fracció C

D'acord amb els dades d'Espectrometria de Masses i de Cromatografia de Gasos, la fracció C contindria un residu de Glc menys que la fracció B.

Aquesta fracció no va ser estudiada mitjançant RMN.

#### ***6.8.4 Anàlisi de la fracció D***

L'espectre de H-RMN de la fracció D conté les senyals característiques dels H del carboni 3 del Kdo. En la regió anomèrica, destaquen dues senyals  $\beta$  que, com en els casos anteriors, podrien pertànyer a un residu de  $\beta$ -Glc i de  $\beta$ -GalA. Pel que fa a l'espectre de C-RMN, destaquen quatre senyals en la regió de 170 ppm que podrien correspondre als grups carboxils de tres residus de GalA i a un residu de Kdo. El tercer residu de GalA, no identificat en les altres fraccions, hauria d'estar unit mitjançant un enllaç  $\alpha$  donat que no s'ha detectat cap senyal addicional en la regió anomèrica  $\beta$ . Els espectres de RMN en dues dimensions hauran d'aportar la informació final per elucidar l'estructura d'aquest oligosacàrid.

# Discussió

---

## 1. EL CLUSTER *waa* DE *Serratia marcescens*. COMPARACIÓ AMB ALTRES *Enterobacteriaceae*

La caracterització de gens implicats en la biosíntesi del nucli de *S. marcescens* ha permès comparar l'organització dels gens d'aquest cluster amb els clusters *waa* descrits, pertanyents a espècies de la família *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *S. enterica* i *K. pneumoniae*). La comparació d'aquestes organitzacions genètiques permet afirmar que existeixen diferències importants entre el cluster *waa* de *S. marcescens* i els clusters d'*E. coli*, *S. enterica* i *K. pneumoniae*. Tot i que el cluster *waa* de *S. marcescens* és més semblant al cluster de *K. pneumoniae* que als clusters d'*E. coli* i *S. enterica*, es pot afirmar que el cluster *waa* de *S. marcescens* és únic quant als gens que el componen i a la seva distribució.

Tot i que el cluster *waa* de *S. marcescens* no s'ha pogut seqüenciar per complet, es poden extreure conclusions sobre la seva organització.

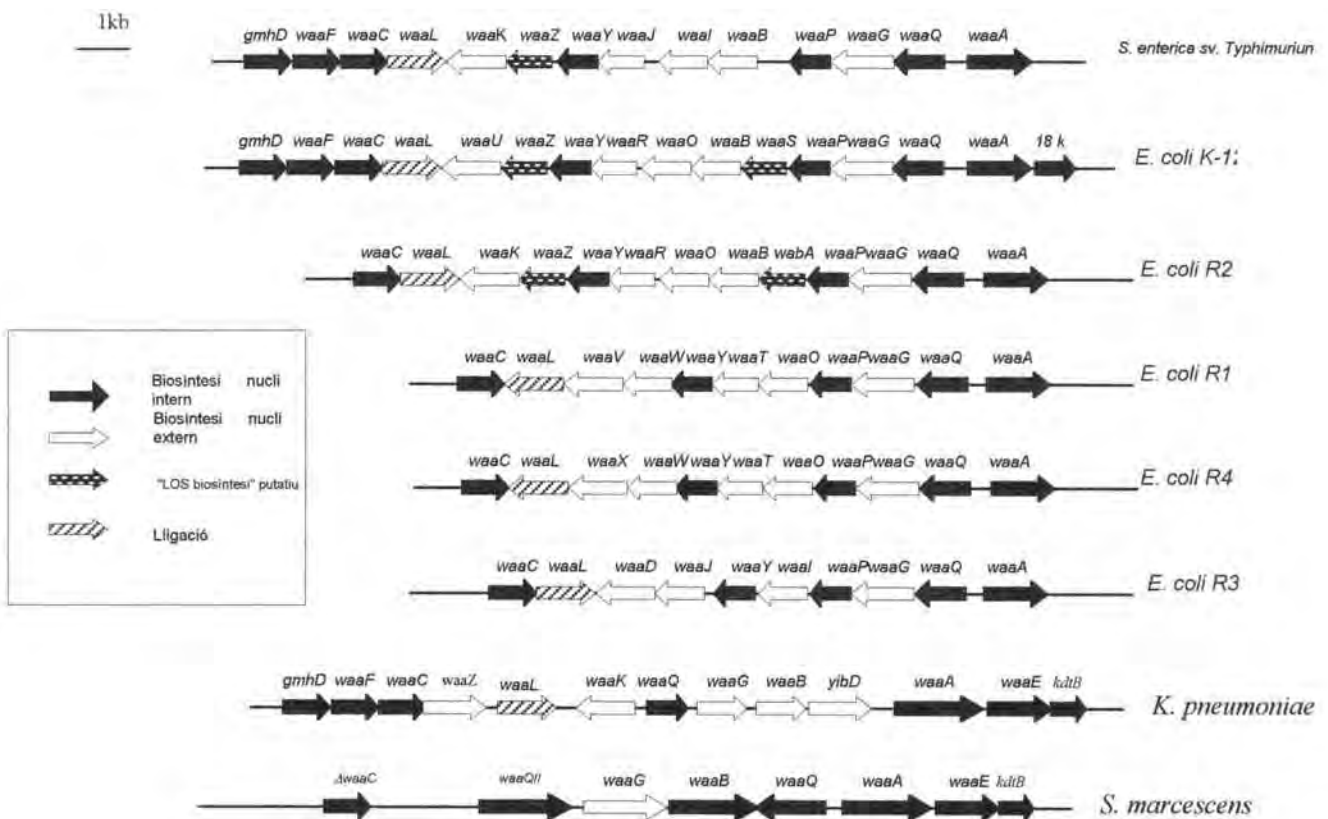
Tal com es mostra en la Figura 1, en *S. enterica* i en *E. coli* K-12, R1, R2, R3 i R4 la distribució genètica és força similar. A diferència d'aquestes espècies, l'operó *waaA* de *S. marcescens* conté 3 gens (*waaA*, *waaE* i *kdtB*). Aquest operó en *E. coli* K-12 està constituït tant sols per *waaA* i *kdtB*. En *S. enterica*, *E. coli* R1, R2, R3 i R4 encara no s'han caracteritzat gens més enllà del gen *waaA*. La presència del gen *waaE* en *S. marcescens* constitueix una diferència important respecte *E. coli* i *S. enterica*. Aquest gen s'ha caracteritzat també en *K. pneumoniae* tot i que en aquesta espècie l'organització genètica és diferent: els gens *waaA*, *waaE* i *kdtB* formen part d'un operó més gran on també hi són presents els gens *waaQ*, *waaG*, *waaB* i *yibD*. Per tant, es pot afirmar que l'operó *waaA* de *Serratia marcescens* és únic. La presència del gen *waaE* constitueix una diferència important, relacionada amb una estructura particular de nucli, i amb repercussions taxonòmiques dins la família de les *Enterobacteriaceae* (Abitiu, Tesi doctoral en preparació). Tot i que molts dels gens caracteritzats en *S. marcescens* i en *K. pneumoniae* presentin nivells d'homologia elevats i, per tant, codifiquin per activitats similars, l'organització genètica en operons diferents suggereix que el mecanisme de regulació de la biosíntesi del nucli podria ser força diferent.

En *S. marcescens*, el gen *waaQ* es transcriu en direcció oposada a l'operó *waaA*. A diferència d'*E. coli* i *S. enterica*, en què s'han trobat seqüències JUMPStart, entre els gens *waaA* i *waaQ* de *S. marcescens* no s'han trobat seqüències similars tal com cal esperar d'un gen monocistrònic. Els gens *waaQII*, *waaG* i *waaB* aparentment formarien

una unitat transcripcional que, en aquest cas, s'assemblaria a l'operó de *K. pneumoniae* format pels gens *waaQ*, *waaG* i *waaB* (Figura 1).

No s'ha pogut identificar cap activitat relacionada amb la biosíntesi del nucli en l'espai intergènic situat entre els gens *waaF* i *waaQII*. No es descarta la possibilitat que es pugui identificar una ORF que pogués codificar per a una activitat lligasa. La seqüenciació completa del gen *waaF* haurà de donar més informació sobre possibles similituds del seu producte gènic ja que les heptosil transferases formen un grup de proteïnes relacionades i, per tant, és difícil establir si es tracta de l'heptosil transferasa I o de l'heptosil transferasa II.

**Figura 1.** Organització genètica de la regió involucrada en la biosíntesi del LPS en *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae* i *S. marcescens*.



## 2. EL GEN *waaE*

L'estudi del LPS produït per la soca recombinant d'*E. coli* que expressa el gen *waaE* (NM554 pWSK1848) va constituir l'últim pas de l'anàlisi després d'haver estudiat els LPS de soques recombinants que expressaven més d'un gen *waa* de *S. marcescens*.

Tal com es pot observar en la Taula 2, tots els LPS de les soques recombinants estudiades presentaven diferències en la composició de sucres neutres i Kdo respecte el LPS de la soca control NM554. Tot i així, és difícil interpretar aquestes diferències en tant que les soques recombinants expressen més d'un gen implicat en la biosíntesi del LPS i, a més, es desconeix el nivell d'expressió de cadascun d'aquests gens en els diferents plàsmids que els transporten.

**Taula 2.** Composició del LPS de diferents soques d'*E. coli* NM554 que transporten plàsmids amb gens *waa* de *S. marcescens*.

	<b>Glc</b> (nmols/mgLPS)	<b>Hep</b> (nmols/mgLPS)	<b>Kdo</b> (nmols/mgLPS)
NM554 pSK	208,70	358,70	150,98
NM554 pNP9	384,35	1492,96	267,46
NM554 F41	450,89	1650,98	230,76
NM554 pWSK1848	287,64	304,55	473,00

L'augment de Glc observat en els LPS de les soques NM554 pNP9 i NM554 F41 aporten informació sobre els canvis produïts però no es poden atribuir aquests canvis a un gen en concret. Sorprenentment, la soca que expressa exclusivament el gen *waaE* (NM554 pWSK1848) no produeix un LPS amb modificacions importants. Només una petita fracció del LPS conté canvis respecte el LPS de la soca control (un oligosacàrid amb l'absència d'un grup fosfat i la presència d'un residu de  $\beta$ -Glc). Això podria indicar que l'expressió i la funció vinculada a aquest gen requereix la presència del promotor de l'operó de què forma part a la soca salvatge i, possiblement, també necessita dels productes dels altres gens de *S. marcescens*.

Aquest fet, però, sembla no influir en la soca de *Salmonella enterica* amb un LPS Rd1. En aquest cas l'expressió del gen *waaE* en el mateix plàsmid produeix canvis més importants en el LPS d'aquesta soca. Això podria suggerir que el diferent grau de fosforilació del LPS de la soca on s'expressa aquest gen podria influir en l'activitat de la proteïna WaaE. La soca d'*E. coli* NM554 conté grups fosfats a nivell de l'HepI i

l'HepII. En aquest cas, l'activitat de la proteïna WaaE podria haver de competir amb els enzims encarregats de transferir grups fosfats (WaaY i WaaP). L'absència de grups fosfats en la soca de *Salmonella* permetria la transferència d'un residu de Glc mediada per la proteïna WaaE. Els estudis sobre diferents soques de *Salmonella* demostren que el gen WaaE es capaç d'introduir modificacions en el LPS a partir d'un substrat constituït com a mínim per l'estructura Rd1. És a dir, requereix dels dos residus d'Hep per tal de poder produir modificacions. El gen *waaE* expressat en mutants amb un LPS de tipus Re (amb només els residus de Kdo) i Rd2 (amb els residus de Kdo i un residu d'Hep) no produeix cap modificació a nivell del LPS. Cal tenir en compte també que la soca d'*E. coli* NM554 posseeix un LPS de tipus Rc (amb un residu de Glc unida a l'HepII). Aquest substrat també podria influir en l'acció de la proteïna WaaE. Els efectes observats en la soca NM554, tot i que en una proporció baixa, són indicatius d'una activitat relacionada amb la biosíntesi d'un LPS característic del "subgrup" d'*Enterobacteriaceae* constituït per *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *Yersinia* i *Proteus*. L'absència d'un grup fosfat i d'un residu unit per enllaç  $\beta$  en una fracció del LPS de la soca que expressa el gen *waaE* i la presència de 1,3,4,5-tetraacetil-Hep en estudis de permetilació suggereixen que aquesta proteïna pot desenvolupar un paper important en la biosíntesi d'un LPS desprovist de grups fosfats i amb un residu de  $\beta$ -Glc a nivell de l'HepI.

En definitiva, tot apunta que el gen *waaE* podria codificar per a una glucosil transferasa que, tant en *S. marcescens* com en *E. coli* i *S. enterica*, actuaria a nivell del nucli intern del LPS transferint un residu de Glc a nivell de l'HepI a través d'un enllaç  $\beta(1\rightarrow4)$ .

### 3. FENOTIP DE RESISTÈNCIA A LA BACTERIOCINA 28b

S'han descrit nombrosos casos en què una determinada modificació estructural en el LPS comporta fenotips de resistència a antibiòtics, proteïnes, bacteriòfags i també al sèrum. En el cas de la bacteriocina 28b, es coneix que l'expressió de gens *wb* de *S. marcescens* en *E. coli* (Rubires, 1997 i Saigi, 1999), de gens que codifiquen per a proteïnes de membrana externa, tant de *S. marcescens* (Omp4) com de *K. pneumoniae* (Climent, 1997), o bé de gens *waa* de *S. marcescens* (present treball) i de *K. pneumoniae* (Climent, Tesi doctoral, 2000) confereixen resistència a la bacteriocina.



Fins i tot, s'ha demostrat que l'expressió d'algun gen implicat en la biosíntesi del lípid A, en aquest cas d'*Aeromonas*, pot conferir també resistència a la bacteriocina 28b en *E. coli* (Sánchez, Tesi doctoral en preparació). Aquest fenomen de resistència es pot explicar en tant que l'alteració de components que constitueixen la membrana externa d'*E. coli* provoquen una alteració en l'expressió i disposició dels receptors de la bacteriocina 28b, les proteïnes OmpA i OmpF (Enfedaque, 1995).

En el cas del nostre treball, s'ha intentat esbrinar el mecanisme implicat en la resistència a la bacteriocina en *E. coli* mediada pel nucli del LPS. La construcció de subclons portadors de gens *waa* en la soca d'*E. coli* NM554 ha permès seleccionar el gen responsable per al fenotip de resistència. Així, l'expressió del gen *waaE* en la soca NM554 confereix un fenotip de resistència parcial a la bacteriocina 28b. Tot i això, no es pot afirmar que aquest gen sigui l'únic implicat en aquest fenotip ja que l'expressió de l'operó sencer més els gens *waaB* i *waaQ* confereix també un fenotip de resistència. Els estudis mitjançant mutagènesi amb miniTn5 no han permès aclarir aquest punt ja que només va ser possible aconseguir mutants en els gens *waaB* i *waaA*. Els mutants en el gen *waaB* no van canviar el fenotip de resistència i sí que ho van fer els mutants en el gen *waaA*. Tot i que no es descarta que la proteïna WaaA pogués contribuir a aquest fenotip, tot apunta que aquesta mutació pot haver tingut efectes polars sobre l'expressió de la resta de gens de l'operó (*waaE* i *kdtB*). Per altra banda, es pot debatre si les condicions de creixement poden afectar els nivells de resistència a la bacteriocina 28b. Diferents extraccions de LPS de la soca NM554 que transporta el gen *waaE* han donat diferències en l'anàlisi del LPS (diferents quantitats en el pic diferent entre la soca control i la soca recombinant). No es pot descartar tampoc que els gens distals puguin influir en l'expressió dels gens *waa* ja que la soca que transporta el còsmid original presenta els nivells de resistència a la bacteriocina més elevats.

L'absència d'un grup fosfat en una fracció del LPS de la soca NM554 que transporta el gen *waaE* i la presència d'un residu de  $\beta$ -Glc unit a l'HepI podria explicar el nivell de resistència a la bacteriocina observat en aquesta soca. L'absència de grups fosfats i, per tant, la disminució de les càrregues negatives en el LPS pot afectar la disposició del LPS en la membrana externa i en la disposició i expressió de les proteïnes de membrana externa implicades en la recepció de la bacteriocina 28b ( la proteïna OmpA i la porina OmpF). La disminució d'aquestes proteïnes s'ha observat també en mutants d'*E. coli* i *Salmonella* que presenten l'anomenat fenotip *deep-rough* (Schaitman i Klena, 1993; Raetz, 1996). Es tracta d'un fenotip pleiotròpic en què s'ha observat un increment de la

relació fosfolípids/proteïnes en la membrana externa i una hipersensibilitat a compostos hidrofòbics. Aquest fenotip està vinculat a l'absència de residus d'Hep en el nucli intern i/o de grups fosfats. Per tant, la disminució de grups fosfats en soques recombinants d'*E. coli* podria provocar, en certa manera aquest fenotip, i per tant, la disminució de receptors de la bacteriocina 28b en la membrana externa.

#### **4. COMPOSICIÓ DEL NUCLI DE *S. marcescens*. COMPARACIÓ AMB ALTRES *Enterobacteriaceae***

Tot i que l'estructura final del nucli del LPS de *Serratia marcescens* N28b no ha pogut ser elucidada, les dades prèvies presentades en aquesta tesi permeten extreure una sèrie de conclusions que poden ser útils de cara a:

- l'elucidació final de l'estructura.
- l'estudi de diferents mutants del gens *waa* caracteritzats en aquesta tesi.
- l'estudi comparatiu de diverses espècies bacterianes dintre de la família de les *Enterobacteriaceae*.
- l'anàlisi química d'altres LPS. Donada la diversitat de sucres presents en aquest LPS pot ser utilitzat com a control positiu, de composició establerta, a l'hora d'analitzar altres LPS.

La baixa expressió de l'antigen O observat en el creixement a gran escala d'aquesta soca és una de les incògnites que, fins al moment, encara no ha estat resolta. Factors com la temperatura de creixement, l'inòcul, la composició de cultiu o l'osmolaritat poden haver influït en l'expressió de l'antigen O. Estudis no-publicats sobre l'expressió de l'antigen O en *Serratia marcescens* ja havien posat de manifest les diferències d'expressió en funció de factors com la temperatura o l'osmolaritat. Aquests estudis també s'han realitzat en altres espècies com és el cas de *Yersinia enterocolitica* (Skurnik, 1996; al-Hendy, 1991) o en *Aeromonas hydrophila* (Merino, 1998).

La presència de tan sols dues repeticions d'antigen O en un dels oligosacàrids del nucli analitzats i la presència de residus de D,D-Hep en els oligosacàrids que no posseïen antigen O obre nous camins d'estudi sobre la regulació de la biosíntesi del nucli i de l'antigen O i també sobre el possible origen dels residus de D,D-Hep.

El nucli del LPS estudiat comparteix trets característics amb els nuclis de les *Enterobacteriaceae*. Tot i així, els estudis realitzats permeten afirmar que el nucli de *Serratia marcescens* podria pertànyer al "subgrup" de les *Enterobacteriaceae* que,

atenent a la composició del nucli intern del LPS, estaria format per *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp i *Yersinia enterocolitica*. Els nuclis del LPS d'*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* i *Shigella* constituïrien l'altre "subgrup". El nucli del LPS del primer "subgrup" es caracteritzaria per:

- l'absència de grups fosfats.
- la presència de residus de GalA.
- la presència de residus de D,D-Hep.
- la presència de d'un residu de Glc unida per enllaç  $\beta(1\rightarrow4)$  al primer residu d'Hep del nucli intern.
- presència d'aminosucres (GlcN, GlcNAc, GalN, GalNAc).

La recent caracterització del nucli de *Proteus mirabilis* O3 (Vinogradov, 2000) i *Proteus vulgaris* O2 (Vinogradov, 1999) presenta altres trets interessants com la presència de AraN unida al Kdo. La presència de fosfat unit al residu d'Hep II en el nucli intern d'aquestes dues soques obre un nou debat sobre els trets característics d'aquest "subgrup" i sobre les hipòtesis de l'equilibri de càrregues negatives en el nucli del LPS. S'ha trobat també un grup fosfat en proporcions no-estequiomètriques unit a l'Hep III en *Yersinia enterocolitica* O:3.

El residu d'AraN en el nucli s'ha detectat només en *Proteus* i en el nucli de la soca O:29 de *Serratia marcescens* (Holts, resultats no-publicats). En aquesta soca, també s'ha detectat la presència d'un sucre poc habitual com és el Ko (àcid D-manno-octulosònic). Estudis per Cromatografia de Gasos acoblada a Espectrometria de Masses de la fracció del nucli del LPS de *Serratia marcescens* 28b no van detectar ni AraN ni Ko. Els residus de AraN s'han detectat majoritàriament com a constituents del lípid A en *K. pneumoniae* ( Helander, 1996), *S. enterica* (sv. Minnesota) (Rietschel, 1982 ) i en *Yersinia pestis* (Dalla Venezia, 1985 ). L'AraN unida al lípid A confereix resistència a la Polimixina en *S. enterica* i també en *Serratia marcescens* O:29, on també s'ha detectat la presència d'AraN en el lípid A (Holst, resultats no-publicats).

La variabilitat observada en el nucli del LPS de les *Enterobacteriaceae* es dona principalment en la regió externa del nucli (el que en *Salmonella* i *E. coli* s'anomena nucli extern). En el "subgrup" on s'englobaria *Serratia marcescens*, aquest fet també es produeix. La regió interna del LPS es troba força conservada. (Taula 4.2). Exceptuant, la presència excepcional dels grups fosfats i de residus d'AraN, el nucli intern d'aquestes espècies estaria constituït per:

•dues molècules de Kdo (en alguns casos només s'ha descrit una molècula de Kdo perquè el procediment utilitzat per analitzar el LPS hidrolitza el segon residu de Kdo). En casos excepcionals, el Kdo central podria estar unit a AraN i/o Ko.

•tres residus de L,D-Hep en la mateixa disposició que en el nucli de *E. coli* i *Salmonella*. En la majoria dels casos no estan unides a grups fosfats. En el cas de *Proteus mirabilis* O:27 (Vinogradov, 1999) i *Proteus mirabilis* O:3 (Vinogradov, 2000), el tercer residu d'Hep (Hep III) estaria unit a un residu de GalA mitjançant un enllaç  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 7). La presència de GalA podria contrarestrat la manca de càrregues negatives que confereix l'absència de grups fosfats.

•presència de Glc unida a l'Hep I per enllaç  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4). Aquesta és una característica comuna a totes les espècies d'aquest "subgrup". Ara bé, aquest residu pot estar no-substituït (*Proteus vulgaris* O:2 i *Yersinia enterocolitica*) o bé unit altres residus, habitualment a GalA, per enllaç  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6) en *Klebsiella pneumoniae* i per enllaç  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6) en *Proteus mirabilis* O:27. Suposadament, els grups GalA units a la Glc aportarien les càrregues negatives que, en el cas d'*E. coli* i *S. enterica*, estan aportades pels grups fosfat. En el cas de *Yersinia enterocolitica* O:3 i O:9, es troba un altre residu de Glc unit a l'Hep II a través d'enllaç  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4). En aquests serotips, destaca també la unió d'un residu de D,D-Hep directament sobre l'Hep III.

Els resultats de composició obtinguts en el cas de *Serratia marcescens* N28b apunten cap a un nucli intern similar al descrit en aquest subgrup. Donat que la presència d'àcids urònics en els oligosacàrids impedeix un mètode d'hidròlisi que mantingui el nucli sencer amb els residus de GlcN (hidrazinolisi), es va utilitzar la hidròlisi amb àcid acètic al 1%. Aquesta hidròlisi, a més de trencar l'enllaç glicosídic entre el residu de Kdo i GlcN, també hidrolitza les unions entre Kdo. Per tant, els oligosacàrids analitzats només contenien un residu de Kdo. Ara bé, l'anàlisi quantitatiu del LPS sencer mitjançant reaccions colorimètriques va posar de manifest la presència de dos residus de Kdo. Aquests dos residus no estarien substituïts ni per AraN ni per Ko.

L'anàlisi de les diverses fraccions va posar de manifest la presència de tres residus de L,D-Hep en totes les fraccions i un quart residu de L,D-Hep, que estaria en el nucli en proporcions no-estequiomètriques. Aquestes dades, suggereixen que el nucli intern estaria format pels tres residus de L,D-Hep. El quart residu de L,D-Hep podria estar situat en el nucli extern, atenent a altres nuclis. En concret, el nucli de *Proteus vulgaris*

O:2 conté un residu de L,D-Hep en el nucli extern, unit per enllaç  $\alpha(1\rightarrow 2)$  a un residu de D,D-Hep (Taula 4.1).

Sembla que en *Serratia marcescens* 28b existeix el residu característic de Glc unit per enllaç  $\beta(1\rightarrow 4)$ . En principi, segons les senyals de H-RMN, només existiria un residu de Glc unit per aquesta mena d'enllaç. S'ha proposat l'altre residu que presentaria enllaç  $\beta$  com a GalA, que podria estar unit al residu de Glc. Així, aquesta distribució s'assemblaria al nucli de *K. pneumoniae* i, en canvi, diferiria de *Yersinia enterocolitica*, *Proteus vulgaris* O:2 i *Proteus mirabilis* O:3. En *Proteus mirabilis* O:27, curiosament, existeix un residu de GalA unit a la Glc però a través d'enllaç  $\alpha(1\rightarrow 4)$ . L'altre residu de GalA detectat en totes les fraccions de nucli en *S. marcescens* posseiria enllaç  $\alpha$  i possiblement estaria unit a l'Hep II. Aquesta és una de les característiques d'aquest "subgrup": la presència de GalA en lloc de Glc a l'inici del nucli extern. S'ha detectat en totes les soques (excepte en *Yersinia enterocolitica* ja que no s'ha estudiat el nucli sencer de la soca amb antigen O. Només s'han analitzat mutants R).

La presència en *S. marcescens* d'un tercer residu de GalA en concentracions no estequiomètriques encaixa amb els nuclis de *Proteus mirabilis* O:3 i O:27 en què s'ha detectat un tercer residu de GalA unit a l'HepIII.

La presència d'aminosucres constitueix una altra característica d'aquest "subgrup". En els estudis realitzats s'ha detectat GlcN. S'ha descrit un residu de GlcN en el nucli extern de *P. mirabilis* O:3 i de *K. pneumoniae* O:1. El residu de GlcN en aquests dos casos es troba situat en la regió terminal del nucli extern, abans de la regió de les D,D-Hep (Taula 4.1).

La presència d'un segon residu de Glc en *S. marcescens* unida per enllaç  $\alpha$  encaixaria amb el residu de Glc detectat en la *K. pneumoniae* O:8. S'ha detectat en *Proteus mirabilis* un segon residu de Glc però unit per enllaç  $\beta$  en la regió terminal del nucli (Taula 4.1).

La presència d'un residu de D,D-Hep en totes les fraccions menys en la fracció que presentava repeticions d'antigen O suggereix que ha d'estar situat en la regió terminal del nucli del LPS. La presència de D,D-Hep impediria a la lligasa catalitzar la unió entre el nucli i l'antigen O. En la majoria dels casos, els residus de D,D-Hep estan situats en l'última posició (en *K. pneumoniae* O:1, en *Yersinia enterocolitica* i *Proteus mirabilis* O:3). En el cas del nucli de *K. pneumoniae* O:8, no s'ha detectat la presència de D,D-Hep.

Com a conclusió, es pot dir que les dades prèvies de què es disposa engloben el nucli de *S. marcescens* dins el "subgrup" format per *Klebsiella*, *Proteus* i *Yersinia*. Dins aquest "subgrup", el nucli de *S. marcescens* manté més similituds amb el nucli de *Klebsiella*.

A partir de l'anàlisi realitzat i de les dades genètiques obtingudes és possible suggerir algunes funcions als productes dels gens caracteritzats. En primer lloc, està establert que el gen *waaA* (Guasch, 1996) posseeix un nivell elevat d'homologia amb el gen *waaA* d'*E. coli*. La proteïna WaaA d'*E. coli* és un enzim bifuncional (Belunis, 1992), capaç de transferir els dos residus de Kdo. Per tant, aquest enzim és capaç de reconèixer dos tipus de substrats diferents. Per una banda reconeix el precursor del lípid A, lípidA IV<sub>A</sub>, al qual transfereix el primer residu de Kdo i, en segon lloc, reconeix, el substrat lípidIV<sub>A</sub>-Kdo. Donat el nivell elevat de similitud i identitat de les dues proteïnes és possible que els dos residus de Kdo detectats en el nucli del LPS de *S. marcescens* siguin transferits per l'enzim WaaA. S'ha proposat que l'ORF caracteritzada com a *kdtB* i de la qual no es coneix la funció podria estar involucrada també en la transferència d'algun residu de Kdo. La transferència del residu d'AraN unit al Kdo en *Proteus* i *S. marcescens* O:29 roman encara com a una incògnita.

Quant a la biosíntesi de la regió de les heptoses del nucli intern, només s'han pogut caracteritzar dues ORF com a heptosil transferases i totes dues codifiquen per a proteïnes amb similitud elevada amb la proteïna WaaQ (Heptosil transferasa III) d'*E. coli* i *S. enterica*. Per altra banda, les heptosil transferases, de totes les espècies on s'han caracteritzat, presenten un cert grau de similitud entre elles. La caracterització d'una nova heptosil transferasa (*waaQII*) obre noves vies d'estudi. La presència d'un quart residu de L,D-Hep tant en *S. marcescens* com en *Proteus vulgaris* O:2 podria estar vinculada a l'activitat d'aquest producte gènic que de moment només s'ha caracteritzat en *S. marcescens*. La detecció d'una ORF incompleta que sembla codificar per a una altra heptosil transferasa (WaaF) aporta nova informació sobre la biosíntesi de la regió de les heptoses. La finalització de la seqüenciació del cluster *waa* de *S. marcescens* hauria de permetre caracteritzar una ORF que codifiqués per a l'heptosil transferasa I (WaaC).

La presència del residu de  $\beta$ -Glc en el nucli s'ha relacionat amb la caracterització del gen *waaE*, gen que només s'ha detectat en *Serratia*, *Klebsiella* (Climent, Tesi doctoral, 2000), *Proteus* i *Yersinia* (Abitiu, Tesi doctoral en preparació). El fet que l'expressió del gen *waaE* provoqui canvis importants en mutants en *E. coli* i en *Salmonella* indica

que aquesta activitat juga un paper important en la biosíntesi del nucli en aquestes quatre espècies que, en aquest sentit, es diferencien de la resta de *Enterobacteriaceae*.

La clau per establir la funció d'aquest gen en *S. marcescens* recau en l'anàlisi química del mutant *waaE* (Coderch, Tesi doctoral en preparació) i en la purificació d'aquest enzim i l'estudi del substrat sobre què pot actuar.

Els residus de GalA constitueixen una altra característica d'aquest subgrup. El residu que s'ha descrit en *K. pneumoniae*, *Proteus* (i molt possiblement en *Serratia*) unit a la  $\beta$ -Glc ofereix noves propostes d'estudi (Taula 4.2) D'acord amb els resultats obtinguts després de comparar els gens *waaB* i *waaG* amb els seus homòlegs, les proteïnes WaaB i WaaG en *Serratia* i *Klebsiella* podrien dur a terme una funció diferent a la descrita en *E. coli* o *Salmonella* (La proteïna WaaG està descrita com a glucosil transferasa i la proteïna WaaB com a galactosil transferasa). Aquesta hipòtesi es basa en els baixos nivells de similitud amb les proteïnes d'*E. coli* i *Salmonella* i amb l'alta similitud presentada amb les proteïnes de *Klebsiella* (WaaB i WaaG). Per tant, es podria tractar de GalA transferases involucrades en la transferència del residu lateral de GalA i també del residu de  $\alpha$ -GalA del nucli extern. En *Pseudomonas aeruginosa* s'ha caracteritzat un gen que presenta homologia amb els gens *waaB* i *waaG* d'*E. coli* i *S. enterica* i, en canvi, presenta nivells més baixos respecte els homòlegs de *S. marcescens*. La proteïna WaaG en *Pseudomonas aeruginosa* podria transferir un residu de GalN a l'HepII. L'estudi químic dels mutants *waaB* i *waaG* de *S. marcescens* poden aclarir aquesta hipòtesi.

Pel que fa a la resta de residus, es desconeix l'activitat que podria afegir residus de D,D-Hep, de la mateixa manera que es desconeix el mecanisme implicat en la regulació de la seva transferència al nucli. Tampoc es coneixen activitats relacionades amb la transferència d'aminosucres (en aquest cas de GlcN) ni tampoc de residus de Glc situades en el nucli extern. La finalització de la seqüenciació del cluster *waa* de *S. marcescens* resoldrà, amb tota seguretat, algunes d'aquestes qüestions.

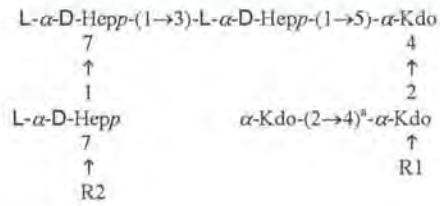
**Taula 4.1** Estructura del nucli del LPS de *K. pneumoniae*, *Proteus* i *Yersinia enterocolitica*.

ESPÈCIE	ESTRUCTURA DEL NUCLI DEL LPS			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R → 4)-α-D-GalpA-(1→3)-L-α-D-Hep-(1→3)-L-α-D-Hep-(1→5)-α-Kdo			
	7	4	4	
	↑	↑	↑	
	1	1	2	
	L-α-D-Hep	β-D-Glep	Kdo	
		6		
		↑		
		1		
		β-D-GalpA		
RFK11 (O:8 <sup>-</sup> )	R = α-D-Glep-(1→			
R20 (O:1 <sup>-</sup> )	R = D-α-D-Hep-(1→2)-D-α-D-Hep-(1→2)-D-α-D-Hep-(1→2)-D-α-D-Hep-(1→6)-α-D-GlepN-(1→			
<i>Proteus mirabilis</i> O:27	β-Gal-(1→7)-α-DD-Hep-(1→2)-α-D-GalA-(1→3)-L-α-Hep-(1→3)-L-α-Hep-(1→5)-α-Kdo			
	4	7	4	4
	↑	↑	↑	↑
	1	1	1	2
	α-GalN	α-D-Hep	β-D-Glc	α-Kdo7P
	4	7	4	
	↑	↑	↑	
	1	1	1	
	GalNAc	β-D-GalA	α-GalA	
	5			
	↑			
	1			
	β-Glc			
<i>Proteus mirabilis</i> O:3 R110/1959	D-α-D-Hep-(1→6)-α-D-GlcN-(1→4)-α-D-GalA-(1→3)-L-α-Hep6PEtN-(1→3)-L-α-Hep-(1→5)-α-Kdo			β-L-AraN
	2	7	4	1
	↑	↑	↑	↓
	1	1	1	8
	α-D,D-Hep	α-D-Hep	β-D-Glc	α-Kdo
		7		
		↑		
		1		
		β-D-GalA		
<i>Proteus vulgaris</i> O:2	α-Hep-(1→2)-α-D,D-Hep-(1→2)-α-GalA-(1→3)-L-α-Hep6PEtN-(1→3)-L-α-Hep-(1→5)-α-Kdo			β-L-AraN
	4	7	4	1
	↑	↑	↑	↓
	1	1	1	8
	α-GalN	α-D-Hep	β-D-Glc	α-Kdo
	4			
	↑			
	1			
	GalNAc			
	4			
	↑			
	1			
	β-Gal			
<i>Yersinia enterocolitica</i> Ye75R O:3	L-α-D-Hep-(1→7)-L-α-D-Hep-(1→3)-L-α-D-Hep-(1→5)-α-Kdo			
	7	2	4	
	↑	↑	↑	
	1	1	1	
	D-α-D-Hep	β-D-Glc	β-D-Glc	
	7			
	↑			
	P (40%)			
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	L-α-D-Hep-(1→7)-L-α-D-Hep-(1→3)-L-α-D-Hep-(1→5)-α-Kdo			
	7	2	4	4
	↑	↑	↑	↑
	1	1	1	2
	D-α-D-Hep	β-D-Glc	β-D-Glc	α-Kdo



**Taula 4.2** Estructures del nucli intern dins de les *Enterobacteriaceae*. Distinció entre *E. coli* / *Salmonella* / *Shigella* i *Klebsiella* / *Proteus* / *Yersinia* / *Serratia*

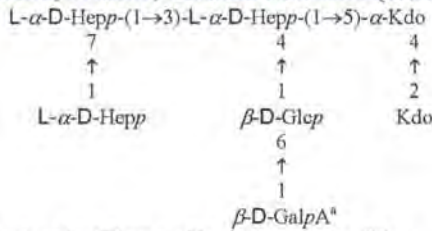
**Nucli intern d'*E. coli*, *Salmonella* i *Shigella***



**R1**=Rha en les soques d'*E. coli* W3100 i W3110

**R2** = $\alpha$ -D-GlcNAc en la soca R3 d'*E. coli* i  $\alpha$ -D-GlcN en la soca R1 d'*E. coli* i en *Shigella*

**Nucli intern de *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia* i *Serratia* (estructura proposada)**



a: el residu de GalA no s'ha identificat en *Yersinia enterocolitica*

## 5. ANÀLISI MUTACIONAL

El nucli del LPS constitueix un receptor per a determinats bacteriòfags. Aquest fet ha permès obtenir mutants del LPS, deficients en antigen O i en alguna part del nucli del LPS (Boman, 1975). La resistència a determinats bacteriòfags ha servit també de mètode de selecció per localitzar diferents mutants generats per insercions amb transposons (Austin, 1990). En *E. coli*, mutacions en diferents gens *waa* han donat lloc a resistència a bacteriòfags. Per exemple, una mutació en el gen *waaG* dona lloc a resistència al bacteriòfag U3 (Parker, 1992) i al fenotip caracteritzat com a *deep-rough* associat a la hipersensibilitat a la Novobiocina, pèrdua de flagell, pili i amb un morfologia colonial mucosa. Així mateix, recentment s'ha obtingut un mutant d'*E. coli* resistent al bacteriòfag K-20. Aquesta mutació ha estat complementada pel gen *waaB* d'*E. coli* (Traurig, 1999).

En el cas de *S. marcescens*, s'han aïllat fags lítics en el cas del serotip O:8 (2170) i, en canvi, en el cas de *S. marcescens* N28b (O:4) només s'han pogut aïllar fags lisogènics. Només en el cas del serotip O:8 s'ha pogut obtenir un mutant R. Per tant, els mutants en

gens *waa* de *S. marcescens* N28b s'estan obtenint mitjançant mutagènesi per recombinació (Coderch, tesi doctoral en preparació).

La complementació del mutant de la soca 2170 amb el gen *waaG* de *S. marcescens* N28b indica que aquest gen és necessari per a sintetitzar un LPS capaç de servir de receptor a la sèrie de bacteriòfags aïllats. Tot i que no es disposa de dades químiques sobre el nucli del LPS de *S. marcescens* 2170, és d'esperar que contingui residus de GalA que podrien ser transferits pel gen *waaG*. Tot i que la proteïna WaaG de *Serratia* presenta nivells de similitud força baixos amb la proteïna WaaG d'*E. coli*, és possible que la seva absència pugui provocar un fenotip *deep-rough* similar en els dos casos. En els dos casos, es generaria un LPS mancat de nucli extern que podria produir efectes en la membrana externa i, per tant, podria repercutir en la recepció de bacteriòfags.

Aquest mutant podria ser estudiat a nivell químic i a nivell biològic (resistència a detergents, habilitat de créixer en macròfags, etc.).

# Conclusions

---

## **Conclusions**

- 1.- Els gens implicats en la biosíntesi del nucli del LPS en *S. marcescens* N28b constitueixen una agrupació genètica característica que es descriu per primera vegada.
- 2.- Una característica d'aquesta agrupació és la presència del gen *waaE* en l'operó *waa*.
- 3.- El gen *waaE* de *S. marcescens* N28b codifica per a una glucosil transferasa que transfereix un residu de Glc a l'HepI del nucli intern i confereix resistència parcial a la bacteriocina quan s'expressa en *E. coli*.
- 4.- El nucli del LPS de *S. marcescens* N28b conté un residu de  $\beta$ -Glc, així com dos residus de Kdo, 2 residus de GalA, 3 residus de L,D-Hep, un residu de GlcN i un residu de D,D-Hep. Conté també un residu de Glc, de GalA i de L,D-Hep en proporcions no-estequiomètriques.

# **Bibliografia**

---

- **al-Hendy, A., Toivanen, P., and Skurnik, M.** 1991. The effect of growth temperature on the biosynthesis of *Yersinia enterocolitica* O:3 lipopolysaccharide: temperature regulates the transcription of the *rfb* but not of the *rfa* region. *Microbiol. Pathog.* **10**:81-86.
- **Allen, A., and Maskell, D.** 1996. The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Bordetella pertussis*. *Mol. Microbiol.* **19**:37-52.
- **Anderson, M. S., Bull, H. S., Galloway, S. M., Kelly, T. M., Mohan, S., Radika, K., and Rätetz, C. R. H.** 1985. The biosynthesis of gram-negative endotoxin: formation of lipid A precursors from UDP-GlcNAc in extracts of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**:15536-15541.
- **Antonov, K. V., Backinowsky, L. V., Grzeszczyk, B., Brade, L., Holst, O., Zamojski, A.** 1998. Synthesis and serological characterization of L-glicero-D-manno-heptopyranose-containing of the trisaccharides of the non-reducing terminus of the *Escherichia coli* K-12 LPS core oligosaccharide. *Carbohydrate Research.* **1998**:85-93.
- **Appelmek, B. J., Hekker, Y. Q., Hekker, T. A., Thijs, L. G., MacLaren, D. M. and De Graaf, J.** 1994. Frequencies of lipopolysaccharide core types in *Escherichia coli* strains from bacteraemic patients. *Microbiology.* **140**:1119-1124.
- **Arditi, M., Zhou, R., Dorio R., Rong G. W., Goyert S. M. and Kim K. S.** 1993. Endotoxin-mediated endothelial cell injury and activation: role of soluble CD14. *Infect. Immun.* **61**:3149-3156.
- **Aucken, H. M., Merkouroglou, M., Miller, A., Galbraith, L., and Wilkinson, S. G.** 1995. Structural and serological studies of lipopolysaccharides from proposed new serotypes (O25 and O26) of *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol. Lett.* **130**:267-272.
- **Aucken, H. M., Wilkinson, S. G. and Pitt, T. L.** 1996. Immunochemical characterization of two new O serotypes of *Serratia marcescens* (O27 and O28). *FEMS Microbiology Letters.* **138**:77-82.
- **Aucken, H. M., Wilkinson, S. G. and Pitt, T. L.** 1997. Identification of Capsular Antigens in *Serratia marcescens*. *Journal of Clinical Microbiology.* **35**:59-63.
- **Aucken, H. M. and Pitt, T. L.** 1998. Antibiotic resistance and putative virulence factors of *Serratia marcescens* with respect to O and K serotypes. *J. Me. Microbiol.* **47**:1105-1113.
- **Aucken, H. M. and Pitt, T. L.** 1998. Re-evaluation of the serotypes of *Serratia marcescens* and separation into two schemes based on lipopolysaccharide (O) and capsular polysaccharide (K) antigens. *Microbiology.* **144**:639-653.
- **Ausubel, F. M., Brent, R., Kinstong, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K.** 1989. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Ass. And Willey-Interscience.
- **Austin, E. A., Graves, J. F., Hite, L. A., Parker, C. T., and Schnaitman, C. A.** 1990. Genetic Analysis of Lipopolysaccharide Core Biosynthesis by *Escherichia coli* K-12: Insertion Mutagenesis of the *rfa* Locus. *J. Bacteriol.* **172**:5312-5325.
- **Babinet, C.** 1970. A mutation that affects the resistance of *E. coli* to rimfampicin. *Proceedings of the First International Lepetit Coloquium.* 37-45.
- **Banoub, J. H., Choy, Y.M., Michon, F., and Shaw, D. H.** 1983. Structural investigations on the core oligosaccharides of *Aeromonas hydrophila* (chemotype II) lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* **114**:267-276.
- **Banoub, J. H., and Shaw, D. H.** 1981. Structural investigations on the core oligosaccharides of *Aeromonas hydrophila* (chemotype III) lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* **98**:93-98.
- **Beckmann, F., Moll, H., Jäger, K. E., and Zähringer, U.** 1995. Preliminary communication 7-O-carbamoyl-L-glycero-D-manno-heptose: a new core constituent in the lipopolysaccharide of

*Pseudomonas aeruginosa*. Carbohydr. Res. **267**:C3-7.

•Belunis, C. J., and Raetz, C. R. H. 1992. Biosynthesis of endotoxins. Purification and catalytic properties of 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **267**: 9988-9997.

•Birnboim, H. C. 1983. A rapide alkaline extraction method for the isolation of a plasmid DNA. Methods in Enzimology. **100**:143-154.

•Bloch, K. D. 1987. Current protocols in molecular biology. Unit 3. Green publishing Associates-Wiley-Interscience.

•Boman, H. G., and Monner, D. A. 1975. Characterization of Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* K-12 Mutants. J. Bacteriol. **121**:455-464.

•Brade, L., and Brade, H. 1985. A 28,000-Dalton Protein of Normal Mouse Serum Binds Specifically to the Inner Core Region of Bacterial Lipopolysaccharide. Infection and Immunity. **50**:687-694.

•Brade, H., Moll, H., and Rietschel, E. T. 1985. Structural investigations on the inner core region of lipopolysaccharides from *Salmonella minnesota* rough mutants. Biomed. Mass. Spectrom. **12**:602-605.

•Brade, L., Kosma, P., Appelmelk, B. J., Paulsen, H. and Brade, H. 1987. Use of Synthetic Antigens to Determine the Epitope Specificities of Monoclonal Antibodies against the 3-Deoxy-D-manno-Octulosonate Region of Bacterial Lipopolysaccharide. Infection and Immunity. **55**:462-466.

•Bridgen, C. J., Furns, S., and Wilkinson, S. G. 1985. Structural studies of neutral polymer isolated from the lipopolysaccharides of *Serratia marcescens* O6 (strain CDC 862-57) and O12 (CDC 6320-58). Carbohydr. Res. **139**:298-301.

•Bridgen, C. J., and Wilkinson, S. G. 1983. Lipopolysaccharide from the O14 type strain of *Serratia marcescens* : structural studies of a polymer fraction. Carbohydr. Res. **115**:183-190.

•Bulawa, C. E. , and Rätetz, C. R. H. 1984. The biosynthesis of gram-negative endotoxin: identification and function of UDP-2,3-diacetylglucosamine in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **259**:4846-4851.

•Cavaillon, J. M. 1995. The nonspecific nature of endotoxin tolerance. Trends in Microbiology. **3**:320-324.

•Cavard, D., and Lazdunski, C. 1981. Involvement of Btu B and Omp F proteins in binding and uptake of colicin A. FEMS Microbiology Letters. **12**:311-316.

•Chatterjee, A. K., Ross, H., and Sanderson, K. E. 1976. Leakage of periplasmic enzymes from lipopolysaccharide-defective mutants of *Salmonella typhimurim*. Can. J. Microbiol. **22**:1549-1560.

•Climent, N. 1997. Molecular characterization of a 17-kDa outer-membrane protein from *Klebsiella pneumoniae*. Res. Microbiol. **148**:133-143.

•Climent, N. 2000. Caracterització gènica de components de la membrana externa de *Klebsiella pneumoniae* C3. Departament de Microbiologia i Parasitologia sanitàries. Universitat de Barcelona.

•Cox, A. D., Taylor C. J., Anderson A. J., Perry M. B. and Wilkinson S. G. 1995. Structures of the two polymers present in the lipopolysaccharide of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* serogrup O4. Eur. J. Biochem. **231**:784-789.

•Dabrowski, J., Hauck, M., Romanowska, E., and Gamian, A. 1988. Structure elucidation of the core octasaccharide from *Citrobacter* PCM 1487, with the aid of 500 MHz, two dimensional phase sensitive correlated, relayed-coherence transfer, double-quantum, triple-quantum filtered, and N.O.E. <sup>1</sup>RMN spectra. Carbohydr. Res. **180**:163-168.

- Dalla Venezia, N., Minka, S., Bruneteau, M., Mayer, H., and Michel, G. 1985. Lipopolysaccharides from *Yersinia pestis*. Studies on lipiA of lipopolysaccharides I and II. Eur. J. Biochem. **151**:399-404.
- Dell, A., Azadi, P., Tiller, P., Thomas-Oates, Jennings, H. J., Beurret, M. and Michon, F. 1990. Analysis of oligosaccharide epitopes of meningococcal lipopolysaccharides by fast-atom-bombardment mass spectrometry. Carbohydr. Res. **200**:59-64.
- De Lorenzo, V., Herrero M., Jakubzik U. and Timmis, K. 1990. Mini-Tn5 Transposon Derivatives for Insertion Mutagenesis, Promoter Probing, and Chromosomal Insetion of Cloned DNA in GramNegative Eubacteria. J. Bacteriol. **172**:6568-6572.
- Drewry, D. T., Symes, K. C., Gray, G. W., and Wilkinson, S. G. 1975. Studies of polysaccharide fractions from the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 1999. Biochem. J. **149**:93-106
- Di Fabio, J. L., Michon, F., Brisson, J. R., and Jennings, H. J. 1990. Structure of the L1 and L6 core oligosaccharide epitopes of *Neisseria meningitidis*. Can. J. Chem. **68**:1029-1036.
- Di Padova, F. E., Brade, H., Barclay, G. R., Poxton, I. R., Liehl, E., Schuetze, E. et al. 1993. A broadly cross-protective monoclonal antibody binding to *Escherichia coli* and *Salmonella* lipopolysaccharides. Infect. Immun. **61**:3863-3872.
- Eklund, K., Garegg, P. J., Kenne, L., Lindberg, A. A., Lindberg, B. "Abstracts of the IXth International Symposium of Carbohydrate Chemistry". London. 1978.
- Esteban, L. 1993. La Espectrometría de Masas en imágenes. ACKEditores.
- Enfedaque, E., Ferrer, S., Guasch, J. F., Tomás, J., and Regué, M. 1996. Bacteriocin 28b from *Serratia marcescens* N28b: identification of *Escherichia coli* surface components involved in bacteriocin binding and translocation. Can. J. Microbiol. **42**:19-26.
- Feige, U., Jann, B., Schmidt, G., and Stirm, S. 1977. On the primary structure of the *Escherichia coli* R4 cell wall lipopolysaccharide core. Biochem. Biophys. Res. Commun. **79**:88-95.
- Felsenstein, 1991. Counting phylogenetic invariants in some simple cases. J. Theor. Biol. **152**:357-3576.
- Felzenszwalb, I., Boiteux, S., and Laval, J. 1992. Molecular cloning and DNA sequencing of the radC gene of *Escherichia coli* K-12. Mutat. Res. **273**: 263-269.
- Ferrer, S. 1995. Purificación parcial y estudio de la regulación transcripcional de la bacteriocina 28b de *Serratia marcescens* N28b. Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.
- Ferrer, S., Viejo, M. B., Guasch, J. F., Enfedaque, J., and Regué, M. 1996. Genetic Evidence for an Activator Required for Induction of Colicin-Like Bacteriocin 28b Production in *Serratia marcescens* by DNA-Damaging Agents. J. Bacteriol. **178**:951-960.
- Forsberg, L. S. and Reuhs, B. L. 1997. Structural Characterization of the K Antigens from *Rhizobium fredii* USDA257: Evidence for a Common Structural Motif, with Strain-Specific Variation, in the Capsular polysaccharides of *Rhizobium* spp. **1997**: 5366-5371.
- Freudenberg, M. A., Bog-Hansen, T. C., Back, U. and Galanos C. 1980. Interaction of lipopolysaccharides with plasma high-density lipoprotein in rats. Infect. Immun. **28**:373-380.
- Furn, S., and Wilkinson, S. G. 1985. Structure of a neutral polymer isolated from the lipopolysaccharide of *Serratia marcescens* O1 (strain CDC 866-57). Carbohydr. Res. **139**: 293-297.
- Galanos, C. 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. European Journal of



Biochemistry. **9**: 245-249.

•Galanos, C., and Rietschel. 1983. Bacterial endotoxins. *Infection*. **14**:155.

•Galanos, C, Lüderitz, O., Rietschel, E. Th., Westphal, O., Brade, H., Brade, L., Freudenberg, M. A., Schade, U., Imoto, M., Yoshimura, S., Kusumoto, S., and Shiba, T. 1985. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur. J. Biochem.* **148**:1-7.

•Gamian, A., and Romanowska, E. 1982. The core structure of *Shigella sonnei* lipopolysaccharide and the linkage between O-specific polysaccharide and the core region. *Eur. J. Biochem.* **129**:105-109

•Gargallo, D. 1989. Enzyme polymorphism, prodigiosin production, and plasmid fingerprints in clinical and naturally occurring isolates of *Serratia marcescens*. *J. Clin. Microbiol.* **27**:860-868.

•Gibson, B. W., Melaugh, W., Phillips, N. J., Apicella, M. A., Campagnari, A. A. and Griffiss, J. M. 1993. Investigation of the Structural Heterogeneity of Lipooligosaccharides from Pathogenic *Haemophilus* and *Neisseria* Species and of R-type Lipopolysaccharides from *Salmonella typhimurium* by Electrospray Mass Spectrometry. *J. Bacteriol.* **1993**:2702-2712

•Gibson, B. W., Webb, J. W., Yamasaki, R., Fisher, S. J., Burlingame, A. L., Mandrell, R. E., Schneider, H., and Griffiss, J. M. 1989. Structure and heterogeneity of the oligosaccharides from the lipopolysaccharides of a pyocin-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Biochemistry.* **86**:17-21.

•Goldman, R. C. and Leive, L. 1980. Heterogeneity of antigenic side-chain length in lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111 and *Salmonella typhimurium* LT2. *Eur. J. Biochem.* **107**:145-153.

•Goldman, R., Kohlbrenner, W., Lartey, P. and Pernet, A. 1987. Antibacterial agents specifically inhibiting lipopolysaccharide synthesis. *Nature.* **329**:162-164.

•Gorsgkova, R. P., Kalmykova, E. N., Isakov, V. V., and Ovodov, Y. S. 1985. Structural studies on O-specific polysaccharides from *Yersinia enterocolitica* serovars O:1,2a,3, O:2<sup>a</sup>, 2b,3 and O:3. *Eur. J. Biochem.* **150**:527-531.

•Guasch, J. F. 1994. La bacteriocina 28b: producció per diferents biotips de *Serratia marcescens* i caracterització de gens de *Serratia marcescens* que confereixen resistència a la bacteriocina 28b a *Escherichia coli*. Tesi doctoral. Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries. Universitat de Barcelona.

•Guasch, J. F. 1995. A 17kDa outer-membrane protein (Omp4) from *Serratia marcescens* confers partial resistance to bacteriocin 28b when expressed in *Escherichia coli*. *Microbiology.* **141**:2535-2542.

•Guasch, J.F., Piqué, N., Climent N., Ferrer S., Merino S., Rubires X., Tomas J. M. and Regué M. 1996. Cloning and Characterization of Two *Serratia marcescens* Genes Involved in Core Lipopolysaccharide Biosynthesis. *J. Bacteriol.* **178**:5741-5747.

•Guhathakurta, B., Majumdar, M., Sen, A. K., Sasmal, D., Mukherjee, A. K., and Datta, A. 1986. Immunochemical properties of the lipopolysaccharide O-antigen of *Vibrio cholerae* O1 in relation to its chemical structure. **132**:1641-1646.

•Haishima, Y., Holst, O., and Brade, H. 1992. Structural investigation on the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* rough mutant F653 representing the R3 type. **203**:127-134.

•Hämmerling, G., Lüderitz, O., Westphal, O., and Mäkelä, H. P. 1971. Structural investigations on the core polysaccharide of *Escherichia coli* 0100. *Eur. J. Biochem.* **22**:331-344.

•Hammond, S. M., Claesson, A., Jansson, A. M., Larsson, L., Pring, B. G. 1987. A new class of synthetic antibacterials acting on lipopolysaccharide biosynthesis. *Nature.* **327**:730-732.

•Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* **166**:557-

580.

- **Hancock, R. E., and Reeves, P.** 1976. Lipopolysaccharide-deficient, bacteriophage-resistant mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **127**:98-108.
  
- **Haseley, S. R., Traub W. H. and Wilkinson, S. G.** 1997. Structures of polymeric products isolated from the lipopolysaccharides of reference strains for *Acinetobacter baumannii* O23 and O12. *Eur. J. Biochem.* **244**:147-154.
  
- **Heinrichs, D. E., Yethon, J. A., and Whitfield, C.** 1998. Molecular basis of structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **30**: 221-232.
  
- **Heinrichs, D. E., Monteiro, M. A., Perry, M. B., and Whitfield, C.** 1998. The assembly system for the lipopolysaccharide R2 core-type of *Escherichia coli* is a hybrid of those found in *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella enterica*. Structure and function of the R2 WaaK and WaaL homologs. *J. Biol. Chem.* **273**:8849-8859.
  
- **Helander, I. M., Kato, I., Kilpeläinen, R., Kostianen, R., Lindner, B., Nummila, K., Sygiyama, T., and Yokochi, T.** 1996. Characterization of lipopolysaccharides of polymixin-resistant and polymixin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3. *Eur. J. Biochem.* **237**:272-278.
  
- **Herrero, M., De Lorenzo, V. and Timmis, K.** 1990. Transposon Vectors Containing Non-Antibiotic Resistance Selection Markers for Cloning and Stable Chromosomal Insertion of Foreign Genes in Gram-Negative Bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557-6567.
  
- **Hisatsune, K., De Courcy, S. and Mudd, S.** 1967. Studies on the Carbohydrate-Peptide Fraction of the Centrifugal Supernatants of *Staphylococcus aureus* Cultures. *Biochemistry.* **6**:586-594.
  
- **Hithcock, P. J. and Brown, T. M.** 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrilamide gels. *J. Bacteriol.* **154**:269-277.
  
- **Hoess, A., Watson, S., Siber, G. R., and Liddington, R.** 1993. Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horse shoe crab, *Limulus* anti-LPS factor, at 1,5 resolution. *EMBO J.* **12**:3351-3356.
  
- **Holst, O., Röhrscheidt-Andrzejewski, E., Brade, H., and Charon, D.** 1990. Isolation and characterization of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid region (inner core) of the lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* rough mutants. *Carbohydr. Res.* **204**:93-96.
  
- **Holst, O., Brade, H., Dziewizek, D., and Zamojski, A.** 1990. G.l.c.-m.s. of partially methylated and acetylated derivatives of L-glycero-D-manno- and D-glycero-D-manno- hepto-pyranoses and -heptitols. *Carbohydrate Research.* **204**:1-9.
  
- **Holst, O. and Brade, H.** 1990. Isolation and identification of 3-deoxy-5-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-D-manno-2-octulopyranosonate from the inner core region of the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* K-12. *Carbohydrate Research.* **207**:327-331.
  
- **Holst, O., Zähringer, U. and Brade, H.** 1991. Structural analysis of the heptose/hexose region of the lipopolysaccharide from *Escherichia coli* K-12 strain W3100. *Carbohydrate Research.* **215**:323-335.
  
- **Holst, O., Röhrscheidt-Andrzejewski, E., Cordes, H. P. and Brade, H.** 1989. Isolation and identification of 3-deoxy-7-O-(D-galactopyranosyl-D-manno-2-octulopyranosonate from the inner core region of the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* EH100. *Carbohydrate Research.* **188**:212-218.
  
- **Holst, O., Brade, H.** 1990. Isolation and identification of 3-deoxy-5-O-(L-rhamnopyranosyl-D-manno-2-octulopyranosonate from the inner core region of the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* K-12.

Carbohydrate Research. **207**:327-331.

•**Holst, O., Brade, L., Kosma, P., and Brade, H.** 1991. Structure, Serological Specificity, and Synthesis of Artificial Glycoconjugates Representing the Genus-Specific Lipopolysaccharide Epitope of *Chlamydia* spp. J. Bacteriol. **173**:1862-1866.

•**Holst, O., Ulmer, A. J., Brade, H., Flad, H. D. and Rietschel, E. T.** 1996. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. FEMS Immunology and Medical Microbiology. **16**:83-104.

•**Holst, O., Aucken H. M. and Seltmann G.** 1997. Structural and serological characterisation for the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide from proposed new serotype O29 of *Serratia marcescens*. Journal of Endotoxin Research. **4**:215-220.

•**Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen T., Masoud, H., Martin, J. R., Brisson, J. R., Fleishmann, R., Venter, J. C., Richards, J. C., and E. R., Moxon.** 1996. Use of the complete genome sequence information of *Haemophilus influenzae* strain Rd to investigate lipopolysaccharide biosynthesis. Mol. Microbiol. **22**:951-965.

•**Ishchenko, A. A., Koval V. V., Fedorova, O.S., Douglas, K. T., and Nevinsky, G. A.** 1999. Structural requirements of double and single stranded DNA substrates and inhibitors, including a photoaffinity label, of Fpg protein from *Escherichia coli*. J. Biochem. Struct. Dyn. **17**:301-310.

•**Isshiki, Y., Haishima, Y., Kondo, S., and Hisatsune, K.** 1995. Immunochemistry of group A and Inaba C antigens factors constituting the O antigen of O1 *Vibrio cholerae*. Eur. J. Biochem. **229**:583-588.

•**Jacques, M.** 1996 Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharide in bacterial adherence. Trends in Microbiology. **4**:408-410.

•**Jann, K., and Jann, B.** 1984. "Handbook of Endotoxin. Chemistry of Endotoxin". ed. E. Th. Rietschel. Elsevier Science. Amsterdam. **1**:138.

•**Jann, B., Shashkov, A. S., Kochanowski, H., and Jann, K.** 1994. Structure of the O16 polysaccharide from *Escherichia coli* O16:K1: an NMR investigation. Carbohydr. Res. **264**:305-311.

•**Jansson, P. E., Lindberg, A. A., Lindberg, B., and Wollin, R.** 1979. Structural studies on the hexose region of the *Enterobacteriaceae* type R3 core polysaccharide. Carbohydr. Res. **68**:385-391.

•**Jansson, P. E., Lindberg, A. A., Lindberg, B., and Wollin, R.** 1981. Structural studies on the hexose region of the core in lipopolysaccharides from *Enterobacteriaceae*. Eur. J. Biochem. **115**:571-575.

•**Jansson, P. E., Lönngren, J., Widmalm, Leotein, K., Slettengren, S. B., Svenson, S. B., Wrangsell, G., Dell, A., and Tiller, R.** 1985. Structural studies of the O-antigen polysaccharides of *Klebsiella* O5 and *Escherichia coli* O8. Mol. Microbiol. **145**:59-66.

•**Jennings, H. J., Azadi, P., Tiller, P., Thomas-Oates, J., Jennings, H. J., Beurret, M., and Michon, F.** 1990. Analysis of oligosaccharide core obtained from some lipopolysaccharides of *Neisseria meningitidis*. Can. J. Chem. **68**:1029-1033.

•**Jennings, H. J., Beurret, M., Gamian, A., and Michon, F.** 1987. Structure and immunochemistry of meningococcal lipopolysaccharide. J. Microbiol. Serol. **53**:519-523.

•**Jirillo, E., De Simone, C., Covelli, V., Kiyono, H., McGhee, J. H. and Antonaci, S.** 1990. LPS-mediated triggering of T-lymphocytes in immune response against gram-negative bacteria. Adv. Exp. Med. Biol. **256**: 417-425.

•**Johansson, A., Widmalm G., Jansson P. and Wilkinson S. G.** 1995. Structure of an acidic microcapsular glycan from the reference strain (C.D.C. 866-57) for *Serratia marcescens* serogrup O1. Carbohydrate Research. **270**: 191-199.

- Johnson, K. G. and Perry M. B. 1975. Improved techniques for the preparation of bacterial lipopolysaccharides. *Can. J. Microbiol.* **22**: 29-34.
- Kaca, W., Brade, L., Rietschel, E. T., and Brade, H. 1986. The effect of removal of D-fructose on the antigenicity of the lipopolysaccharide from a rough mutant of *Vibrio cholerae* Ogawa. *Carbohydrate Research.* **149**:293-298.
- Kahler, C. M., Carlson R. W., Rahman M. M., Martin L. E and Stephens D. S. 1996. Two Glycosyltransferase Genes, *IgtF* and *rfaK*, Constitute the Lipooligosaccharide ice (Inner Core Extension) Biosynthesis Operon of *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* **178**:6677-6684.
- Karkhanis, Y. D., Zeltner J. Y., Jackson J. J., Carlo D. J. 1978. A New and Improved Microassay to Determine 2-Keto-3-deoxyoctonate in Lipopolysaccharide of Gram-Negative Bacteria. *Anal. Biochem.* **85**:595-601.
- Katzenellenbogen, E. 1990. The structure of the biological repeating unit of the O-antigen of *Hafnia alvei* O:39. *Carbohydr. Res.* **15**:219-227.
- Keenleyside, W. J., Perry, M., Maclean, L., Poppe, C., and Whitfield, C. 1994. A plasmid-encoded *rfb* O:54 gene cluster is required for biosynthesis of the O:54 antigen in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *Mol Microbiol.* **11**:437-448.
- Kelly, R. F., Severn, W. B., Richards, J. C., Perry, M. B., Maclean, L. L., Tomás, J. M., Merino, S., and Withfield, C. 1993. Structural variation in the O-specific polysaccharides of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1 and O8 lipopolysaccharide: evidence for clonal diversity in *rfb* genes. *Mol. Microbiol.* **10**:615-625
- Kenne, L. 1982. Structural studies of the *Vibrio cholerae* O-antigen. *Carbohydr. Res.* **100**:341-349.
- Knirel, Y. A., Vinogradov, E. V., Shashkov, A. S., Kochetkov, N. K., L'vov, V., Dmitriev, B. A. 1985. Identification of 5-acetamido-3,5,7,9-tetra-deoxy-7-R-3-hydroxybutyramido-L-glycero-L-manno-nonulosonic acid as a component of bacterial polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **141**:C1-3.
- Knirel, Y. A., Vinogradov, E. V., Kocharova, N. A., Paramonov, N. A., Kochetkov, N. K., Dmitriev, B. A., Stanislavsky, E. S., and Lanyi, B. 1988. The structure of O-specific polysaccharides and serological classification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Microbiol. Hung.* **35**:3-24.
- Knirel, Y. A., Moll, H., and Zähringer, U. 1996. Structural study of a highly O-acetylated core of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* **293**:223-234.
- Kol, O., Wieruszkeski, J. M., Strecker, G., Fournet, B., Zalisz, R., Smets, P. 1992. Structure of the O-specific polysaccharide chain of *Klebsiella pneumoniae* O1 K2 (NCTC 5055) lipopolysaccharide. A complementary elucidation. *Carbohydr. Res.* **236**:339-344.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. 1982. A simple method for displaying the hidropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **17**:105-132.
- Kumada, H., Watanabe, K., Umemoto, T., Kato, K., Kondo, S. and Hisatsune K. 1989. Chemical and Biological Properties of Lipopolysaccharide, Lipid A and Degraded Polysaccharide from *Wolinella recta* ATCC 33238. *J. Gen. Microbiol.* **135**:1017-1025.
- Krauss, J. H., Seydel, U., Weckesser, J., and Mayer, H. 1989. Structural analysis of the nontoxic lipid A of *Rhodobacter capsulatus* 37b4. *Eur. J. Biochem.* **180**:519-526.
- Lam, M. Y. C., McGroarty, E. J., Kropinski, A. M., McDonal, L. A., Pedersen, S. S., Hoiby, N., and Lam, J. S. 1989. Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **27**:962-967.

- Lee, Y. C. 1990. High-Performance Anion-Exchange Chromatography for Carbohydrate Analysis. *Anal. Biochem.* **189**:151-162.
- Lesse, A. J., Campagnari, A. A., Bittner, W. E., Apicella, M. A. 1990. Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricaine-sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Immunol. Methods.* **126**:109-117.
- Levin, J. C. And Stein, D. C. 1996. Cloning, Complementation, and Characterization of an *rfaE* Homolog from *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **178**:4571-4575.
- Lindberg, A. A., Wollin, R., Bruse, G., Ekwall, E., and Svenson, S. B. 1983. Immunology and immunochemistry of synthetic and semisynthetic *Salmonella* O-antigen specific glycoconjugates. *ACS Symp. Ser.* **231**:83.
- Liu, D. and Reeves, P. R. 1994. *Escherichia coli* K12 regains its O antigen. *Microbiology.* **140**:49-57.
- Löbau, S., Mamat, U., Brabetz, W., and Brade, H. 1995. Molecular cloning, sequence analysis, and functional characterization of the lipopolysaccharide biosynthetic gene *kdtA* encoding 3-deoxy- $\alpha$ -D-manno-octulosonic acid transferase of *Chlamydia pneumoniae* strain TW-183. *Molecular Microbiology.* **18**:391-399.
- Loppnow, H., Libby, P., Freudenberg, M., Krauss, J. H., Weckesser, J., and Mayer, H. 1990. Cytokine induction by lipopolysaccharide (LPS) corresponds to lethal toxicity and is inhibited by nontoxic *Rhodobacter capsulatus* LPS. *Infect. Immun.* **58**:3743-3750.
- Loppnow, H., Stelter, F., Schönbeck, U., Schlüter, C., Ernst C., Schütt, C. and Flad, D. 1995. Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14. *Infect Immun.* **63**:1020-1026.
- Lowrrey, O. H., Roberts, N. R., Leiner, K. Y., Wu, M. L., Farr, A. L., and Albers, R. W. 1954. The quantitative histochemistry of brain. *J. Biol. Chem.* **207**:39-48.
- Lüderitz, T., Staub, A. M., and Westphal, O. 1966. Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related *Enterobacteriaceae*. *Bacteriol. Rev.* **30**:192-255.
- Lüderitz, T., Brandenbrug, K., Seydel, U., Roth, A., Galanos, C. and Rietschel, E. T. 1989. Structural and physicochemical requirements of endotoxins for the activation of arachidonic acid metabolism in mouse peritoneal macrophages. *Eur. J. Biochem.* **179**:11-16.
- Lugowski, C., Kulakowska, M., and Romanowska, E. 1986. Characterization and diagnostic application of a lipopolysaccharide core oligosaccharide-protein conjugate. *J. Immunol Methods.* **95**:187-194.
- L'vov, V., Shashkov, A. S., Dmitriev, B. A., Kochetkov, N. K., Jann, B., and Jann, K. 1989. Structural studies of the O-specific side chain of the lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O:7. *Carbohydr. Res.* **126**:249-259.
- MacLachlan, P. R., and Sanderson, K. E. 1985. Transformation of *Salmonella typhimurim* with plasmid DNA: differences between rough and smooth strains. *J. Bacteriol.* **161**:442-445.
- Maclean, L. L., Whitfield, C. and Perry, M. B. 1993. Characterization of the polysaccharide antigen of *Klebsiella pneumoniae* O:9 lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* **239**:325-328.
- Mäkelä, P. H. and Stocker, B. A. D. 1984. Genetics of lipopolysaccharide. *Handbook of Endotoxin.* Vol. I:59-137.
- Mamat, U., Seydel, U., Grimmecke, D., Holst, O., and Rietschel, E. T. 1999. Lipopolysaccharides. *Comprehensive Natural Products Chemistry.* Barton Nakanishi Meth-Cohn. Pergamon.

- **Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.** 1982. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- **Martínez, E. and De la Cruz, F.** 1988. Transposon Tn21 encodes RecA-independent site-specific integration system. *Mol. Gen. Genetics*. **211**:320-335.
- **Masoud, H., Sadovskaya, I., De Kievit, E., Altman, E., Richards, J. C., and Lam, J. S.** 1995. Structural elucidation of the lipopolysaccharide core region of the O-chain-deficient mutant strain A28 from *Pseudomonas aeruginosa* serotype O6 (International Antigenic typing Scheme). *J. Bacteriol.* **177**:6718-6726.
- **Merino, S., Aguilar, A., Rubires, X., and Tomas, J. M.** 1998. Mesophilic *Aeromonas* strains from different serogroups: the influence of growth temperature and osmolarity on lipopolysaccharide and virulence. *Res. Microbiol.* **149**:407-416.
- **Miller, V. L., and Mekalanos, J. J.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutants: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* require *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**:2575-2583.
- **Michon, F., Shaw, D. H., and Banoub, J. H.** 1984. Structure of the lipopolysaccharide core isolated from a human strain of *Aeromonas hydrophila*. *Eur. J. Biochem.* **145**:107-114.
- **Morrison, D. C., and Ryan, J. L.** 1987. Endotoxins and disease mechanisms *Annu. Rev. Med.* 1987. **38**:417- 432.
- **Müller-Loennies, S., Holst, O., and Brade, H.** 1994. Chemical structure of the core region of *Escherichia coli* J-5 lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* **224**:751-760.
- **Müller-Loennies, S., Rund S., Ervelä, E., Skurnik, M., and Holst O.** 1999. The structure of the carbohydrate backbone of the core-lipid A region of the lipopolysaccharide from a clinical isolate of *Yersinia enterocolitica* O:9. *Eur. J. Biochem.* **261**:19-24.
- **Nikaido, H., Vaara, M.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**:1-32.
- **Nishijima, M., and Rätetz, C. R. H.** 1979. Membrane lipid biogenesis in *Escherichia coli*: identification of genetic loci for phosphatidylglycerophosphate synthetase and construction of mutants lacking phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* **254**:7837-7844.
- **Normark, S.** 1970. Genetics of a chain forming mutant of *Escherichia coli*: transduction and dominance of the *emvA* gene mediating increased penetration to some antibacterial agents. *Genet. Res.* **16**:63-78.
- **Olsthoorn, M. M. A., Petersen, B. O., Schlecht, S., Haverkamp, J., Bock, K., Thomas-Oates, J. E. and Holst, O.** 1998. Identification of a Novel Core Type in *Salmonella* Lipopolysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry.* **273**:3817-3829.
- **Ørskov, F., Ørskov, I., Jann, B., and Jann, K.** 1977. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* **41**:667-710.
- **Ørskov, F., Sharma, V., and Ørskov, I.** 1984. Influence of growth temperature on the development of *Escherichia coli* polysaccharide K antigens. *Methods Microbiol.* **14**:143-164.
- **Osborn, M. J.** 1979. Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide of the outer membrane. *Bacterial Outer Membranes, Biogenesis and Functions*. Inoye, M, Ed. New York.
- **Oxley, D. and Wilkinson, S. G.** 1986. Structure of the O- specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Serratia marcescens* O8. *Eur. J. Biochem.* **156**:597-601.

- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1987. Structural studies of the putative O-specific polysaccharide of *Serratia marcescens* O9. Eur. J. Biochem. **166**:421-424.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1988. Structure of a neutral polymer isolated from the lipopolysaccharide of *Serratia marcescens* O5 (CDC 867-57). Carbohydr. Res. **172**:287-291.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1988. Studies of lipopolysaccharides from two strains (C.D.C. 3607-60 and IP 421) of *Serratia marcescens* O13: Structure of the putative O13 antigen. Carbohydr. Res. **172**: 275-286.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1988. Structural studies of Glucorhamnans isolated from the lipopolysaccharides of reference strains for *Serratia marcescens* serogroups O4 and O7, and of an O14 strain. Carbohydr. Res. **175**:111-117.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1988. Structure of a neutral polymer isolated from the lipopolysaccharide of the reference strain (CDC 4523-60) for *Serratia marcescens* serogroups O15. Carbohydr. Res. **177**:285-288.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1989. Structural studies of an acidic galactoglucomannan from the O3 reference strain (C.D.C. 863-57) of *Serratia marcescens*. Carbohydr. Res. **187**:295-301.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1989. Structure of a neutral polymer isolated from the lipopolysaccharide of the reference strain for *Serratia marcescens* serogroup O18. Carbohydr. Res. **195**: 111-115.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1989. Structural studies of an acidic galactoglucomannan from the O15 reference strain (C.D.C.) of *Serratia marcescens*. Carbohydr. Res. **186**: 295-300.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1989. Structural studies of a neutral polymer (the putative O10 antigen) isolated from the lipopolysaccharide of *Serratia marcescens* strain CDC 1287-54 (O10, H8). Carbohydr. Res. **187**:303-311.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1989. Structures of neutral glycans isolated from the lipopolysaccharide of the reference strains for *Serratia marcescens* serogroups O16 and O20. Carbohydr. Res. **193**:241-248.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1989. Structure of the O-specific galactan from the lipopolysaccharide of the reference strain for *Serratia marcescens* serogroup O24. Carbohydr. Res. **195**:117-122.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1990. A common structure for neutral polymers isolated from the lipopolysaccharides of reference strains for *Serratia marcescens* serogroups O17 and O19. Carbohydr. Res. **198**:168-172.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1990. Structure of a neutral glycan isolated from the lipopolysaccharide of the reference strain for *Serratia marcescens* serogroup O22. Carbohydr. Res. **203**:247-251.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1990. Structural studies of acidic polymers produced by the O23 reference strain of *Serratia marcescens*: presence of amide-linked glutamic acid. Carbohydr. Res. **204**: 85-91.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1991. Structure of an acidic glycan present in the lipopolysaccharide extract from the reference strain for *Serratia marcescens* serogrup O18. Carbohydr. Res. **215**:293-301.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1991. Structure of a mannan isolated from the lipopolysaccharide of the reference strain (S3255) for a new serogrup of *Serratia marcescens*. Carbohydr. Res. **212**:213-217.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1991. Structure of a glucorhamnan from the lipopolysaccharide of *Serratia marcescens* strain S1254. Carbohydr. Res. **209**:319-322.

- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1991. Structure of the O21 antigen from *Serratia marcescens*. Carbohydr. Res. **212**:187-192.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1992. Structure of an acidic glycan from the reference strain for *Serratia marcescens* serogrup O22. Carbohydr. Res. **231**:237-248.
- Oxley, D. and Wilkinson, S. G. 1992. Structure of a neutral glycan from the lipopolysaccharides or reference strains for *Serratia marcescens* serogroups O2 and O3. FEMS Microbiol. Lett. **99**:209-212.
- Pakulski, Z., Zamosjski, A., Holst, O., and Zähringer, U. 1991. The synthesis and characterization of 6-O-Lglycero-alpha-D-manno-heptopyranosyl-D-glucopyranose. Carbohydrate Research. **215**:337-344.
- Palomar, J. 1994. El lipopolisacárido de *Serratia marcescens* como factor de virulencia. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
- Palomar, J., Puig M., Montilla R., Lorén, J. G. and Viñas, M. 1995. Lipopolysaccharide recovery restores susceptibility levels towards  $\beta$ -lactams in *Serratia marcescens*. Microbios. **82**:21-26.
- Palomar, J., and Viñas, V. 1996. The effect of O-antigen on transformation efficiency in *Serratia marcescens*. Microbiología SEM. **12**:435-438.
- Parker, G. T, Kloser, A. W., Schnaitman C. A., Stein M. A., Gottesman S., Gibson B. W. 1992. Role of the *rfaG* and *rfaP* Genes in Determining the Lipopolysaccharide Core Structure and Cell Surface Properties of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **174**:2525-2538.
- Pradel E. and Schnaitman, C. A. 1991. Effect of *rfaH* (*sfrB*) and temperature on expression of *rfa* genes of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **173**:6428-6431.
- Pugsley, A.P., and Oudega, B. 1987. Methods for studying colicins and their plasmids. "Plasmids, a practical approach" K.G. Hardy ed. IRL Press. Oxford. Washintong DC.
- Radziejewska-Lebrecht, J. and Mayer, H. 1989. The core region of *Proteus mirabilis* R110/1959 lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem. **183**:573-581.
- Radziejewska-Lebrecht, Krajewska-Pietrasik, D., and Mayer, H. 1990. Terminal and Chain-linked Residues of D-Galacturonic Acid: Characteristic Constituents of the R-core Regions of *Proteaceae* and of *Serratia marcescens*. System. Appl. Microbiol. **13**:214-219.
- Radziejewska-Lebrecht, J., Shashkov, A. S., Stroobant, V., Wartenberg, K., Wart, C., and Mayer, H. 1994. The inner core region of *Yersinia enterocolitica* Ye75R (O:3) lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem. **221**:343-351.
- Raetz, C. 1990. Biochemistry of endotoxins. Ann. Rev. Biochem. **59**:129-170.
- Raetz, C. 1996. Bacterial Lipopolysaccharides: a Remarkable Family of Bioactive Macroamphiphiles. En *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cellular and Molecular Biology*. Curtiss, Ingraham, Lin *et al.* Washington, DC: American Society Microbiology Press. 1035-1063.
- Reeves, P. R. 1994 "Bacterial Cell Wall". ed. J. M. Ghuyssen and R. Hakenbeck. Elsevier Science. Amsterdam. 281.
- Rietschel, E. T., Galanos, C., Lüderitz, O., and Westphal. 1982. Immunopharmacology and the Regulation of Leucocyte function. Ed. Webb, Dekker. New York. 183-205.
- Rietschel, E. T. 1984. Chemistry of Endotoxin. Handbook of Endotoxin. Elsevier/North-Holland Biomedicat Press, Amsterdam.
- Rietschel, E. T., Brade, L., Lindner, B., Zähringer, U. 1992. Bacterial endotoxic lipopolysaccharides. Morrison DC, Ryan JL. Bacterial endotoxic lipopolysaccharides.



Boca Raton: CRC Press. Vol. I:3-41.

•**Rietschel, E. T., Brade, H., Holst, O. et al.** 1996. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol **216**:39-81.

•**Rivera, M., and McGroarty, E. J.** 1989. Analysis of a common-antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **171**:2244-2248.

•**Roantree, R. J., Kuo, T. T., and MacPhee, D. G.** 1977. The effect of defined lipopolysaccharide core defects upon antibiotic resistances of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **103**:223-234.

•**Roland, K. L., Martin, L. E., Estheeer, C. R., and Spitznagel, J. K.** 1993. Spontaneous *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 define a new two-component regulatory system with a possible role in virulence. *J. Bacteriol.* **175**:4154-4164.

•**Roland, K. L., Estheeer, C. R., and Spitznagel, J. K.** 1994. Isolation and characterization of a gene, *pmrD*, from *Salmonella typhimurium* that confers resistance to polymyxine when expressed in multiple copies. *J. Bacteriol.* **176**:3589-3597.

•**Romanowska, E., Gamian, Lugowski, C., Romanowska, A., Dabrowski, J., Hauck, M., Opferkuch, H. J., and von der Lieth, C. W.** 1988. Structure elucidation of the core regions from *Citrobacter* O4 and O36 lipopolysaccharides by chemical and enzymatic methods, gas chromatography/mass spectrometry, and RMN spectroscopy at 500 MHz. *Biochemistry.* **27**:4153-4158.

•**Romanowska, E., Gamian, Katzenellenbogen, E., A., Romanowska, A., Lugowski, C., Kulakowska, Dabrowski, J., and Dabrowski, U.** 1990. Lipopolysaccharide core regions of *Citrobacter*: structure and serology. *Cellular and Molecular Aspects of Endotoxin Reactions*. Endotoxin Research Series. Excerpta Medica. Amsterdam. Vol **1**:103-125.

•**Rowe, P. S. N., and Meadow, P. M.** 1983. Structure of the Core oligosaccharide from the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* PACi1 and its defective mutant. *Eur. J. Biochem.* **132**:329-337

•**Rozalski, A., Brade, L., Kosma, P., Appelmelk, B. J., Krogmann, C. and Brade, H.** 1989. Epitope Specificities of Murine Monoclonal and Rabbit Polyclonal Antibodies against Enterobacterial Lipopolysaccharides of the Re Chemotype. *Infection and Immunity.* **57**:2645-2652.

•**Rubires, X., Saigi, F., Piqué, N., Climent, N., Merino, S., Albertí, S., Tomás, J. M. and Regué, M.** 1997. A Gene (*wbbL*) from *Serratia marcescens* N28b (O4) Complements the *rfb-50* Mutation of *Escherichia coli* K-12 Derivatives. *J. Bacteriol.* **179**:7581-7586.

•**Saigi, F.** 1999. Aislamiento y caracterización genética de los genes implicados en la biosíntesis del antígeno O4 de *Serratia marcescens* N28b. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.

•**Saigi, F., Climent, N., Piqué, N., Sánchez, C., Merino, S., Rubires, X., Aguilar, A., Tomás, J. M. and Regué, M.** 1999. Genetic analysis of the *Serratia marcescens* N28b O4 Antigen Gene Cluster. *J. Bacteriol.* **181**:1883-1891.

•**Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

•**Sanger, F., Nicken, S. and Coulson, A. R.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**:5463-5367.

•**Schnaitman, C. L., and Klena, J. D.** 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:655-682.

•**Schumann, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W. et al.** 1990. Structure and function of

lipopolysaccharide binding protein. *Science*. **249**:1429-1431.

•Severn, W. B., Kelly, R. F., Richards, J. C., and Whitfield, C. 1996. Structure of the Core Oligosaccharide in the Serotype O8 Lipopolysaccharide from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **178**:1731-1741.

•Shaw, D. H., Squires, M. J., Ishiguro, E. E., and Trust, T. J. 1986. The structure of the heptose-3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid region in a mutant form of *Aeromonas salmonicida*. *Eur. J. Biochem.* **161**:309-313.

•Shaw, D. H., and Hart, M. J. 1990. Structural studies on the core oligosaccharide isolated from a smooth lipopolysaccharide of *Aeromonas salmonicida*. 15<sup>th</sup> Int. Carbohydrate Symp. Yokohama. 1990. 352.

•Shibayama, K., Ohsika, S., Sato, K., Yokoyama, K., Horii, T., and Ohta, M. 1999. Four critical aspartic acid residues potentially involved in the catalytic mechanism of *Escherichia coli* K-12 WaaR. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**:105-109.

•Skurnik, M., Zhang, L. 1996. Molecular genetics and biochemistry of *Yersinia* lipopolysaccharide. **104**:849-872.

•Stanislavsky, E. S., Makarenko, T. A., Kholodkova, E. V., Lugowski, C. 1997. R-form lipopolysaccharides (LPS) of Gram-negative bacteria as possible vaccine antigens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **18**:139-145.

•Stevenson, G., Neal, B., Liu, D., Hobbs, M., Packer, N. H., Batley, M., Redmond, J. W., Lindquist, L., and Reeves, P. 1994. Structure of the O-antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its *rfb* gene cluster. *J. Bacteriol.* **176**:4144-4156.

•Strohmaier, H., Remler, P., Renner, W., and Hogenauer, G. 1995. Expression of genes *kdsA* and *kdsB* involved in 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid metabolism and biosynthesis of enterobacterial lipopolysaccharide is growth phase regulated primarily at the transcriptional level in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **177**:4488-500.

•Süsskind, M., Brade, L., Brade, H., and Holst, O. 1998. Identification of a Novel Heptoglycan of  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2-Linked D-glycero-D-manno-Heptopyranose. *J. Biol. Chemistry.* **273**:7006-7017.

•Süsskind, M., Lindner, B., Weimar, T., Brade, H. and Holst, O. 1998. The structure of the lipopolysaccharide from *Klebsiella oxytoca* rough mutant R29 (O1-/K29-). *Carbohydrate Research.* **312**: 91-95.

•Tacken, A., Rietschel, E. T., and Brade, H. 1986. Methylation analysis of the heptose/3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid region (inner core) of the lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* rough mutants. *Carbohydrate Research.* **149**:279-282.

•Tsai, C.M. and Frasch, C.E. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **119**:115-119.

•Traurig, M. and Misra, R. 1999. Identification of bacteriophage K-20 binding regions of OmpF and lipopolysaccharide in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett.* **181**:101-108.

•Vaara, M., and Nikaido, H. 1984. Molecular organization of bacterial outer membrane. *Chemistry of Endotoxin*, Vol. I, Elsevier Science, Amsterdam, 1984.

•Viejo, M. B., Ferrer, S., Enfedaque, J. And Regué, M. 1992. Cloning and DNA sequence analysis of a bacteriocin gene from *Serratia marcescens*. *J. Gen. Microbiol.* **138**:1737-1743.

•Vinogradov, E. V., Holst, O., Thomas-Oates, J., Broady, K., and Brade, H. 1992. The structure of the O-antigenic polysaccharide from lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* strain H11 (non-O1).

European Journal of Biochemistry. **210**:491-498.

•**Vinogradov, E. V., van der Drift, K., Thomas-Oates, J. E., Meshkov, S., Brade, H. and Holst, O.** 1999. The structures of the carbohydrate backbones of the lipopolysaccharides from *Escherichia coli* rough mutants F470 (R1 core type) and F576 (R2 core type). **261**:629-639.

•**Vinogradov, E. V., Bock, K., Holst, O., and Brade, H.** 1995. The structure of the lipidA-core region of the lipopolysaccharides from *Vibrio cholerae* O1 smooth strain 569B (Inaba) and rough mutant strain 95R (Ogawa). Eur. J. Biochem. **233**:152-158.

•**Vinogradov, E. V., Bock, K.** 1999. The structure of the core part of *Proteus vulgaris* O2 lipopolysaccharide. Carbohydr. Res. **320**:239-243.

•**Vinogradov, E. V., Bock, K.** 1999. The structure of the core part of *Proteus mirabilis* O27 lipopolysaccharide with a new type of glycosidic linkage. Carbohydrate Research. **319**:92-101.

•**Vinogradov, E. V., Radziejewska-Lebrecht, J., Kaca, W.** 2000. The structure of the carbohydrate backbone of core-lipid A region of the lipopolysaccharides from *Proteus mirabilis* wild-type strain S1959 (serotype O3) and its Ra mutant R110/1959. **267**:262-269.

•**Wang, C. S., Burns, R. K., and Alaupovic, P.** 1974. Isolation and Composition of Oligosaccharide Cores from Endotoxins of Two *Serratia marcescens* Strains. J. Bacteriol. **120**: 990-993.

•**Wang, R. F., Kushner, S. R.** 1991. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. Gene. **100**:195-199.

•**Westphal, O., Lüderitz, O. and Bister, F.** 1952. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z. Naturforsch. **7**:148-155.

•**Westphal, O., Lüderitz, O.** 1954. Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden Gram-negativer Bakterien. Angew. Chem. **66**:407-409.

•**Westphal, O., Westphal, U., and Sommer, T.** 1977. The history of pyrogen research. Schlessinger D. Ed. Microbiology. American Society of Microbiology. 221-238.

•**White, C. A., and Vas, W.** 1983. An automated Elson-Morgan assay for 2-amino-2-deoxy-hexoses, with increased sensibility. Carbohydrate Research. **114**:201-207.

•**White, K. A., and Rätz, C. R. H.** 1993. Characterization of a monofunctional Kdo-transferase in extracts of *Haemophilus influenzae*. FASEB J. **9**, A1376.

•**Whitfield, C., Richards, J. C., Perry, M. B., Clarke, B. R., and Maclean, L. L.** 1991. Expression of two structurally distinct D-galactan O-antigens in the lipopolysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1. J. Bacteriol. **173**:1420-1431.

•**Whitfield, C., J. C., Perry, , Maclean, L. L., and Yu, S. H.** 1992. Structural analysis of the O-antigen side chain polysaccharides in the lipopolysaccharides of *Klebsiella* serotypes O2 (2a), O2 (2a,2b) and O2 (2a,2c). J. Bacteriol. **174**:4913-4919.

•**Whitfield, C.** 1995. Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. Trends in Microbiology. **3**:178-185.

•**Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Mathison, J. C.** 1990. CD14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein. Science. **249**:1431-1433.

•**Wylie, J.L., Iliffe, E. R., Wang, L. L., and McClarty, G.** 1997. Identification, characterization and developmental regulation of *Chlamydia trachomatis* 3-deoxy-D-manno-octulosonate (Kdo)-8-phosphate synthetase and CMP-Kdo synthetase. Infect. Immun. **65**:1527-1530.

•**Zähringer, U., Lindner, B. and Rietschel, E. T.** 1994. Molecular structure of Lipid A, the endotoxic

center of bacterial lipopolysaccharides. *Advances in Carbohydrate chemistry and biochemistry*. **50**:211-276.

•**Zhou, D., Lee, N. G., and Apicella, A.** 1994. Lipooligosaccharide biosynthesis in *Neisseria gonorrhoeae*: cloning, identification and characterization of the alpha 1,5 heptosyl transferase I gene. *Mol. Microbiol.* **14**:609-618.

**Annex**

---



Annex

R R L A V I N N P F D I D A I R Q Q A A  
GCAGCCGATCGCCAGTAGTTATTTGGCAAGCTGTAGCTGCGGTAGGCCGTTGTCCGCCGC

1090 1110 1130  
GCACCTTGGCAACTGGCCGGTCAAGACTATCTGGTGACGTCGGCCGCTTTCAGCCACC  
A P C E L A G Q D Y L V H V G R F H A T  
CGTGAACGCTTGACCGCCAGTCTGATAGACCACGTGCAGCCGGCGAAAGTGGGTGG

1150 1170 1190  
AAGCGCATGACCGCTGCTGAAAGCCTATGTGCAATCCGGTATTCAGGCCCGCTGCGCT  
K R H D R L L K A Y V Q S G I Q A P L A  
TTCGCCGTACTGGGGACGACTTTCGGATACACGTTAGGCCATAAGTCCGGGGGACCGA

1210 1230 1250  
TTTATTTTTCATCGGGGATGACGCCCGCTGCGCGAGGTCAAGCGTCTGGCGGCAGACTTG  
L I G T G D D A R V A E V K R L A A D L  
AACTAGCCGTGGCCCTACTGCGGGGCGAGCGGCTCCAGTTCCGAGACCGCGTCTGAAC

1270 1290 1310  
GGTATCGCAGAGCGGTGCTGTTCTCCGTTCCAGGCCAATCCCTATCCGTTTATCCGC  
G I A E R V L F L G F Q A N P Y P F I R  
CCATAGCGTCTCGCGCACGACAAGGACCAAAGTCCGGTTAGGGATAGGCAATAGGCG

1330 1350 1370  
CATGCCCTCGTGTGGTGTCTCAGCTCCGATAGCGAAGGGTTTGGCAATGTGCTGGTAGAA  
H A S L L V L S S D S E G F G N V L V E  
GTACGGAGCGACAACCAGAGTCCGAGGCTATCGCTTCCCAAACCGTTACACGACCATCTT

1390 1410 1430  
TCGCTGTGTGGCGCACGCCGGTGGTCAACCCCGCTGTCGGGGCGGCCCTGCGGAAATT  
S L L C G T P V V S T R C P G G P A E I  
AGCGAACACGCGCGTGGGCCAATAHTTCTCTTAAAGGCCCGCGGGACGCTTAA  
F416  
1450 1470 1490  
CTGGAAAAGCCGCATGGCTAACGCGTTGGCGGAATTAACGCGAGCGTCTGGCAGAA  
L E K A G M A N A L A E L N A A S L A E  
GACCTTTTTCGGCCGTACCGATTGCGCAACCGCCTTAATTTGCGTCCGAGGACCGTCTT

1510 1530 1550  
AAAATGGCGGAAATTTACGCCAATCCGCCGAGATAAATCAACAGCAATTGCTGAGCTAT  
K M A E I Y A N P P Q I N Q Q Q L L S Y  
TTTTACCGCCTTTAAATGCGGTTAGGCGGCTTATTTATTTTCTTAAACGACTCGATA  
F415

1570 1590 1610  
GGGCTGGAGCCTATTTGCCGTCATATATTTAGCTGAAAGAAAAATAAATAAATAA  
G L E P I C R Q Y I E L K E K +  
CCCGACCTCGGATAAACGGCAGTTATATACTCGACTTTCCTTTTATTATTTAATTATTT

1630 1650 1670  
TAAGGCAGGTGATGCCTGCCTTATTTCTTCGCTAGCTTAGCGCCTGCATTTCTGCCAA  
ATTCCGCTCCACTACGGACCGGAATAAAGAAGCGATCGAATCGCGGACGTAAGACGCTT  
+ S L A Q M K Q W  
1690 1710 1730  
ACCTCATCGACAGAAACATCTTCACAGTGCCTCGACTCACTCTGCAAAATATGATGACGG  
TGGAGTAGCTCTTTGTAGAAGTGTACGGGGCTGAGTGAAGCGTTTATACTACTGCC  
V E D V S V D E C H G S E S Q L I H H R

1750 1770 1790  
CGCTCCATGATGATGCGAGTACGTTTATCGGTATCGCCAAAGAACACCACCATATCCTTA  
GGCCAGGTACCTACGGTCCGCAAAATAGCCATAGCGGTTTCTTGTGGTGGTATAGGAAT  
G T W P H W S T K D Y D G F F V V M D K  
1810 1830 1850  
TTCAGCGCGGGCAAGATGCATCTGCCCGCGCTGCTGCACAGCACCCCGTCCGATAAAA  
AAGTCGGCCCGCTTCTACGTAGACGGGGCGCAGCGACGCTCTGCTGCTAGCTATTT  
F415  
N L A A A L H M Q G G D S C L V R D C L

1870 1890 1910  
TCGAACCCGCCAACAGCTCGCGCACCGAGCGCTCGGATAAAGCGCGACGCGTTCGTTT  
AGCTTGGCGGGTGTGCGAGCGCTGGCTCCGGCAGCCTATTTCCGCTCGCGAAGCAAA  
D F G G L L E R V S A T P Y L A V R E N  
1930 1950 1970  
TGGCACAGCGCAACAGCTGTTCTGCGCGTGTGATCGCGATGTGCTCGGGCGCCAGC  
ACCGTGTCCGGTGTGCGACAGACCGCGCAGACTAGCGGCTACAGCAGCGCCGCTCG  
Q C L A L L Q E A R Q Q D G I D D P A L  
1990 2010 2030





3010 3030 3050  
GCTGGCCATCGTTACCCCGCTTTGCCGATAACTGTGACCACAATGACCCCGACAGGTTCC  
L R H R Y P A L P I T V T T M T P T G S  
CGACGCGGTACCAATTCGGTTCAGTCTATTGACACTGGTGTACTGGGGCTGTCCAAG  
3070 3090 3110  
AGAAGCGGTCCAGTCCGCTTTCCGGCAAAGAGGTGCATCATGTCTATCTGCCCTACGATCT  
E R V Q S A F G K D V H H V Y L P Y D L  
TCTTGGCAGGTACAGCGAAAGCCGTTTCTGCACGTAGTACAGATAGACGGGATGCTAGA  
3130 3150 3170  
GCCCGGTTCCATGAACCGCTTCCTCGACCAGGTGAATCCCAAGCTGGTGATCATCATGGA  
P G S M N R F L D Q V N P K L V I I M E  
CGGGCCAAAGTACTTGGCGAAGGAGCTGGTCCACTTAGGGTTCGACCACTAGTAGTACCT  
3190 3210 3230  
AACCGAGCTATGGCCTAACCTGATCAACGCACTGCATCAGCGGCAAATCCCCCTGGTGAT  
T E L W P N L I N A L H Q R Q I P L V I  
TTGGCTCGATACCGGATGGACTAGTTGCGTGCAGTAGTCGCCGTTTAGGGGGACCACTA  
3250 3270 3290  
CGCCAATGCGGCCCTGTCCGGCGGATCCGCCCGCGCTATAAGAAAATTGGCGGATTCAT  
A N A R L S A R S A A G Y K K I G G F M  
GCGGTTACGCGCGACAGCCGCTAGGCGGCGCGATATTCTTTAAACCGCTAAGTA  
3310 3330 3350  
GCGGATATGCTGCGCGCATTACGCTGATCGCGCACAGAACCAGGAAGACGGCGATCG  
R D M L R R I T L I A A Q N Q E D G D R  
CGCGCTATACGACGCGCGTAATGCGACTAGCGCGTGTCTTGGTCCTTCTGCCGCTAGC  
3370 3390 3410  
TTTTATCGAACTGGCCCTGAAACGCTCGCAGCTGGCCGTTACCGGCAGCCTGAAATTCBA  
F I E L G L K R S Q L A V T G S L K F D  
AAAATAGCTTGACCCGACTTTGCGAGCGTCGACCGCAATGGCGTCCGACTTTAAGCT  
**EcoRV** 3430 3450 3470  
TATCTCCGTACCCCGAACTGGCCCGCGCGCTTACGCTGCGCCCAATGGGCGCC  
I S V T P E L A A R A V T L R R Q W A P  
ATAAGGCGAGTGGGCCCTTGACCGCGGGCGCGCAATGCGACGCGCGGTTACCCGCGG  
3490 3510 3530  
GCGCGCCCGGTGTGGATCGCCACCAGCACCATGAAGGGGAAGAAACCATCCTGCTCGA  
R R P V W I A T S T H E G E E T I L L E  
CGCGCGGGCCACACCTAGCGGTGGTCTGGGTACTTCCGCTTCTTTGGTAGGACGAGCT  
3550 3570 3590  
AGCGCACCGCAAGCTGCTGGAAAAACCCCGACCTGCTACTGATCCTGGTGCCGCGTCA  
A H R K L L E K H P D L L L I L V P R H  
TCGCGTGGCGTTCGACGACCTTTTGTGGGGCTGGACGATGACTAGGACCACGGCGCAGT  
3610 3630 3650  
CCCGGAACGCTTCCCGACCGCCAAGCACTGCTGACAGAAAGCCGGGTTACGCTACACCCCT  
P E R F P T A K E L V Q K A G F S Y T L  
GGCCCTTGGCAAGGGCTGGCGGTTCCCTCGACCATGCTTCCGGCCGAAGTCGATGTGGGA  
3670 3690 3710  
GCGCAGCAGCGGCAATCCCGTCCGGCAGCACCCAGGTGGTGTGATCGCGGATACCATGGG  
R S S G E I P S G S T Q V V I G D T M G  
CGCGTCTGCGCGCTTTAGGGCAGGCGGTGGTGGTCCACCCTAGCCGCTATGGTACCC  
3730 3750 3770  
CCGAACTCATGTCTGTACGGCATCGCCGATCTGGCCTTTGTGCGCGGCAAGCCTGGTGA  
E L M L L Y G I A D L A F V G G S L V E  
GCCTTGTAGTACGACGACATGCCGTAGCGGCTAGACCGAAACAGCCCGCTCGGACCACT  
3790 3810 3830  
ACGTGGCGCCATAACCCGCTGGAAGCCGCGCCACGCCATCCCGGTGCTGATGGGCCC  
R G G H N P L E A A A H A I P V L M G P  
TGCACCGCCGGTATTGGGCGACCTTCGGCGGGGTGCGGTAGGGCCACGACTACCCGGG  
3850 3870 3890  
GCACACCTTCAACTTTAAAGACATCTGCCCAAACCTTTCGACGGCCGAAGGCTGATCAC  
H T F N F K D I C A K L S Q A E G L I T

CGTGT TAACTTAAATTTT TTAGACGCGGTTTGAAGCGTCCGGCTTCCGGACTAGTG  
 3910 3930 3950  
 CGTGACCGAGTGGATTGCTGGTAAAGGAAGTGGAAACCTGTTGACCGACGAAGACTA  
 V T D V D S L V K E V E T L L T D E D Y  
 GCACTGGCTGCACCTAAGCGACCATTTCCTTCACTTTGGGACAACCTGGCTGCTTCTGAT  
 3970 3990 4010  
 CCGCCGTTACTACGGCCGCATGCGGTGGAAGTGTGTATCAGAATCAGGGAGCGTTGCA  
 R R Y Y G R H A V E V L Y Q N Q G A L Q  
 GGCGCAATGATGCCGGCGGTACGCCACCTTCAACATAGTCTTAGTCCCTCGCAACGT  
 4030 4050 4070  
 GCGCCTGCTGCAGCTGCTGGAACCGCACCTGCCGCCCGGAGTCACTGAATGAGCAGCGG  
 R L L Q L L E P H L P P R S H + M S S R  
 →**wa**  
 CCGGACGACGCTGACGACCTTTGGCGTGGACGGCGGGCCCTCAGTGACTTACTCGTCGGC  
 4090 4110 4130  
 CAAAAGCCTGTCGGTGGTATGATCGCCAAAAAGCGGGGCTGCTGCCGGACTGCCT  
 K S L S V V M I A K N E A G L L P D C L  
 GTTTTCGGACAGCCACCCTACTAGCGGTTTTTGGCTTCGGCCCGACGACGGCCTGACGGA  
 4150 4170 4190  
 GCGCTCTGTCGCCTGGGCCGATGAAATCATCGTGTGGACTCCGGCAGCGAGGACGACAG  
 R S V A W A D E I I V L D S G S E D D S  
 CGCGAGACAGCGGACCCGGCTACTTTAGTAGCAGACCTGAGGCCGTCGCTCCTGCTGTC  
 4210 4230 4250  
 CGTCGCGCTCGCCGAAAGTCTGGGTTTAAATTTTCACTTACACCGACTGGCAAGGATT  
 V A V A E S L G A K V F T H T D W Q G F  
 GCAGCGGCAGCGCTTTCAGACCCGCGTTTCAGAAGTGGTGTGGCTGACCGTTCCTAA  
 4270 4290 4310  
 CGGCAAGCAGCGCCAGCTGGCGCAAAGCTACGCCAGCCATGACTACGTATTGATGATCGA  
 G K Q R Q L A Q S Y A S H D Y V L M I D  
 GCCGTTGCTCGCGGTGACCCGCTTCGATGCGGTGGTACTGATGCATAACTACTAGCT  
 4330 4350 4370  
 CGCCGCAAAACGCTCACCCCGAAGTGGCGCAATCCATCGAGCGGGTGTGAACCGCGCC  
 A D E R V T P E L R Q S I E R V L N A P  
 GCGGCTGCTTGGCAGTGGGGCTTGACGCGTTAGGTAGCTCGCCACAACCTTGGCGGG  
 4390 4410 4430  
 GGACGACGGCGCGCTTACAGCTGCGCGCGGCAACCTGTTCCCTTGGCCGCTTCATGCG  
 D D G A V Y S C A R R N L F L G R F M R  
 CCTGCTGCCGCGCAATGTCGACGCGCGCGCTTGGACAAGGAACCGGCGAAGTACGC  
 4450 4470 4490  
 CCACAGCGGCTGGTATCCCGACCGGCTCAACCGCTGTACGCCAATTCGCTATCGCTA  
 H S G W Y P D R V N R L Y A N S R Y R Y  
 GGTGTGCGCGACCATAGGGCTGGCGAGTTGGCGGACATGCGGTTAAGAGCGATAGCGAT  
 4510 4530 4550  
 TAACGACGATCTGGTGCAGAGCTGCTGAACATCGGCGACGCCAAAGTATCCCCCTCAG  
 N D D L V H E L L N I G D A K V I P L S  
 ATTGCTGCTAGACCACGCTCGACGACTTGTAGCCGCTGCGGTTTCACTAGGGGGAGTC  
 4570 4590 4610  
 CGGCGATATGCTGCACCTGACCTGCGCGACTTCTTCGCTTTCAGCGCAAACAGCTGCG  
 G D M L H L T C R D F F A F Q R K Q L R  
 GCCGCTATACGAGCTGGACTGGACGGCGCTGAAGAAGCGGAAAGTGGCGTTTGTGACGC  
 4630 4650 4670  
 CTATGCGAAGAGTGGGCCACACAGCGCCACCGGCGGCAAGGTTGGCGCTATCTGTC  
 Y A E E W A T Q R H R A G K R C G Y L S  
 GATACGGCTTCTCACCCGGTGTGTCGCGGTGGCCCGCGCTTCGCAACGCGGATAGACAG  
 4690 4710 4730  
 CATCCTGACCCACACGCTCGGCGCTTCGTCAAAACCTGGCTGCTGCGGGCCGGCTTCCT  
 I L T H T L G A F V K T W L L R A G F L  
 GTAGGACTGGGTGTGGAGCGCGGAAGCAGTTTGGACCGACGACGCCCGCGCAAGGA  
 4750 4770 4790  
 CGACGGTAAACAGGGGTGCTGTTAGCGGTGGTCAACGCGCAATATACCTTCAATAAATA  
 D G K Q G L L L A V V N A Q Y T F N K Y

Annex

GCTGCCATTTGTCCCCAACGACAATCGCCACCAGTTGCGCGTTATATGGAAGTTATTTAT

4810 4830 4850  
 TGCCGCATTATGGGCATTGGGCCGCAACTACTCAGAGAAGTGAATCATGACCAGCAAAGC  
 A A L W A L G R N Y S E K + M T S K A  
 →*kdtB*  
 ACGCGTAATACCCGTAACCCGGCGTTGATGAGTCTCTTCACTTAGTACTGGTCGTTTCG

4870 4890 4910  
 CATCTATCCCGGGACGTTCCGATCCCATGACCAACGGCCACCTGGATTTAGTGACCGCGC  
 I Y P G T F D P M T N G H L D L V T R A  
 GTAGATAGGGCCCTGCAAGCTAGGGTACTGGTTGCGGGTGGACCTAATCACTGCGCGCG

4930 4950 4970  
 GTCGCTGATGTTCCGATCACGTGATTCTGGCCATCGCCGCCAGCCCGAGCAAAAAGCCGCT  
 S L M F D H V I L A I A A S P S K K P L  
 CAGCGACTACAAGCTAGTGCCTAAGACCGGTAGCGGCGGTGCGGCTCGTTTTTCGGCGA

4990 5010 5030 *F. K1f*  
 GTTCAGCCTGGATGAGCGTGTGGCGCTGGCCGACGCGAGGTACCTCCATCTGTCGAATCT  
 F S L D E R V A L A T Q V T S H L D N V  
 CAAGTCGGACCTACTCGCACACCCGCGACCGGTGCGTCCAGTGGAGCGTAGACCTGTTACA

5050 5070 5090  
 TAGGTTACTGGGCTTCAGCGAGCTGATGGCGCATTTCCGCGCTCACCAAGTGCATAT  
 E V L G F S E L M A H F A A H Q N A N I  
 CCTCCATGACCCGAAGTCGCTCGACTACCGGTAAAGCGGCGAGTGGTCTTACGGTTATA

5110 5130 5150  
 CTTGGTGGCTGGCGTGGGGCGGTGCTGACTTTGAGTACGAAGTGCAGCTGGCGAACAT  
 L V R G L R A V S D F E Y E L Q L A N M  
 GAACCAGCACCGGACCGGTCGACCAACTGAACTCATGCTTACGCTCGACCGCTTGTA  
 5100

5170 5190 5210  
 GAACCGCCATTGATGCGGACGCTGGAAGCGTGTTCCTGATGCCCTCCGAAGAGTGGTC  
 N R R L M P T L E S V F L M P S E E W S  
 CTTGGCGGTAACCTACGGCTGCGACCTTTCGCACAAGGACTACGGAAGGCTTCTCACCAG

5230 5250 5270 *EcoRV*  
 GTTCATCTCCTCATCACTGGTGAAGGAGGTGCCCCGACGCGCGGCATCTGCGGCTTT  
 F I S S S L V K E V A R H G G D I A P F  
 CAAGTAGAGGAGTAGTGACCACTTCCTCCAGCGGGCGGTGCCGCGCTATAAGCGGAAA

5290 5310 5330  
 CCTGCGCGATGTGGTCACTCAGGCGGTGATGGCGAAGCTCGCGCGCGGTGATGCTCAGC  
 L P D V V T Q A L M A K L A A A  
 GGACGGGCTACACCACTGAGTCCGCGACTACCGCTTCGAGCGGCGGCGCACTACGAGTCG

5350 5370 5390  
 GCTGGCAGCGTCGGCAAAGAAGTGTCTGCGCTGCCCGTCTGGCGGATTCAATCGGGC  
 CGACCGTCGACCGGTTTCTTCCAGCAGCGGACGGGACGAACCGCTAAGTTAGCCGC  
 R Q C R R C F F T S R Q G H K A S E I P

5410 5430 5450  
 TGGCGATGTGCGGCACGGTTCTCCGCGCGTCCGTAAGCTCCAGCTGCTGCGGAAGT  
 T G C T R C P E G A R G Y V Q L E Q A F  
 ACCCGGTTTGGCGTCCGACTGCAAAAAGTGGCGCAATGTGGTGGCGCCTGCTCGATGG  
 TGGGGCCAAACGGCAGGCTGACGTTTTTCAGCGCGTTACACCACGGCGGACGAGCTACC  
 Y G P K G D S Q L F D R L T T G G Q E I

5530 5550 5570 *BamHI*  
 AGCGTTGTAACACCGCCTTGTGGTCTTCGCCAACAGCGCGGCTTCGGCTTTGGTCAA  
 TCGCAACATTGTGGCGGAACCTACCAGAAGCGGTTGTCGCGCGAAGCGGAACCAAGTTC  
 S R Q L V A K I T K A L L A A E A K T L

5590 *BamHI*5610 5630  
 ATCCCGCGGACGATCGGGCAATCCCGCGCGTGAACAGCGATTCACTGGCGTAAATGT  
 TAGCGCGCCTGCTAGCCCGTCCGTAAGCGCGACTTGTGCTAAGTGACCGCATTTACA  
 S G A P R D P L I G A S F L S E S A Y I  
 5650 5670 5690  
 TACCGACCCCGACCCAGCTTATTATCCATCAGCCACGGTTTGTGATCAGCGTGGCTTAT  
 ATGGCTGGGCTGGTGGTCAATAATAGGTAGTGGTCCCAAACCTAGTCCGACCGCAATA



6670                      6690                      6710                      Tsp44  
 AAAATCAAATCAGCTCGAGCTTCGTATAGGGTATGGCCGCTCGTCAGGCTTTTA  
 TTTTAGTTTAGTCGAGCTCGAAGCATATCCCATACCGCGGAGCAGTCCGAAAAATCTCGG  
 6730                      6750                      6770  
 CATCTTAATAAATTCATACTGAGGAGACTCTCGTCATCAGGTAGAAACACACATCAGG  
 GTAGAGTCGTTGAAGTATGACTCCTCTGAGAGCAGTAGTCCATCTTTGGTGTSTAGTCC  
 6790                      6810                      6830  
 TCACAAACCTGCTGAGATAGGCTCTTGCGCCAAACCCAAAGATTCTCAAAGGTGGCGTAGT  
 AGTGTTTGGAGACTCTATCCGAGAACCGGTTTGGGTTCTAAGAGTTCCACCCGATCA  
 6850                      6870                      6890  
 ATACGCTCTGAAGCGTAAGTGCCTCAATTCOCGATCAGCTAAAGATCCACAAAGATCGCG  
 TATGCGGACTTCGCATTCACGAGTTAAGGGCTAGTCGATTTCTAGGGTGTTCAGCGC  
 6910                      6930                      6950  
 AAAAAATCGCTTAAAGCCATCCGGCTCGGCAAAAGAGACGCATTACCCCCGACCGATCA  
 TTTTTAGCGAATTCGGTAGGCGCGAGCCGTTTTCTCTCGGTAAGTGGGGTGGCTAGT  
 \* L W G R E A F S V C E G R G I  
 6970                      6990                      7010  
 CCAAATGATCGAGCACTCGGATCTCCAATAACTGGCAGGCTTCCACCCTGTTTCAAGTAA  
 GGTTTACTAGCTCGTAGCCTAGAGGTTATTGACCGTCCGAAAGTGGTGGACAAGTCAAT  
 V L H D L V R I E L L Q C A K V V Q E T  
 7030                      7050                      7070  
 TCAAACGGTCCGATTAATTTTTCAGCCTTACCCGAGGGGTGATTATGCGCGAGAATCA  
 AGTTTGCAGCCGTAAGTACCCAAAGTGGGCTCCCACTAATACGCGCTCTTAGT  
 I L R D A H S P E A K G S P H N H A L I  
 7090                      7110                      7130  
 GCGCGCGGCATTAGCCTTCAACGCTTCACGCACAATTTCTCTCGGGTAGACGACGACGC  
 CGCGCCCGTAATCGGAAGTTGCGAAGTGCCTGTTAAAGAGAGCCCATCTGCTGCTGCG  
 L A A A N A K L A E R V I E R P Y V V V  
 7150 **KpnI**                      7170                      7190  
 TGCTGATTTTACCGAGCAAAACATCTCCTGATGGCGAATAACCCGATGCTGATTGTCTAAAA  
 ACGACTAGCATTTTCGTTTGTAGAGGACTACCGCTTATGGGCTACGACTAACAGATTTT  
 S S I T G A F M E Q H R I V R H Q N D L  
 7210                      7230                      7250  
 ACAATACCAAAAAGACCTCTCGCTCAGCATGCGCCAGCAGGCTTGCAGATAATGCTGGG  
 TGTATGGTTTTTCTGGAGAGCGAGTGTACCGGGTCTCCGAAACGCTCTATTACGACCC  
 F L V L F V E R E R H A L L S Q L Y H Q  
 7270                      7290                      7310  
 TGACGCGCGGGTTAAGCATGGCGTTTTCTCGGAGAGATGGCTGGAAAAGAAAGCGAAGCG  
 ACTGCGCGCCCAATTCGTACCGCAAAAGGACGCTCTACCGACCTTTTCTCGGTTGCG  
 T V R P N L M A N E Q S L H S S F F R L  
 7330                      7350                      7370  
 CCAGCTCGGCAATCGCCTGCAACTGCGTATAGCTGGGCTCGCCAGGCGCTTTTGTACTGC  
 GGTGAGCGGTTAGCGGACGTTGACGCATATCGACCGCAGCGGGTCCGGAAAAACTGACG  
 A E A I A Q L Q T Y S A D G L G K Q S  
 7390                      7410                      7430  
 AAAAGCCTGATGATCGGCCACATCAGATGGTAAAGCGAGCGAATCGGCGCAGCAGCT  
 TTTTGGGACTACTAGCCGGCTGTAGTCTACCATTTCTGCTCGGCTTAGCCGCGTCTGCGA  
 C F A Q H D A S M L H Y L S G F R R L L  
 7450                      7470                      7490  
 GCTCGCCAGCTGCATTACGTGCACGCGCGGCAACCCGGTGGCAAGAAAAATGGCCAACA  
 CGAGGCGGTGACGTAATGACGTCGCGCCGTTGGGCCACGCGTTCTTTTACCGGTTGT  
 Q E A L Q M V H V G P L G T R L F I A L  
 7510                      7530                      7550  
 GCTCTGCGTCGGACAGCGCCGCGGCCCTGCATCAACAGCTTTTACGCGGCGCCAGCG  
 CGAGACCGAGCCTGTGCGGCGCCCGGGGACGTAGTTGTCGAAAAGTGGCCGCGGTGCG  
 L E A D S L A A A G Q M L L K E R P A L  
 7570                      7590                      Tsp46 7610  
 CGCCCCGCGCAGCAGCCACAGTCGGGTTGCTCATCTTTTCTTCCGTAAGAGGGCTACAG  
 GCGGGCCGCTGTCGGTGTGAGCCCAACGAGTAGCACAAAGGAGGACTTCCCGATGTC  
 A G P W C A V T P N S M  
**radC ←**  
 7630                      7650                      7670  
 CATGCCATCGCCCCCAGCGGTTTCGACAGGTTTGTATAACATTGCGAAGTGTTCGC  
 M P C A P Q R V R Q V F D N I A K C F A  
 → **dfp**  
 GTACGGTACGCGGGGGTTCGCGCAAGCTGTCCACAAACTATTGTAACGCTTCACAAAGCG

7690 7710 7730  
 AAAGCACAAATGTAACGCCCTGCAGCCATTGCGGAATCGCTCACCTGAACGGCGGATATGC  
 K H N V T P C S H C G I A H L N G G Y A  
 TTTCTGTTTACATTGCGGGACGTCGGTAAAGCCTTAGCGAGTGGACTTGCCGCTATAAG

7750 7770 7790 Tpe  
 TAAAATGGCGCATCTTTCGGCTTTCATTCGGACAATGATGATGACGGGACTTTTCGCTCAA  
 K M A H L S A F N R T M M M T G L S G K  
 ATTTTACCGCGTAGAAAGCCGAAAGTTAGCCTGTTACTACTACTGCCCTGAAAGGCGGTT

7810 7830 7850  
 ACPATATTTCTTGGCATCAGCGGGGATCGCCGCTACAAATGCCAGAGCTGGTGGG  
 H I V L G I S G G I A A Y K C P E L V R  
 TGTATAACACGAACCGTAGTCGCCCGCTAGCGGGGATGTTTACGGGTCTCGACCACGC

7870 7890 7910  
 CCGCCTGCGCGACAGGGGCGGGAAGTGCCTGGTGGTATGACCCACGCGCCAAAGCGTT  
 R L R D R G A E V R V V M T H A A K A F  
 GCGGACGCGCTGCCCGCGCTTACGCGCACCACTACTGGGTGCGGGGTTCCGCAA

7930 7950 7970 **BamHI**  
 CATTAGCGCGCTGACGCTGCAGGCCGTTTCCGGCCACCCGGTTCGGACGATCTGTTGGT  
 I T P L T L Q A V S G H P V S D D L L D  
 GTAATGCGCGACTGCGAGCTCCGGCAAAGCGGTTGGCCACAGGCTGCTAGACAACTT

7990 8010 8030  
 TCCCGCCCGAAGCCCGCATGGGCCACATCGAACTTGGCAAATGGCGGATCTGGTGAT  
 P A A E A A M G H I E L G K W A D L V I  
 AATGCGCGGCTTCCGGGTACCCGGTGTAGCTTGAACCGTTTACCGCCTAGACCACTA

8050 8070 8090  
 TCTGGCGCGGACCGCGATCTGCTGGCGCGCTCGCCGCGGCATGGCCAAAGGATCT  
 L A P A T A D L L A R V A A G M A N D L  
 AGACCGCGCGCTGGCGCTAGACGACCGCGCGAGCGCGCGCTACCGGTTGCTAGA

8110 8130 8150 Tpe  
 GCTGACTACCGTCTGCTGGCGACCGCCCTATCGCCGCGCCCGCTTCTATCTACTCA  
 L T T V C L A T D A P I A A A P A M N Q  
 CGACTGATGGCAGACCGCTGGCTGCGGGATAGCGCGCGGGGGCGGTACTTGGT

8170 8190 8210  
 GTAATATTTATCGCGCGCCGCCACGCAAGCCAACTGCAAACGCTGCACGCGCGGCAT  
 Q M Y R A A A T Q A N L Q T L H A R G M  
 CGTCTACATAGCGCGCGCGGTCGCTCCGGTTGGACGTTTGCAGCTGCGCGCGCGTA

8230 8250 8270  
 GCTGCTCTGGGGGCGGACAGCGGACGCCAGGCTGCGGCGAGCTCGCCCGGGCCGCAT  
 L L W G P D S G S Q A C G D V G P G R M  
 CGACGAGACCCCGGCTGTCGCGTCCGTCGCGACCGCTGCAGCCGGGCCCGCGTA

8290 8310 8330  
**BamHI**  
 GCTTATTCGCTGGACATCGTCGAGCTGGCGAACGGTCAATTTCTCCGCCCGCAGGATCT  
 L D P L D I V E L A N G H F S A P Q D L  
 CGACCTAATCGACCTGTAGCAGCTCGACCGCTTCCAGTAAAGAGCGGGGCGTCTAGA

8350 8370 8390  
 GCAACATTTGCACGTTATGATCACCGCCGCGCGACGCGGAAGCGTGGATCCGGTACG  
 Q H L H V M I T A G P T R E A L D P V R  
 CGTTGTAAACGTGCAATACTAGTGGCGCGCGGCTGCGCGCTTCCGACCTAGGCCATGC

8410 8430 8450  
 CTTTCATCAGCAATCACAGCTCCGGCAAATGGGCTTCGCCATCGCCCGCGCCGCGCGC  
 F I S N H S S G K M G F A I A R A A A A  
 GAAGTAGTCGTTAGTGTGAGGCGGTTTTTACCCGAAGCGGTAGCGGGCGCGCGCGCGG

8470 8490 8510  
 CCGCGCGCGCAGGTGACGCTGATCGCCGGGCGGTTGAGCCTGCCGACGCGCCAAAGGT  
 R G A Q V T L I A G P V S L P T P P K V  
 GCGCGCGCGTCCACTGCGACTAGCGGCCGCGCCACTCGGACGCTGCGGGGTTTCCA

8530 8550 8570 HAI  
 CACACGCTGGACGTCACACGCGCGTGGAGATGGAACAGCGGTTGCAACAGCGCGCCAA  
 T R V D V T S A L E M E Q A V Q Q R A T  
 GTGTGGCACCTGCAGTGGTCGCGGACCTTACCTTGTCCGCCAGTTGTGCGCGGTTG

8590 8610 8630  
 TTAGCA YANATTTTCATCTCCTGCGCCGCGTAGCCGACTACCGTCCCGAGCGGATCGC  
 Q Q Q I F I S C A A V A D Y R P E R I A  
 AGTCGTCGCTCTAAAAGTAGAGGACGCGCGGCATCGGCTGATGGCAGGGCTCGCCTAGCG

8650 8670 8690  
 CGATGAAAAATAAAAAACAGGGTGATGAAATCGTCTCAAGATGGTAAAAAACCCCTA  
 D E K I K K Q G D E I V L K M V K N P D  
 GCTACTTTTTTATTTTTTGTCCCACTACTTTAGCAGGAGTTCTACCATTTTTTGGGGT

**EcoRV** 8710 8730 8750  
 TATTTGTCCGCGCGTGGCGCGGATGACCAAAAATCGACCGTTTGTCTGGGGTTTGGCGC  
 I V A G V A A M T K N R P F V V G F A A  
 ATATCAGCGCGCCACCGCGCTACTGGTTTTTAGCTGGCAAACAGCACCCCAACGGCG

8770 8790 8810  
 CGAAACCCAGAATGTGGAAGATACGCGCGGCAAAACTGGCGCGTAAGAAGCTGGATTT  
 E T Q N V E E Y A R Q K L A R K K L D L  
 GCTTTGGGTCTTACACCTCTTATGCGCGCGTTTTTGACCGCGCATCTTCGACCTAAA

8830 8850 8870  
 GATTTGGCTAACGATGTATCGCTCGCAGAGCAGGGTTCAACAGCGACACCAATGCCCT  
 I C A N D V S L A E H G F N S D T N A L  
 CTAACCGGATTTGCTACATAGCGAGCGTCTGTGCCAAGTTGTCTGTGGTTACGGGA

8890 8910 8930  
 GCACCTTTTTTGGCAGGATGGAGATAAACGCCTGGCGCTGAGCGACAAGGCACTCCTTGG  
 H L F W Q D G D K R L A L S D K A L L G  
 CGTGGAAAAACCGTCTACCTCTATTTGCGGACCGGACTCGCTGTTCCGTGAGGAACC

8950 8970 8990  
 CCAACGTTTAATAGACGAGATAGTCAGCCGTATGATGAAAAAATCGACGTTAAGATCC  
 Q R L I D E I V S R Y D E K N R R +  
 M M K K I D V K I L  
 →dut

9010 9030 9050  
 TCGACCCGCGCATCGGTGAGGATTTCCCGCTACCGACCTACGCCACTCCGGGCTCCGCGG  
 D P R I G Q D F P L P T Y A T P G S A G  
 AGCTGGGCGCGTAGCCAGTCTAAAGGGCGATGGCTGGATGCGGTGAGGCCCGAGGCGGC

9070 9090 9110  
 GTCTCGACTGCGCGCCTGCCTGGACAGCGGGTGGAGCTGGCGCCGGGTGAAACCAGC  
 L D L R A C L D S A V E L A P G E T T L  
 CAGAGCTGGACGCGCGGACGGACTGTGCGGCCACCTCGACCGCGGCCACTTTGGTGCG

9130 9150 9170  
 TGCTGCCTACCGGTCTCGCGATCCATATCGCCGACGCGCGCTGGCGCGGGTAATCCTGC  
 L P T G L A I H I A D A G L A A V I L P  
 ACGACGGATGGCCAGAGCGCTAGGTATAGCGGTGCGCGCGGACCGCCGCATTAGGACG

9190 9210 9230  
 CGCGCTCAGGACTGGGCCATAAGCACGGCGTCTGCTGGGCAATCTGGTCCGGCTGATCG  
 R S G L G H K H G V V L G N L V G L I D  
 GCGCGAGTCTGACCCGGTATTCGTGCGCGACGACGCCGTTAGACCAGCCGGACTAGC

9250 9270 9290  
 ACTCCGATTATCAAGGCCAGCTGATGGTGTCTGGTCTGGAACCGCGGCCAGAGTCATTCA  
 S D Y Q G Q L M V S V W N R G Q K S F T  
 TGAGCTAATAGTTCCGGTCGACTACCACAGCCAGACCTTGGCGCCGGTCTTCAAGTAAGT

9310 9330 9350  
 CTATCGAACCGGGGAAACGCATCGCGCAGATGGTCTTGTGCCAGTGGTGCAGGCCGAGT  
 I E P G E R I A Q M V F V P V V Q A E F  
 GATAGCTTGGCCCGCTTGGTAGCGGCTTACCAGAAGCACGGTACCACGTCGCGCTCA

9370 9390 9410  
 TCAACCTGGTGAAGAGTTCCGACAGCAGCGCGCGGAAGGGGCTTCGGCCACTCGG  
 N L V E E F D S S E R G E G G F G H S G  
 AGTTGACCACCTTCTCAAGCTGTCTGCTCGCTCGCGCCGCTTCCGCGAAGCCGGTGAGCC

9430 9450 9470  
 GCGCCACTAAGCGCCACTCAATGCACGATGGCCGCGAGGAAACGTGCGCTGAACCTTG  
 R H +  
 CCGCGGTGATTCCGCGGTGAGTTACGTGCTACCGGCGCTCCCTTTGCGAGCGGACTTGGAAC

9490 9510 9530  
 CCTTTCCGGGGAGAAGGATGCTCTGCGGCAAGGTTTTACCAGCACAATTGCAGCGCACA  
 GGAAAGGCCCTCTTCTTACAGAGACCGCGTTCCAAAATGGCGCTGTTAACGTGCGGTG  
 9550 9570 9590  
 CCAGCGAGCGCGGAAAAAGGCCGTTAAGCCGCTGACCCAGCATCGTAAAAAGCTATCA  
 GGTCCGTGCGCGCTTTTCCGGCAATTGCGGACTGGGGTGTAGCATTTTTTCGATAGT

9610 9630 9650  
 CATAAGCCGCACAGAGCTGCTCTGCAGCGCGGTGCCCGGTTTTCCGTGAGTTAAGTT  
 GTATTCGGCGTGTCTCGGACGAGAGCTGCGCGGCCACGGGCCAAAGGCAGTCAATTCAA

9670 9690 9710  
 TTAGCAAGGGTCTAATCAGACATGGCAGAAAAAGAAAATACGAAAAGGAATCGGGCGGAG  
 M A E K E N T K R N R R E  
 → **ttk**  
 AATCGTCCCGAGATTAGTCTGTACCGTCTTTTCTTTTATGCTTTTCCTTAGCCGGCTC

9730 9750 9770  
 GAAATATTGCAGCGGTAGCCCAGATGCTGGAATCCAGCGACGGCAGCCAGCGCATTACC  
 E I L Q A L A Q M L E S S D G S Q R I T  
 CTTTATAACGTCCGCAATCGGGTCTACGACCTTAGGTCCGCTGCCGTCCGTCGGTAATGG

9790 9810 9830  
 ACCGCCAAGCTCGCCGGAACGTGGGTGTTTCTGAAGCTGCGCTGTACCGGCATTTCGCC  
 T A K L A A N V G V S E A A L Y R H F P  
 TGGCGGTCGAGCGGGCTTGCACCCACAAAGACTTCGACGCGACATGGCCGTAAGGGG

9850 9870 9890  
 AGCAAGACACGGATGTTGACAGTCTGATCGAGTTTATCGAAGACAGCCTGATCACCCGC  
 S K T R M F D S L I E F I E D S L I T R  
 TCGTTCTGTGCCTACAAGCTGTGACTAGCTCAAATAGCTTCTGTGCGACTAGTGGGCG

9910 9930 9950  
 ATCAACCTGATCTTGCAGGACGAGAAAGACGTTTAAATCGTCTGCGCCTGATTTACTG  
 I N L I L Q D E K E T F N R L R L I L L  
 TAGTTGGACTAGAACGTCCTGCTCTTCTCTGCAAATTAGCAGACGCGGACTAAAATGAC

9970 9990 10010  
 CTGATTCTGGGCTTTCGGGAACGCAACCCGGGGCTGACGCGCATCATGACCGCCACGGC  
 L I L G F A E R N P G L T R I M T G H A  
 GACTAAGACCCGAAACGCCCTTGGCTTGGGCCCGACTGCGCGTAGTACTGGCCGGTGGC

10030 10050 10070  
 CTAATGTTTGAACAGGATCGCCTGCAGGGCCGCATCAATCAGCTGTTCGAACGCATCGAG  
 L M F E Q D R L Q G R I N Q L F E R I E  
 GATTACAAATTTTCCTAATTTTACGTCGCCGGGTAGTTAGTCGACAAGCTTGGCTAGCTC  
 P r o t e i n

10090 10110 10130  
 GCGCAGCTGCGTCAGGTGCTGAAAGAGCGCAAATTCGCGAAGGCAAAGGCTTTATCGTC  
 A Q L R Q V L K E R K L R E G K G F I V  
 CGCGTCGACGCGAGTCCACGACTTTCTCGCGTTTAAACGCGCTCCGTTTCCGAAATAGCAG

10150 10170 10190  
 GATGAAACGCTGCTGGCGAGCCAGCTGCTGGCCTTCTGCGAAGGCATGTTGTGCGCTAT  
 D E T L L A S Q L L A F C E G M L S R Y  
 CTACTTTGCGACGACCGCTCGGTGACGACCGGAAGACGCTTCCGTACAACAGCGGATA

10210 **EcoRI** 10230 10250  
 GTGCGTTCGTTTTCGCTATCGCCCAACGAGGAATTCGACGCCGCTGGCCGCTGTTG  
 V R S E E R Y R P T Q E F D A R W P L L  
 CACGCAAGCTTAAAGCGATAGCGGGTTGCGTCTTAAGCTGCGGGCGACCGGCAAC

10270 10290 10310  
 GCGGCCAGCTGCAATAACGATAACCGGGCATGCCCGCGTTTTTACTTATATCCCGT  
 A A Q L Q \*  
 CGCCGGTCCGAGTTATTGCTATTGCGGCCCGTACGGGCCGCAAAAATGAATATAGGGCA

10330 10350 10370  
 ACTGCTCGGGTAAGCGCGCACCGCCAGATGATCCGCCATTTCCGGTTTCTCTTCCA  
 TGACGAGCGCCATTCGCGGTGGCGGGTCTACTAGGCGGTAAGGCCAAAGAGAAGGT  
 10390 10410 10430  
 GATAGGCGATCAGATCCTTCAGCGTCACGATCGAAATCACCTTGCAGTGGTAGTCCGCTT  
 CTATCCGCTAGTCTAGGAAGTCGCACTGCTAGCTTTAGTGGAAACGTCACCATCAGCGCAA  
 10450 10470  
 CCACTTCTGAATGGCGGAGATGTCGCGCGGGCCG  
 GGTGAAGGACTTACCGCCTCTACAGGCGCGCGGCG



## Annex II. Seqüència de nucleòtids de l'insert del còsmid cosR11.

**BamHI**

```

TACTCTGATTTCGGCCGGTGGAGCGTGAATCGGCCGTACGAAACAGGCTGATGGTTTTCA
-----
TTATBACTAAGCCGGCCACCTCGCACTTAGCCGCCAGTGCTTGTCCGACTACCAAAAGT
-----
CCTTCAACGCCACCGCCAGATGCAGCGGCCCGGTGTCCCGGTGACCAGAACATGGAAAC
-----
GGAAGTTGGGTGGCGGTCTAGGTGCCTGGGCCACAGCGCCACTGGTCTTGTACCTTTG
-----
TGTCGAGCAACGTCAGCAAGCCTTGACGCCCGTTTACCAGTCTGATTATCCACGCAGG
-----
ACAGCTCGTTGCAGTCGTTCGGAACGTCGGGGCAAATGGCTAGACTAATAGGTGCGTCC
-----
CCTGCGTTTGGCGGCCGATCAGGCTCATAAACTGTTGGCCTTGCCGTCGTAAGCGGTG
-----
GGACGCCAAACGCCCGGCTAGTCCGAGTATTTGACAACCCGGAACGGCAGCAGTTCCGCCAC
-----
CGCCAATCAGCACGATGCGCACATGGGGTGCCTTCGCCACCAGCTCATCGGCCAGGCGG
-----
GGGGTTAGTCGTGCTACGGGTGTAACCCACGAAGCGGTGGTCGAGTAGCCGGTCCGCGC
-----
CATAGTGGACACCGGCCAGCAACCGGACTCCGTCGATGCCCCAGTTGAAAACCGATGG
-----
GTATCAGCTGTGGCCGGTCTGTGCGCTGAGGCAGCTACGGGGTCAACTTTTGCTTACC
-----
TGGGATGGTCGTGCTTTGACGCCCGCTGATAGTCCACGGGAATTTCCATCGTCGGAT
-----
ACCTTACCAGCGACGAAAACCTGCGCGCGACTATCAGGTGCCCTTAAAGGTAGCAGCCTA
-----
CGTCGCTAATGCAACCGCAATGGAATCAGCTCGAGTTTGGCGGCACGAAATGGCCGT
-----
GCAGCGATGCCGTCCGGTTTACCTTTAGTCGAGCTCAAACGCCCGTGCCTTACCGGCA
-----
AATAATGGAAGATATAGTTGGTTAACCAAGGCTCCAGCCCGCAAATGCCCGAGCTGAGT
-----
TTATTACCTTCTATATCAACCAATGGTTCCGAGGTCCGGCGTTTACGGGCTCGACATCA
-----
TATCCCTGATGATGTAAGTTTGCCTCCGATGACGGCGCTGATGATGTCATAAGGCAGAT
-----
ATAGGGACTACTACATGAAACGGGGCGGTACTGCCGCGACTACTACAGTATTCCTCTTA
-----
RE11
-----
GAGAGTGCAGGATCAGCGCCAAATCCGGCTGATGTTCCCGCAGCGATTTACGCAATGGGC
-----
CTCTCAGTCTAGTGGCGTTTAGGCCGACTACAAGCGCGTCGTAAGTCTGTTACCCG
-----
GTATCGTCTTGATCTTGCTGTCCCAATACACCACGCGATCGTAATAGCGGCGGTTTCCA
-----
CATAGCAGAACTAGAACGACAGGGTTATGTGGTGCCTAGCATTATCGCCGGCAAAGGT
-----
CCAGTTCGGGTTTTTCTTGTGCACCACAGCGTGATGTGCGCGTTGGGATAGCGTTCCC
-----
GGTCAAAGCGCCAAAAGAACAACGTTGGTGGTGCACACTACACGCGCAACCCATATCGCAAGGG
-----
TCATCGCCCTCAATGCCGGGTGTTGAACATGAAGTCGCCCAAGCGCTGGTTCAGTACA
-----
AGTAGCGGGAGTTACGGCCGCACAACCTGTACTTCAGCGGGTTGCGGCACCACCTCATCT
-----
TGACGATATTGTCCTAAGTCTGGGCGCAGTCGAACGTCGCCTTGTCTGAAAACGGCGGT
-----
ACTGCTATAACAGGTTGACGACCCGCGTCAGCTTGACGCGGAACAGGACTTTTGCCGGCA
-----
ACTTCGCGGTATAGCGCCGAGGAACAGTCGCAACCTTAATTTCCATTTCTTCGACA
-----
TGAAGCGGATATCGCGGGTCCCTTGGTCAGCGTTGGAATTAAGGTAAAGAAGCTGT
-----
Δvaaf←
-----
TGTGCGTGTCTAGTTTCGCTTTAAGTTGATAAATACTCGGCCAGCGTCATGCCACCGTGCG
-----
ACACGCACGAATCAAGCGAAATTCAACTATTATGAGCCGGTGCAGTACGGGTGGCAGCG
-----
CTGCTGCAGCCAGTCAAACAGCTGCTCCAGATCGGGTACAGCACTTCGATATCCTGCTC
-----
GACGACGTCGGTCAGTTTGTGACGAGGTCAGCGCCATGTCGTGAAGCTATAGGACGAG
-----
GGTTTGAACGTCGGGCTGCCGCCGGCATAAACTCGGAGGAGTGCAGCATAAACTCGAC
-----
CCAAAACCTGCAGCCGAGCGGGGGCGTATTTGAGCCTCCTCAGTCGTATTTGAGCTG
-----
GTAGTCATGCCCTGCGCAACGACGCTCTCGGCCAGCTTATCATCTTGGCCACGTTGCC
-----
CATCAGTACGGGACGCGGTTGCTGCAGAGCCGGTGCGAATAGTAGAACCGGTGCAACGG
-----
GCCACTCGGCCGAGCCAGTTGACGGACGGCAACGCCGCTTCCCGCGACCGGATCATA
-----

```



```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGCGGTAGCTAGCGGTTACCTTTTTTGTCCCAGCGGCGGAGTGGAGCCTGTACTCGAC
.
.
.
GGCGTCTGCGCGCCTGAAGGGCAGCGCTACGATCTGGTGGTCAATCTGGCCGATCAG
A L L R R L K A Q R Y D L V V N L A D Q
.
.
.
CGCGACGACGCGGCGACTTCGCGTCCGATGCTAGACCACCAGTTAGACCAGGCTAGTC
.
.
.
TGGCGCAGGCCATCATCACGCGCCTGACCGGGCGGCGCATCCGTTTGGGCTTCGATTTC
W R S A I I T R L T G A R I R L G F D F
.
.
.
ACCGGTCGCGGTAGTAGTGCGCGGACTGGCCGCGCGTGGCAAACCGAAGCTAAAG
.
.
.
CCCAAACGCGCGGCTTCCTGTGGGCCACTGCCACACGAGCTGGTGCCGGTAGACAAT
P K R R G F L W R H C H T Q L V P V D N
.
.
.
GGGTTTGGCGGCCGAAGGACACCGCGGTGACGGTGTGCGTCGACCACGSCCATCTGTTA
.
.
.
CAGGCCACTTGCATACCGTCCGAACAAAATCTCTCGTTGCTGGCGCGCTGAACCTGCC
H A H L H T V E Q N L S L L A P L N L P
.
.
.
GTGCGGTTGACGATGGCAGCTTGTTTAGAGAGCAACGACCGCGGCGACTTGGACGGG
.
.
.
CGGCTCAATGAGCATGTCAACATGAGTTATGATCCGCACTATTGCAATTTGCAAA
.
.
.
A L N E H V T M S Y D P Q D W Q T C E Q
.
.
.
CGCGAGTTACTCGTACAGTGGTACTCAATACTAGCGTCTAACCCTGCGACTCGTT
.
.
.
CTGTGCGAGAAACAGGGCTCGCCGCGAGTTATATTGTGGTGCAGCCACCTCGCGCTGG
L L Q K Q G V A G S Y I V V Q P T S R W
.
.
.
GACAACGCTTTGTCCCGCAGCGCGCTCAATATAACACCAGTCCGGTGGAGCGGACC
.
.
.
TTCTTCAAATGCTGGAGCGAAGAGAAAATGGCCGCCACCCTCACCGCCTTGCAGCCGAC
F F K C W S E E K M A A T L T A L Q A D
.
.
.
AAGAAGTTTACGACCTCGCTTCTCTTTTACCGCGGTTGGGAGTGGCGGAACGTTCCGGCTG
.
.
.
GGCCACCGTGGTGTACCTCCGCGCCGAGCCAGAGAAAAGCCATGGTGGAGGCG
G H Q L V I T S G P D A R E K A M V E R
.
.
.
CCGGTGGTCAACCACTAGTGGAGGCCGGGGCTGCGGTCTCTTTTTCGGTACCGCTCGCG
.
.
.
ATTTTGGCGCTCTGCCCGCGCAGGGCGTAATCTCGTTGGCCGCGCAGCTGACGCTGCGC
I L A L C P P Q G V I S L A G Q L T L R
.
.
.
TAAAACCGCGAGACGGGCGGCTCCCGCATTAGAGCAACCGCGGCTCGACTGCGACGCG
.
.
.
CAACTGGCCGCCCTGATTGACCAGCCAGCTGTTTATCGGCGTGGACTCGGTGCCGATG
Q L A A L I D H A K L F I G V D S V P M
.
.
.
GTTGACCGCGGCGACTAACTGGTGGGTTGACAAAATAGCCGACCTGAGCCACGGCTAC
.
.
.
CATATGGCCCGCGCTGCAACGCGGTGGTGGGTTATTCCGGTGGTTCGAACTGAT
.
.
.
H M A A A L Q T P C V A L F G P S K L T
.
.
.
GTATACCGCGGCGGAGCTTTGCGGCACGACCGCAATAAGCCGGGAAGTTTCGACTGA
.
.
.
TCTGGCGGCCATGGCAGGCTACCGGCGCGTGTCTGGGCGGCGACTTGGCGAAGT
F W R P W Q A T G A V I W A G D F G E L
.
.
.
AAGACCGCGGTACCGTCCGATGGCCGCGCACCTAGACCCGCGCTGAAACCGCTTAC
.
.
.
CCCGACCGGAGCCATCGATACCGGCACCGATGAACGGTATCTCGACCTCATTCTTACA
P D P D A I D T G T D E R Y L D L I P T
.
.
.
GGGCTGGGCTGCGGTAGCTATGGCCGTTGGTACTTGCATAGAGCTGGAGTAAGGATGT
.
.
.
GAGCGGTTGATGACGCGCGCGGAGCAGCTGGCATGAAAGCATTCTTTTGGCGATCG
D A V I A A A R S T L A +
.
.
.
M K A F L L A I V
.
.
.
->vaaG
.
.
.
CTGCGCCACTAACGTCGGCGCGCCTCGTGGGACCGTACTTTCGTAAAGAAAACCGTAGC

```

TTCCGCCAAAATACCGCCCGGACGGGAGCCGAAACGTTTCGTTTCCCGGCCCTGAAGG  
 R R K Y R P D G G A E R F V S R A L K A  
 AAGCGGCTTTTATGGCGGGCTGCCGCTCGGCTTGCAAAGCAAAGGGCGGGGACTTCC

## SB15

CGCTGGAACAACAGGATCTCGATTTTACCTTTTATTCGGGAATGGCAGGGTGACGCCA  
 L E Q Q D L D L N V I T R E W Q G D A N  
 GCGACCTTGTGTCTAGAGCTAGACTTGCAAGTAGTGAGCGCTTACCGTCCCACTGCGGT

ATCCAAACTGGCATATTCACCTGTGTAACCCGTTGAAACTCGGCCGCATCAGTCGCGAAC  
 P N W H I H L C N P L K L G R I S R E R  
 TAGGTTTGACCGTATAAGTGGACACATTGGGCAACTTGAGCCGGCGTAGTCAGCGCTTG

GGGGCTTCGCGTGGCGGGCAGGGCGCTGTGGCAGAAAGAGCGCTTCGATCTGGTGAAA  
 G F A V A A R A L W Q K E R F D L V Q S  
 CCGCGAAGCGGCACCGCGGTCCCGGACACCGTCTTCTCGGAAGCTAGACCACGTTT

GCCATGAGCGCATTCGCGGTGCGATATCTACCGCGCGGCGACGGCGTACACCGCGCT  
 H E R I P G C D I Y R A G D G V H R R W  
 CGGTACTCGCGTAAGGGCGACGCTATAGATGGCGCGCGCTGCCGCATGTGGCGGGA

GGCTGCTGCAACGCGCGGCTGCTGCCCCAGTGGCGCGCAAGTGGCTGTTTTCCAACC  
 L L Q R A R L L P E W R R K W L F S N R  
 CCGACGACGTTGCGCGCGGACGACGGGCTCACCGGGGCTTACCAGACAAAAGGTTGG

GTTATACCGCTATGTGATGTGCGCGAGCGCGCATGTACCGCTCCGGAGCTGAAAG  
 Y H R Y V M C A E R A M Y A A P E L K A  
 CAATAGTGGGATACACTACACGGGCTCGCGCGGTACATGCGCGAGGCTCGACTTTC

CCGTGATCTGCAACGCCGAGATGATCAAACGGAAATCATCGCCGACTTTGGCGTGCCCG  
 V I C N A E M I K R E I I A D F G V P A  
 GCGAGTAGACGTTGCGGCTCTACTAGTTTGGCCTTTAGTAGCGGCTGAAACCGCACGGGC

CCGACAAAATCACGGTATCTATAACGCCATCGACAATCAAAGTCCCGCCCGCGACG  
 D K I T V I Y N A I D N Q K F P P A D E  
 GGCTGTTTTAGTGCCACTAGATATTGCGGTAGCTGTAGTTTTCAAGGGCGGGCGGCTGC

(plasmid cosFGR2) *Bam*HI

AGGCCAGCGCCGACGCTGCGTGAGCAATATCAGATCCCGCAACAGGCGCACTGCTT  
 A Q R R R L R E Q Y Q I P Q Q A H C L I  
 TCCGGTCCGGGCTGGGACGCACTCGTTATAGTCTAGGGCGTTGTCCCGGTGACGGATT

TTTCGTGGGCTCCGTTTCGAGCGCAAAGGCTGGCCCGCCATCCGCGCGTGGGG  
 F V G S G F E R K G L A A A I R A V A A  
 AAGCAGCCGAGCCAAAGCTCGGTTTCCGACCGGGCGGTTAGCGGGCACCGCC

CGACCGACGCCACCTCTTGGTGGTTCGGTAAAGATAAAGCCGAAAAGCGTTACCGGGCGC  
 T D S H L L V V G K D K A E K R Y R A L  
 GCTGGCTGTGGTGGAGAACCACGACCATTTCTATTTCCGGCTTTTCGCAATGGCCCGG

TGGCGCAGTCGCTGGGCTGGCGGATCGCATTCACCTTATGGCGGTGCAGAAGCAGACTC  
 A Q S L G C G D R I H F M G V Q K Q T L  
 ACCGCGTCAGCGACCCGACCGCTAGCGTAAGTGAATAACCGCACGCTTTCGCTCTGAG

TGCGTCTATCAGGCCGCGGATGCGCTGCTGCCGACGCTTACGATCCGTTCCCGA  
 P F Y Q A A D A L L L P T L Y D P F P N  
 ACCGCAAGATAGTCCGGCGCTACCGACGACGCGGCTGCGAAATGCTAGGCAAGGGCT

