



Departamento de Microbiología
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona

Caracterización del lipopolisacárido de *Aeromonas* mesófilas

Memoria presentada por Natalia Jiménez Blasco
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado
Microbiología Ambiental y Biotecnología
Bienio: 2003-2005

VºBº del director

VºBº de la codirectora

La doctoranda

Dr. Juan Tomás Magaña

Dra. Susana Merino Montero

Natalia Jiménez Blasco

Barcelona, mayo 2008

**4. Análisis molecular de las tres agrupaciones
génicas del núcleo del LPS de
A. hydrophila AH-3 (serotipo O:34)**

4.1 Resultados

4.1.1 Obtención y caracterización de mutantes de *A. hydrophila* AH-3 por inserción del transposón mini-Tn5::Km1

Con el fin de localizar la agrupación génica implicada en la biosíntesis del núcleo del LPS de *Aeromonas hydrophila* AH-3 (serotipo O:34), se realizó una mutagénesis basada en la inserción del elemento de transposición mini-Tn5::Km1 en un derivado de la cepa AH-3 resistente a la rifampicina (AH-405), mediante conjugación triparental entre esta cepa, actuando como cepa receptora, la cepa portadora del transposón (S₁₇₋₁ λpir mini-Tn5::Km1) y la cepa portadora del plásmido facilitador (HB101 + pRK2073) (ver Material y Métodos, 3.8.13.1).

Se obtuvo un banco de 3000 mutantes y se procedió a la selección de aquellos que carecieran de antígeno O en su LPS. Para lo cual, se comprobó la incapacidad de los mutantes de reaccionar positivamente en una inmunotransferencia a nivel colonial realizada con antisuero específico contra el antígeno O:34 de *A. hydrophila* (ver Material y Métodos, 3.7.4.1). Posteriormente, se comprobó la sensibilidad al bacteriófago PM1 de aquellas colonias que fueron negativas y se escogieron siete que resultaron ser resistentes al mismo (ver Material y Métodos, 3.6). Ya que el receptor de este bacteriófago es el antígeno O:34, los mutantes resistentes deberían carecer de antígeno O debido a una mutación en genes implicados en su biosíntesis, en la unión del antígeno O al núcleo o en la biosíntesis del núcleo del LPS.

4.1.1.1 Análisis fenotípico del LPS por SDS-PAGE y SDS-Tricine-PAGE

Para demostrar la ausencia de antígeno O y comprobar, además, un posible cambio en la movilidad electroforética del núcleo, lo que indicaría mutaciones en genes que posiblemente afectaran a su biosíntesis, se obtuvieron muestras de LPS de los mutantes seleccionados, crecidos en TSB a 30°C, y se analizaron, junto con la cepa AH-3 como control, por SDS-PAGE revelando los geles mediante tinción con nitrato de plata (ver Material y Métodos, 3.7.1.2 y 3.7.2.1). Ninguno de los mutantes presentaba las bandas de elevado peso molecular correspondientes al antígeno O del LPS, pero sólo tres de ellos mostraban cambios en el patrón de migración del núcleo, más bajo que el de la cepa parental. A la vista de estos resultados, las muestras fueron analizadas por SDS-Tricine-PAGE (ver Material y Métodos, 3.7.1.2 y 3.7.2.2) con el fin de conseguir una mejor

resolución de las fracciones de bajo peso molecular, aunque las diferencias ya eran apreciables en los geles de SDS-PAGE (Fig. 4.1).

Dado que una movilidad más rápida del núcleo puede ser indicativa de la pérdida de uno o varios residuos, lo que implica un menor peso molecular, se prosiguió con el estudio de estos tres mutantes, llamados AH-3005, AH-3006 y AH-3007. El núcleo del LPS del mutante AH-3007 presentaba una movilidad más rápida que el del mutante AH-3006, el cual, por su parte, presentaba la banda del núcleo más baja que la del mutante AH-3005, lo que era indicativo de que, seguramente, presentaban mutaciones en genes diferentes (Fig. 4.1).

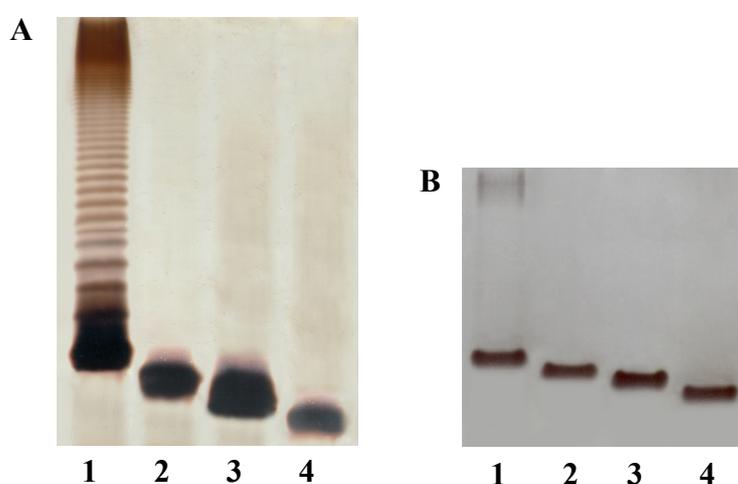


Figura 4.1. Geles de SDS-PAGE (A) y SDS-Tricine-PAGE (B) teñidos con nitrato de plata de muestras de LPS de *A. hydrophila* AH-405 (carril 1) y de los mutantes: AH-3005 (2), AH-3006 (3) y AH-3007 (4).

4.1.1.2 Caracterización genética de los mutantes AH-3005, AH-3006 y AH-3007

Para determinar, exactamente, la región afectada por la inserción del transposón mini-Tn5::Km1 en cada uno de los mutantes, se realizó el clonaje del transposón y la secuenciación de las zonas adyacentes al mismo.

4.1.1.2.1 Clonaje del transposón mini-Tn5::Km1

Para clonar el mini-Tn5::Km1, se realizó una digestión total del material genómico de los mutantes con las enzimas de restricción *EcoRV*, *EcoRI* y *PstI*. *EcoRV* no presenta diana dentro del transposón, de manera que permite el clonaje de las dos zonas adyacentes a su lugar de inserción, en cambio, *EcoRI* y *PstI* presentan una diana única en un extremo del transposón que no afecta a la resistencia a la kanamicina, permitiendo el clonaje de una

única zona adyacente. Mediante *Southern blot* e hibridación de las diferentes digestiones con una sonda marcada con digoxigenina de la región correspondiente a la resistencia a la kanamicina, se comprobó la inserción del transposón en un único punto del genoma de cada uno de los mutantes.

En la digestión realizada con *EcoRV*, en el caso del mutante AH-3006, o con *EcoRI*, en el caso del mutante AH-3007, el tamaño de las bandas que reaccionaron con la sonda resultó ser demasiado grande para su clonaje; o demasiado pequeño en el caso de *EcoRV* en el mutante AH-3005. De modo que el trabajo de clonaje del transposón se centró en las digestiones con *PstI*, ya que, en los mutantes AH-3006 y AH-3007, el tamaño de las bandas con esta digestión era menor que con las digestiones *EcoRI* y *EcoRV*, respectivamente; y en el mutante AH-3005, las bandas de las digestiones con *PstI* o *EcoRI* eran similares en tamaño.

El producto de las digestiones con *PstI* del ADN genómico de los mutantes se ligó al vector pBCSK, digerido con *PstI* y desfosforilado, y se transfirió por electroporación a la cepa XL1-Blue de *E. coli*. Las células transformadas, que contenían el mini-Tn5::Km1 y el extremo adyacente, se seleccionaron en placas de LB suplementadas con cloranfenicol y kanamicina. El ADN plasmídico purificado se digirió con *PstI* para comprobar la presencia del inserto, de alrededor de 3200 pb, 3300 pb y 2500 pb, en el caso de los mutantes AH-3005, AH-3006 y AH-3007, respectivamente, de las cuales unas 1960 pb pertenecían al transposón.

4.1.1.2.2 Secuenciación de las zonas adyacentes al transposón

A partir del ADN plasmídico purificado, se procedió a la secuenciación de la zona genómica adyacente al transposón empleando el cebador ISI del extremo del mini-Tn5::Km1 y los cebadores T3 y M13 que flanquean el lugar de clonaje del vector pBCSK. Las secuencias obtenidas se compararon con las de las bases de datos y se observó que en los tres casos contenían pautas abiertas de lectura (ORF, *Open Reading Frame*) que presentaban similitud con proteínas implicadas en la biosíntesis del LPS .

En el mutante AH-3005, la inserción del transposón tuvo lugar en un gen cuyo producto presentó similitud con una heptosiltransferasa de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, similar a la D-glicero-D-mano-heptosiltransferasa, denominada LbgB, de *Haemophilus ducreyi* implicada en la biosíntesis de su LOS. En el caso del mutante AH-3006, la secuencia de aminoácidos deducida del gen mutado presentaba una elevada

similitud con la β -1,4-glucosiltransferasa, WaaE, de varias bacterias. Además, a estos dos genes les seguía una nueva pauta abierta de lectura transcrita en dirección opuesta, cuyo análisis reveló similitud con diferentes heptosiltransferasas de distintas bacterias. El gen mutado, en el caso del mutante AH-3007, codificaba, también, una proteína que presentaba similitud con heptosiltransferasas de diferentes bacterias (Fig. 4.2).

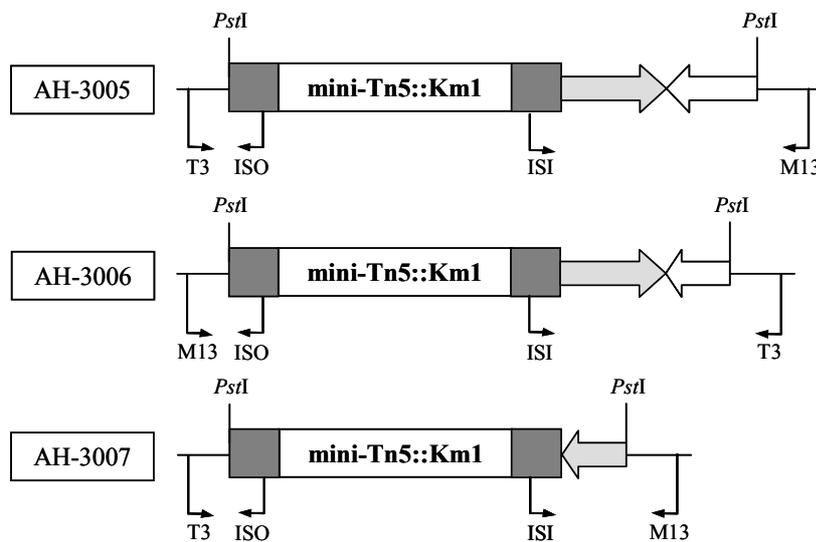


Figura 4.2. Esquema del fragmento clonado en pBCSK que muestra el lugar de inserción del mini-Tn5::Km1 (las tres ORF indicadas como una flecha gris) en los mutantes AH-3005, AH-3006 y AH-3007. Todas las ORF dibujadas están incompletas. La orientación del inserto respecto a los cebadores T3 y M13 se determinó a partir de las secuencias obtenidas.

4.1.2 Clonaje de las agrupaciones génicas del núcleo del LPS de *A.*

hydrophila AH-3

Para determinar la secuencia completa de los genes hallados, interrumpida por el transposón, y caracterizar el resto de la agrupación génica correspondiente a la síntesis del núcleo del LPS de la cepa AH-3, se procedió a la búsqueda de clones en una librería genómica de esta cepa.

4.1.2.1 Obtención de una sonda específica

A partir de la secuencia adyacente al lugar de inserción del transposón en los mutantes AH-3005, AH-3006 y AH-3007, se diseñaron cebadores para obtener sondas de cada uno de los genes mutados mediante PCR a partir de material genómico de la cepa AH-3 con dNTP marcados con digoxigenina (ver Material y Métodos, 3.8.12.1). Con los cebadores WaaQF6 y LBGBR1 se obtuvo un fragmento de 551 pb (sonda 1) correspondiente al gen mutado en la cepa AH-3005, con los cebadores A3waaEF1 y

A3waaER1 se amplificó una banda de 579 pb (sonda 2) correspondiente al gen mutado en la cepa AH-3006, y con los cebadores A3waaCF y A3waaCR, un fragmento de 559 pb (sonda 3) del gen mutado en la cepa AH-3007.

4.1.2.2 Hibridación de la librería genómica

Las sondas se emplearon en el escrutinio, mediante *Colony blot* (ver Material y Métodos, 3.8.12.2), de una genoteca de *A. hydrophila* AH-3 construida en pLA2917 y mantenida en *E. coli* DH5 α (ver Material y Métodos, 3.8.11). Como control positivo de la hibridación se utilizó la cepa AH-3 y, como control negativo, la cepa DH5 α con el cósmido pLA2917.

El revelado permitió detectar dos clones con reacción positiva para la sonda 2, que se denominaron COS-CORE2 y COS-CORE2b, y uno para la sonda 3, denominado COS-CORE3. Pero no se obtuvo ninguno que reaccionara con la sonda 1. Para confirmar la hibridación específica, se realizó la misma PCR empleada para la elaboración de la sonda a partir del ADN plasmídico de los clones y se utilizó el ADN genómico de la cepa AH-3 como control positivo y el ADN del vector de clonaje pLA2917 como control negativo. Los tres clones amplificaron una banda del tamaño esperado.

4.1.3 Secuenciación de las tres agrupaciones génicas del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3

4.1.3.1 Secuenciación de los genes no clonados a partir de PCR inversa

En función de la secuencia conocida de la zona adyacente al mini-Tn5::Km1 del mutante AH-3005, debido a que la sonda 1 no reveló ningún clon en la librería genómica, se diseñaron dos oligonucleótidos divergentes, WaaQF3 y WaaQR2, y se eligió la enzima de restricción *Pst*I para digerir el ADN cromosómico de la cepa AH-3, ya que no presentaba ninguna diana entre los dos cebadores. El producto de la digestión fue religado y se usó como molde en la reacción de PCR con la *AccuPrimeTM Taq* ADN polimerasa (ver Material y Métodos, 3.8.9.1.2). Se obtuvo una banda de 2662 pb, de las cuales 1011 pb ya eran conocidas, que fue purificada y secuenciada, inicialmente, con estos dos cebadores y, posteriormente, con otros que se fueron diseñando a medida que se iba completando la secuencia.

Este procedimiento se repitió, a medida que se secuenciaban los fragmentos, con diferentes religados de diferentes restricciones y distintos cebadores, prosiguiendo la

secuenciación de las bandas específicas obtenidas por los extremos correspondientes a la secuencia desconocida, hasta llegarse a secuenciar un poco más de las, aproximadamente, 8 Kb que constituían una agrupación génica, que fue denominada región 1 *wa*, que contenía 7 pautas abiertas de lectura implicadas en la biosíntesis del núcleo del LPS. Los oligonucleótidos que fueron empleados en la secuenciación y se muestran en el apartado 3.4.5 de Material y Métodos.

4.1.3.2 Secuenciación de los clones COS-CORE2 y COS-CORE3

La secuenciación del inserto de los clones COS-CORE2, COS-CORE2b y COS-CORE3 se inició usando los cebadores CSpLA y RpLA, complementarios a las secuencias que flanquean la diana *Bgl*III del cósmido pLA2917, y uno de los cebadores utilizados para la elaboración de la sonda, con el cual también se procedía a la comprobación de los mismos.

Los extremos de los insertos secuenciados con los cebadores RpLA y CSpLA no mostraron similitud con proteínas implicadas en la biosíntesis del LPS, a excepción del extremo del inserto del clon COS-CORE2b secuenciado con el cebador CSpLA, que presentaba similitud con una heptosiltransferasa de *Vibrio cholerae*. De manera que el clon COS-CORE2 contenía una agrupación génica completa, mientras que la del clon COS-CORE2b estaba truncada, por lo que solamente se continuó la secuenciación del primero.

A partir de los tramos de secuencia obtenidos con los cebadores iniciales de cada uno de los genes, se diseñaron nuevos cebadores que permitieran continuar la secuenciación del inserto en ambos sentidos y se prosiguió de esta manera hasta completar las secuencias. Los oligonucleótidos empleados en la secuenciación se detallan en los apartados 3.4.6 y 3.4.7 de Material y Métodos.

De esta forma, se secuenciaron a partir del clon COS-CORE2 un poco más de las, aproximadamente, 4750 pb de una agrupación génica, que recibió el nombre de región 2 *wa*, con 4 pautas abiertas de lectura. A partir del clon COS-CORE3, también se secuenciaron un poco más de las, aproximadamente, 2200 pb de otra agrupación génica, denominada región 3 *wa*, que contenía 2 pautas abiertas de lectura. Todas estas ORF estaban relacionadas con la biosíntesis del núcleo del LPS y ninguna de ellas se correspondía en su secuencia con las halladas en la otra región, ni tampoco con las de la región 1, de modo que se trataba de genes diferentes.

4.1.4 Análisis de las secuencias nucleotídicas de las tres regiones *wa* del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas de estas tres agrupaciones implicadas en la biosíntesis del núcleo del LPS, se procedió al análisis de las mismas. Se detectaron las posibles pautas de lectura abierta en función de la presencia de codones de inicio y de terminación y se descartaron, inicialmente, todas las pautas de menos de 100 pb.

4.1.4.1 Región 1 *wa* del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3

En la secuencia nucleotídica correspondiente a la región 1 *wa* implicada en la biosíntesis del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3 (ver Anexo 8.1), se identificaron 7 ORF (Fig. 4.3). Esta región estaba flanqueada por un gen que codificaba una putativa proteína reguladora TetR y por otro que codificaba una proteína hipotética. El contenido G+C de la agrupación secuenciada era del 56,2%.

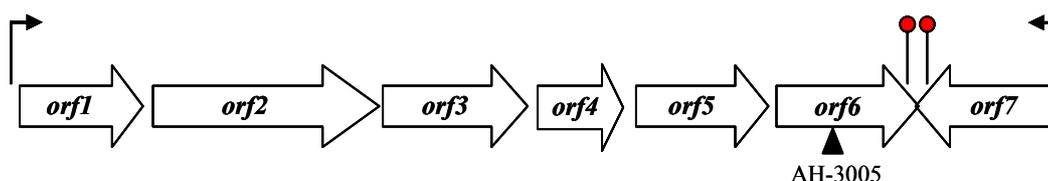


Figura 4.3. Esquema de la organización genética de la región 1 *wa* del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3. Los putativos promotores detectados se muestran con flechas finas y los posibles terminadores Rho-independientes, mediante círculos. El triángulo muestra el lugar de inserción del mini-Tn5::Km1 en el mutante AH-3005.

La secuencia nucleotídica y la secuencia primaria de la proteína deducida de cada una de las ORF fueron analizadas y comparadas con las de las bases de datos, con la finalidad de detectar aquellas que presentaran similitud con productos génicos, previamente descritos, implicados en la formación del LPS (Tabla 4.1).

Las presuntas unidades transcripcionales se determinaron tras la búsqueda de putativos promotores y terminadores Rho-independientes. En base a las posibles secuencias promotoras encontradas, una a 5' de la primera ORF y otra a 5' de la última; a las secuencias terminadoras, a 3' de las ORF 6 y 7; y a la dirección de transcripción de las ORF, la agrupación estaría compuesta por dos unidades transcripcionales: una constituida por las seis primeras ORF, de la 1 a la 6; y otra constituida por un gen monocistrónico transcrito en dirección opuesta, ORF7. Por otro lado, también se hallaron putativos RBS a 5' del inicio de traducción de cada ORF.

Por otro lado, no fue hallada ninguna secuencia JUMPStart con el elemento *ops* en la

región 5' del primer operón a pesar de su longitud.

Tabla 4.1. Análisis y características principales de las 7 ORF de la región 1 *wa* del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3, así como su localización en la secuencia nucleotídica (ver Anexo 8.1).

ORF		Proteína homóloga ¹ (número de acceso) (% Identidad/% Similitud)	Posición nucleotídica	G+C (%)	Tamaño (aa)	PM ² (kDa)	pI ²	GRAVY ²
n°	Nombre de la proteína							
1	HldD	HldD, ADP-L- <i>glicero</i> -D- <i>mano</i> - <i>heptosa</i> -6-epimerasa, <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Q9XCA1) (71/83)	591-1550	56,6	319	36,4	4,9	-0,387
2	WahA	WavL, Glicosiltransferasa, <i>Vibrio cholerae</i> (AAL77362) (64/77)	1601-3358	56,7	586	65,8	8,1	-0,145
3	WaaL	WaaL, Antígeno O ligasa, <i>Haemophilus influenzae</i> (ZP_00202015) (23/46)	3368-4579	50,7	403	44,9	9,29	0,661
4	WahB	Glicosiltransferasa, <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (ZP_00134259) (47/65)	4576-5241	54,9	221	24,4	6,75	0,148
5	WahC	Heptosiltransferasa I, II o III de diferentes bacterias (YP_109261) (28/42)	5327-6355	56,8	342	37,5	6,95	0,182
6	WahD	Heptosiltransferasa, <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (ZP_00134260) (26/48)	6410-7519	59,2	370	41,3	8,58	-0,071
7	WahE	Heptosiltransferasa II o III de diferentes bacterias (ZP_00145125) (27/54)	8525-7461	58,6	355	40,2	6,51	-0,091

¹ Las proteínas homólogas indicadas corresponden a las que presentaban mayor identidad y similitud con una función no putativa.

² El peso molecular (PM), el punto isoeléctrico (pI) y el promedio de hidrofobicidad de las proteínas (GRAVY) se han calculado usando el programa ProtParam de ExPASy.

4.1.4.1.1 ORF1: *hldD*

La ORF inicial fue denominada *hldD* puesto que codificaba una proteína de 319 aminoácidos que presentaba una identidad del 71% con la ADP-L-*glicero*-D-*mano*-*heptosa*-6-epimerasa, implicada en la biosíntesis de la L,D-Hep a partir de D,D-Hep (Kneidinger *et al.*, 2002), de varias enterobacterias. Además, la localización que ocupa es la que normalmente presenta en otras agrupaciones *wa* de otras bacterias.

4.1.4.1.2 ORF2: *wahA*

La ORF2 codificaba una proteína de 586 aminoácidos que mostraba un 77% de similitud con la glicosiltransferasa WavL de *Vibrio cholerae* y un 64% de similitud con una polisacárido desacetilasa de *Fusobacterium nucleatum*. Se trata de una única pauta

abierta de lectura con dos dominios conservados: la región N-terminal presenta un dominio de la familia 1 de las glicosiltransferasas (aminoácidos 156 a 303), cuyos miembros son capaces de transferir azúcares activados en la síntesis de diversas estructuras, incluido el LPS; y en la región C-terminal aparece un dominio polisacárido desacetilasa (aminoácidos 404 a 543). Ambos dominios también están presentes en la proteína WavL de *Vibrio cholerae* (Schild *et al.*, 2005). De manera que se pensó que esta proteína podría estar implicada en la transferencia de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y también en llevar a cabo su desacetilación.

Siguiendo la nomenclatura introducida por Reeves (Reeves *et al.*, 1996), el gen fue llamado *wahA* atendiendo a una designación que empezará por orden alfabético en los genes responsables de la biosíntesis del núcleo con una función específica no descrita, en la mayoría de los casos, en otras bacterias, y a la utilización de la letra “h” como indicativo de genes que pertenecen a *A. hydrophila*.

4.1.4.1.3 ORF3: *waaL*

La proteína codificada por la ORF3, de 403 aminoácidos, presentaba un nivel de similitud del 46% y una identidad del 23% con la antígeno O ligasa de *Haemophilus influenzae* y unos niveles similares con la ligasa de *Mannheimia succiniciproducens* y la de *Vibrio cholerae*. Además, el análisis de los dominios transmembrana de esta proteína predijo la presencia de 12 hélices transmembrana (aminoácidos 15-34, 39-55, 68-85, 90-106, 113-132, 149-165, 178-194, 199-215, 222-238, 331-348, 354-370 y 377-393), hecho característico de estas enzimas (Abeyrathne *et al.*, 2005), por lo que el gen fue llamado *waaL*.

4.1.4.1.4 ORF4: *wahB*

La proteína de 221 aminoácidos deducida de la ORF4 mostraba un 65% de similitud y un 47% de identidad con una glicosiltransferasa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y unos niveles similares con la galactosiltransferasa LbgA de *Haemophilus ducreyi*, implicada en la transferencia de una galactosa mediante un enlace $\beta(1-4)$ a una D,D-Hep de su LOS (Tullius *et al.*, 2002). Así mismo, presentaba un dominio conservado de la familia 25 de glicosiltransferasas (aminoácidos 1 a 184), en la que una de las actividades que se conocen es la de galactosiltransferasa. Por lo tanto, esta ORF podría codificar la β -1,4-galactosiltransferasa responsable de la unión del residuo de galactosa al cual se

ligará el antígeno O en el núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3 y al gen se lo llamó *wahB*.

4.1.4.1.5 ORF5: *wahC*

La ORF5 codificaba una proteína de 342 aminoácidos con similitudes no superiores al 50% con diversas heptosiltransferasas de diferentes bacterias, entre las que aparecían tanto la heptosiltransferasa I, WaaC, de *Burkholderia mallei* (42% de similitud), como la heptosiltransferasa II, WaaF, de *Fusobacterium nucleatum* (50% de similitud), como la heptosiltransferasa III, WaaQ, de *Klebsiella pneumoniae* (49% de similitud); tres tipos de enzimas que realizan enlaces diferentes y reconocen estructuras diferentes, en función de la heptosa que unen al núcleo interno. Se trataba de una proteína que, al presentar un dominio conservado de las glicosiltransferasas de la familia 9 (aminoácidos 99 a 339), tenía una función heptosiltransferasa, pero, por el momento, no se la podía implicar en la transferencia de una heptosa concreta del núcleo. El gen fue denominado *wahC*.

4.1.4.1.6 ORF6: *wahD*

La proteína codificada por esta ORF, de 370 aminoácidos, presentaba una similitud del 48% con una heptosiltransferasa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y niveles un poco más inferiores con la proteína LbgB de *Fusobacterium nucleatum* (46%) y de *Haemophilus ducreyi* (43%), enzima que transfiere una D,D-Hep mediante un enlace $\alpha(1-6)$ a una glucosa del núcleo de su LOS (Tullius *et al.*, 2002). El análisis de los dominios conservados reveló que se trataba de una proteína con función heptosiltransferasa al presentar el dominio de las glicosiltransferasas de la familia 9 (aminoácidos 102 a 343).

Correspondía, por otro lado, al gen en el cual se había producido la inserción del transposón mini-Tn5::Km1 en el mutante AH-3005 (ver apartado 4.1.1.2.2) y cuyo patrón de electroforesis del LPS mostraba que carecía de antígeno O y que su núcleo migraba más rápido que en el caso de la cepa parental AH-3 (Fig. 4.1).

En base a estos resultados, se podría tratar de una proteína con función α -1,6-D,D-heptosiltransferasa responsable de la unión de una D,D-Hep a la Glc del núcleo interno del LPS de *A. hydrophila* AH-3, de manera que su mutación provocaría la falta del lugar de unión de la galactosa y, por lo tanto, la ausencia del antígeno O y la presencia de un núcleo más pequeño que migraría más rápido. El gen fue llamado *wahD*.

4.1.4.1.7 ORF7: *wahE*

Esta ORF codificaba una proteína de 355 aminoácidos con un dominio de la familia 9 de glicosiltransferasas característico de enzimas con función heptosiltransferasa (aminoácidos 193 a 285) y presentaba similitudes con diversas heptosiltransferasas como la heptosiltransferasa II, WaaF, de *Fusobacterium nucleatum* (54% de similitud) y la heptosiltransferasa III, WaaQ, de diversas enterobacterias (similitud alrededor del 43%). Se descartó que se tratara del gen *waaQ* debido a que su proteína cataliza una unión $\alpha(1-7)$ no presente en el núcleo de *A. hydrophila* AH-3. El gen fue llamado *wahE*, pero no se le pudo asignar una función concreta en la transferencia de una heptosa del núcleo.

4.1.4.2 Región 2 *wa* del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3

En la secuencia nucleotídica correspondiente a la región 2 *wa* implicada en la biosíntesis del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3 (ver Anexo 8.2), se identificaron 4 ORF (Fig. 4.4). Esta región estaba localizada entre un gen que codificaba una proteína integral de membrana de función desconocida y el gen *coaD*, ORF que presentaba un 87% de similitud con esta enzima de otras bacterias y que está implicada en la biosíntesis de la coenzima A (Geerlof *et al.*, 1999). Su localización en un extremo de la agrupación es la que suele presentar en otras bacterias. El contenido G+C de esta región era del 64%.

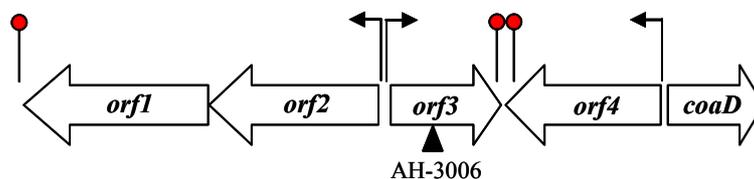


Figura 4.4. Esquema de la organización genética de la región 2 del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3. La última ORF indicada se corresponde con el gen *coaD*, no implicado en la biosíntesis del LPS. Los posibles promotores detectados se muestran con flechas finas y los posibles terminadores Rho-independientes, mediante círculos. El triángulo muestra el lugar de inserción del mini-Tn5::Km1 en el mutante AH-3006.

La secuencia de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos deducidas de las 4 ORF fueron comparadas con las de las bases de datos y se analizaron sus características principales (Tabla 4.2). A su vez, también se determinaron las presuntas unidades transcripcionales mediante la localización de posibles regiones promotoras y secuencias terminadoras Rho-independientes. La localización de presuntos promotores delante de las ORF 2, 3 y 4 y de posibles terminadores a 3' de las ORF 1, 3 y 4 indica que la agrupación está formada por tres putativas unidades transcripcionales: ORF2-ORF1, ORF3 (transcrita en dirección opuesta) y ORF4. Putativos RBS fueron también hallados a 5' del inicio de

traducción de cada una de las ORF.

Tabla 4.2. Análisis y características principales de las 4 ORF de la región 2 *wa* del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3, así como su localización en la secuencia nucleotídica (ver Anexo 8.2).

ORF		Proteína homóloga ¹ (número de acceso) (% Identidad/% Similitud)	Posición nucleotídica	G+C (%)	Tamaño (aa)	PM ² (kDa)	pI ²	GRAVY ²
nº	Nombre de la proteína							
1	WaaA	Kdo transferasa, <i>Vibrio cholerae</i> (AAF93409) (53/71)	1585-320	66	421	46,1	9,14	0,026
2	WahF	Heptosiltransferasa II, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (NP_796591) (57/73)	2702-1587	64,2	371	41	9,2	-0,15
3	WaaE	α -L-glicero-D-mano-heptosa β -1,4-glucosiltransferasa, <i>Vibrio fischeri</i> (YP_203517) (56/70)	2944-3732	63	262	29,3	9,28	-0,068
4	WaaF	Heptosiltransferasa II, <i>Vibrio vulnificus</i> (AAO09322) (56/73)	4837-3794	63,9	347	38,6	8,7	-0,197

¹ Las proteínas homólogas indicadas corresponden a las que presentaban mayor identidad y similitud con una función no putativa.

² El peso molecular (PM), el punto isoeléctrico (pI) y el promedio de hidrofobicidad de las proteínas (GRAVY) se han calculado usando el programa ProtParam de Expasy.

4.1.4.2.1 ORF1: *waaA*

La proteína codificada por la ORF1, de 421 aminoácidos, presentaba una similitud del 71% con la Kdo transferasa, encargada de unir el residuo de Kdo al lípido A, de *Vibrio cholerae* y una similitud, también elevada, con la Kdo transferasa de otras bacterias, por lo que el gen fue denominado *waaA*. Además, presentaba un dominio conservado de la familia 1 de glicosiltransferasas (aminoácidos 232 a 399) y el análisis del perfil hidrofóbico de la proteína reveló un posible dominio transmembrana (aminoácidos 5 a 23).

4.1.4.2.2 ORF2: *wahF*

La proteína de 371 aminoácidos codificada por la ORF2 presentaba un 73% de similitud y un 57% de identidad con la heptosiltransferasa II de *Vibrio parahaemolyticus*, y niveles similares, también, con esta proteína de otras especies de este género y de diferentes bacterias Gram negativas tales como *Photobacterium* y *Pseudomonas*. Contenía un dominio conservado de la familia 9 de glicosiltransferasas característico de enzimas con función heptosiltransferasa (aminoácidos 69 a 323). Debido a los resultados hallados en el análisis de la ORF4 (ver apartado 4.1.4.2.4), se pensó que una de las dos podría codificar la heptosiltransferasa II, WaaF, que transfiere la HepII mediante un enlace $\alpha(1-3)$ a la HepI

del núcleo interno, mientras que la proteína codificada por la otra ORF realizaría un enlace similar de otra heptosa. Se decidió denominar a este gen *wahF*.

4.1.4.2.3 ORF3: *waaE*

Esta ORF codificaba una proteína de 262 aminoácidos que presentaba un dominio conservado de la familia 2 de las glicosiltransferasas (aminoácidos 7 a 195), implicadas, en algunos casos, en la transferencia de glucosa a partir del azúcar activado. Mostraba una similitud del 70% y una identidad del 56% con una α -L,D-Hep β -1,4-glicosiltransferasa de *Vibrio fischeri*, niveles similares con la proteína LgtF de *Haemophilus ducreyi* (Filiatrault *et al.*, 2000), y un 65% de similitud y un 48% de identidad con la proteína WaaE de *Serratia marcescens* (Coderch *et al.*, 2004). Se trata de enzimas que añaden un residuo de glucosa mediante un enlace β (1-4) a la HepI del núcleo interno. Este gen podría estar implicado en el mismo tipo de transferencia en el núcleo interno de *A. hydrophila* AH-3 y fue llamado *waaE*.

Por otro lado, el LPS del mutante AH-3006, en el que la inserción del transposón se había producido en este gen (ver apartado 4.1.1.2.2), carecía de antígeno O y su núcleo migraba mucho más rápido que el de la cepa parental AH-3 (Fig. 4.1), lo que concordaría con el hecho de haber perdido la Glc del núcleo interno, impidiendo la construcción del resto del núcleo y la ligación del antígeno O.

4.1.4.2.4 ORF4: *waaF*

La proteína codificada por esta ORF, de 347 aminoácidos, presentaba una elevada similitud, del 73%, con la heptosiltransferasa II de *Vibrio vulnificus*. A su vez, también mostraba una similitud del 64% con una heptosiltransferasa de *Haemophilus influenzae* y con la heptosiltransferasa III de *Haemophilus ducreyi*.

Esta proteína contenía un dominio conservado de la familia 9 de las glicosiltransferasas (aminoácidos 253 a 303), característico de una función heptosiltransferasa, y podría ser que estuviese implicada en la transferencia de la HepII mediante un enlace α (1-3) a la HepI del núcleo interno o en la transferencia de otra heptosa con un enlace similar, función, por otro lado, también probable para la ORF2 (ver apartado 4.1.4.2.2). Este gen recibió el nombre de *waaF*.

4.1.4.3 Región 3 wa del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3

En la secuencia nucleotídica correspondiente a la región 3 wa implicada en la biosíntesis del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3 (ver Anexo 8.3), se identificaron 2 ORF (Fig. 4.5). Esta región estaba flanqueada por un gen que codificaba una guanilato quinasa y por otro que contenía un dominio GGDEF (diguilato ciclasa). El porcentaje de G+C de esta agrupación era del 61,8%.

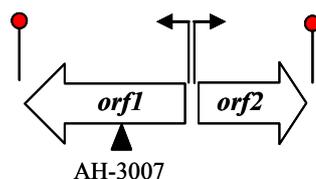


Figura 4.5. Esquema de la organización genética de la región 3 del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3. Los posibles promotores detectados se muestran con flechas finas y los posibles terminadores Rho-independientes, mediante círculos. El triángulo muestra el lugar de inserción del mini-Tn5::Km1 en el mutante AH-3007.

La secuencia nucleotídica y las secuencias de aminoácidos deducidas de las 2 ORF fueron analizadas y comparadas con las de las bases de datos (Tabla 4.3). En base a la localización de posibles secuencias promotoras a 5' de cada una de las ORF, las cuales también presentaban presuntos terminadores Rho-independientes a 3', esta región estaría constituida por dos unidades transcripcionales monocistrónicas, transcritas en dirección opuesta. También se hallaron, además, putativos RBS a 5' del inicio de traducción de cada ORF.

Tabla 4.3. Análisis y características principales de las 2 ORF de la región 3 wa del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3, así como su localización en la secuencia nucleotídica (ver Anexo 8.3).

ORF		Proteína homóloga ¹ (número de acceso) (% Identidad/% Similitud)	Posición nucleotídica	G+C (%)	Tamaño (aa)	PM ² (kDa)	pI ²	GRAVY ²
nº	Nombre de la proteína							
1	WaaC	Heptosiltransferasa, <i>Vibrio cholerae</i> (ZP_00757651) (58/73)	1476-421	63,7	351	38,5	9,19	-0,081
2	KdkA	Kdo kinasa, <i>Vibrio alginolyticus</i> (ZP_01261295) (44/65)	1661-2374	61,3	237	27,2	9,32	-0,432

¹ Las proteínas homólogas indicadas corresponden a las que presentaban mayor identidad y similitud con una función no putativa.

² El peso molecular (PM), el punto isoeléctrico (pI) y el promedio de hidrofobicidad de las proteínas (GRAVY) se han calculado usando el programa ProtParam de ExPASy.

4.1.4.3.1 ORF1: *waaC*

La proteína codificada por la ORF1, de 351 aminoácidos, presentaba niveles de un

73% de similitud y de un 58% de identidad con una heptosiltransferasa de *V. cholerae* y niveles parecidos con heptosiltransferasas de otras especies del mismo género. Los niveles de similitud e identidad eran un poco inferiores con heptosiltransferasas de diferentes especies de *Shewanella*. Por otro lado, mostraba una similitud del 45% y una identidad del 23% con la heptosiltransferasa I de *Helicobacter pylori* y niveles similares con la de *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* o *Klebsiella pneumoniae*. Estos niveles eran más altos en el caso de la heptosiltransferasa I de *Haemophilus influenzae*, OpsX (65% de similitud y 49% de identidad). La proteína presentaba un dominio conservado de la familia 9 de las glicosiltransferasas (aminoácidos 73 a 317), característico de una función heptosiltransferasa.

Éste había resultado ser el gen en el que se había insertado el transposón en el mutante AH-3007 (ver apartado 4.1.1.2.2). Su LPS carecía de antígeno O y su núcleo migraba mucho más rápido que el de la cepa parental e incluso que el de los otros mutantes por inserción del transposón (Fig. 4.1), lo que podría estar de acuerdo con una mutación profunda a nivel del núcleo interno. Por lo tanto, podría estar implicado en la transferencia de la primera heptosa del núcleo y el gen recibió el nombre de *waaC*.

4.1.4.3.2 ORF2: *kdkA*

Esta ORF fue denominada *kdkA* ya que codificaba una proteína de 237 aminoácidos con un 65% de similitud y un 44% de identidad con la Kdo kinasa de *V. alginolyticus* y niveles similares con la de otras especies del género *Vibrio*, de *Photobacterium* y de *Shewanella*. Esta enzima estaría implicada en la fosforilación de la posición 4 del único Kdo del núcleo de *A. hydrophila* AH-3 (White *et al.*, 1999).

4.1.5 Construcción de mutantes en diversos genes de las tres regiones *wa* del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3

Con el fin de determinar y confirmar, en algunos casos, la funcionalidad de los genes secuenciados en las tres regiones *wa*, aparte de los mutantes por inserción del transposón mini-Tn5::Km1, se construyeron mutantes, o se intentó su obtención, en cada una de las ORF restantes, a excepción de la ORF que codificaba la epimerasa HldD. Los mutantes recibieron el nombre del número de la ORF y de la región, así, por ejemplo, AH-3Δ2.1 hace referencia al mutante en la ORF2 de la región 1 *wa*.

4.1.5.1 Construcción de mutantes mediante recombinación en un punto en los genes *wahE* y *waaF*

Para la construcción del mutante en el gen *wahE* (AH-3 Δ 7.1) y del mutante en el gen *waaF* (AH-3 Δ 4.2) mediante mutagénesis dirigida por recombinación en un punto (ver Material y Métodos, 3.8.13.2), se amplificaron fragmentos internos de los genes utilizando ADN cromosómico de la cepa AH-3. Las parejas de cebadores utilizadas en cada caso se hallan descritas en los apartados 3.4.5 y 3.4.6 de Material y Métodos. Los productos amplificados, de 540 pb, en el caso del gen *wahE*; y de 600 pb, en el caso del gen *waaF*, se ligaron al vector de clonaje pGEM-T *easy* y se transformaron a la cepa *E. coli* XL1-Blue mediante electroporación, seleccionando los transformantes en placas de LB suplementadas con ampicilina, X-Gal e IPTG a una temperatura de incubación de 37°C. Se seleccionaron las colonias blancas para comprobar la presencia de los plásmidos recombinantes y recuperar los insertos mediante la extracción de los plásmidos y su posterior digestión con *NotI*, en el caso de la construcción con el fragmento interno del gen *wahE*, y con *EcoRI*, en el caso del fragmento interno del gen *waaF*.

A continuación, los extremos protuberantes 5' del fragmento interno del gen *wahE* se convirtieron en romos mediante tratamiento con el fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa y se ligó el inserto al vector suicida pFS100, digerido con *EcoRV* y desfosforilado. Por otro lado, el fragmento truncado del gen *waaF* se ligó al mismo vector digerido con *EcoRI* y desfosforilado. Las ligaciones se transformaron mediante electroporación a la cepa *E. coli* MC1061 (λ pir) y la selección se llevó a cabo en placas de LB suplementadas con kanamicina a una temperatura de 30°C. Los transformantes seleccionados se comprobaron mediante amplificación del inserto clonado utilizando los cebadores pGPfor y pGPrev del vector pFS100, adyacentes a las dianas *EcoRI* y *EcoRV* del mismo.

Una vez obtenidas las construcciones en la cepa MC1061 (λ pir), se transfirieron mediante conjugación triparental a la cepa de *A. hydrophila* AH-405 (AH-3 resistente a la rifampicina) y los transconjugantes se seleccionaron en placas de TSA suplementadas con rifampicina y kanamicina a una temperatura de 30°C.

Con el fin de realizar una primera selección de posibles colonias mutantes, se llevó a cabo una PCR con cebadores, separados no más de 4 Kb, externos a los utilizados para amplificar la región interna de cada uno de los genes, de manera que una PCR negativa

realizada con la *EcoTaq* ADN polimerasa era indicativa de una probable inserción del vector en el lugar deseado del cromosoma, debido a la imposibilidad de amplificación de fragmentos tan grandes por parte de la enzima. Los cebadores externos utilizados para comprobar los posibles mutantes en los genes *wahE* y *waaF* fueron las parejas WaaQF6 y YicCF1 (2020 pb), y A3coaDrev y A3waaEF (1923 pb), respectivamente. En ambos casos, se seleccionaron aquellos en los que no se producía amplificación de la banda, la cual sí aparecía en el control realizado con la cepa AH-3.

La comprobación final de la correcta inserción del vector pFS100 en los genes *wahE* y *waaF* en los transconjugantes seleccionados se realizó mediante *Southern blot*, empleando ADN genómico digerido con *Bam*HI, en el caso del mutante AH-3 Δ 7.1, y con *Eco*RV, en el caso del mutante AH-3 Δ 4.2. El ADN genómico de la cepa parental se digirió también con los mismos enzimas y se utilizaron sondas específicas marcadas con digoxigenina para los genes *wahE* y *waaF*, en función de los transconjugantes analizados. Los cebadores utilizados en la elaboración de las sondas están descritos en los apartados 3.4.5 y 3.4.6 de Material y Métodos. La elección de estas dianas obedece a que *Bam*HI y *Eco*RV se hallan en el vector pFS100 pero no en los genes *wahE* y *waaF*, respectivamente, por lo que se generan dos fragmentos diferentes que contienen el gen truncado en el material genómico mutado por recombinación en un punto, mientras que en la cepa parental, tan sólo aparece un fragmento que contiene el gen completo.

4.1.5.2 Intento de construcción de mutantes mediante recombinación en un punto en los genes *waaA* y *kdkA*

Se intentó construir, sin éxito, el mutante en el gen *waaA*, que codifica la Kdo transferasa, y el mutante en el gen *kdkA*, que codifica la Kdo kinasa, mediante mutagénesis dirigida por recombinación en un punto (ver Material y Métodos, 3.8.13.2). Para ello, se amplificaron fragmentos internos de ambos genes a partir de ADN cromosómico de la cepa AH-3 con las parejas de cebadores descritas en los apartados 3.4.6 y 3.4.7 de Material y Métodos. Los productos amplificados, de 726 pb, en el caso del gen *waaA*; y de 494 pb, en el caso del gen *kdkA*, se ligaron al vector pGEM-T *easy* y las ligaciones se transformaron a la cepa *E. coli* XL1-Blue mediante electroporación. La selección de los transformantes se realizó en placas de LB suplementadas con ampicilina, X-Gal e IPTG a una temperatura de incubación de 37°C. Se comprobó la presencia de los plásmidos recombinantes en las colonias blancas mediante su extracción y digestión con *Eco*RI, la cual permitió, también,

recuperar los insertos.

Ambos insertos se ligaron, a continuación, al vector pFS100 digerido con *EcoRI* y desfosforilado y las ligaciones se transformaron mediante electroporación a la cepa *E. coli* MC1061 (λ pir), seleccionándose los transformantes en placas de LB suplementadas con kanamicina a una temperatura de 30°C. Los transformantes seleccionados se comprobaron mediante amplificación del inserto clonado utilizando los cebadores pGPfor y pGPprev del vector pFS100.

Finalmente, se transfirieron las construcciones obtenidas en la cepa MC1061 (λ pir) mediante conjugación triparental a la cepa de *A. hydrophila* AH-405 y los transconjugantes se seleccionaron en placas de TSA suplementadas con rifampicina y kanamicina a una temperatura de 30°C. En ambos casos, aparecieron muy pocas colonias en los tres intentos de conjugación realizados. Además, todos los candidatos resultaron ser positivos para las PCR con los cebadores externos utilizados para comprobar la posible inserción del plásmido, las cuales se realizaron con las parejas A3waaAR3 y A3waaFR2 (1802 pb), en el caso de la comprobación del mutante en el gen *waaA*, y 2.3-F y 2.3-R (1099 pb), en el caso de la comprobación del mutante en el gen *kdkA*.

Debido al fracaso en la obtención de mutantes en estos dos genes, se planteó la posibilidad de que estas mutaciones provocasen un fenotipo letal en *A. hydrophila* AH-3.

4.1.5.3 Construcción de mutantes mediante doble recombinación en los genes *wahA*, *waaL*, *wahB*, *wahC* y *wahF*

La construcción de mutantes en los genes *wahA* (AH-3 Δ 2.1), *waaL* (AH-3 Δ 3.1), *wahB* (AH-3 Δ 4.1), *wahC* (AH-3 Δ 5.1) y *wahF* (AH-3 Δ 2.2) se realizó mediante mutagénesis dirigida por doble recombinación con el fin de producir una deleción en el gen sin alterar la pauta de lectura y evitando un posible efecto polar en el resto de genes de su agrupación (ver Material y Métodos, 3.8.13.3).

A partir del ADN cromosómico de la cepa AH-3, se realizaron las PCR A-B y C-D para obtener los dos fragmentos que sirvieron de molde en las PCR A-D obteniéndose copias delecionadas de cada uno de los genes de 1380 pb (*wahA*), 1223 pb (*waaL*), 1364 pb (*wahB*), 1346 pb (*wahC*) y 1173 pb (*wahF*). Los cebadores utilizados en cada una de las PCR para la construcción de cada uno de los mutantes se describen en los apartados 3.4.5 y 3.4.6 de Material y Métodos. Los extremos de las construcciones A-D se digirieron con la

enzima de restricción cuya diana se había incluido en el diseño de los cebadores A y D: *SalI*, en el caso de los genes *wahA*, *waaL* y *wahF*; y *BglII*, en el caso de los genes *wahB* y *wahC*. El producto se ligó al vector suicida pDM4 digerido con *SalI* o *BglII*, dependiendo del caso, y desfosforilado, y se transformó a la cepa *E. coli* MC1061 (λ pir). La selección de las colonias se llevó a cabo a 30°C en placas de LB suplementadas con cloranfenicol y, mediante la purificación del plásmido y la digestión con *SalI* o *BglII*, según la construcción, se comprobó la presencia del inserto.

Posteriormente, se transfirieron las construcciones obtenidas a la cepa AH-405 mediante conjugación triparental seleccionando los transconjugantes a 30°C en placas de TSA con rifampicina y cloranfenicol. La inserción cromosómica del vector, mediante una primera recombinación, se comprobó por PCR con los cebadores A y D, con los que se obtenía una banda correspondiente a la copia correcta del gen y otra de la copia delecionada.

A continuación, se escogió uno de los transconjugantes para cada una de las mutaciones y se realizó un banco de diluciones que se plaqueó en TSA con sacarosa al 15% y se hizo crecer a 30°C. De las colonias que aparecieron, se comprobó su capacidad para crecer en placas de LB suplementadas con cloranfenicol y se eligieron aquellas que fueron sensibles al antibiótico. Los candidatos se comprobaron, finalmente, por PCR con los cebadores A y D y se seleccionaron los mutantes en los que, debido a una segunda recombinación, quedaba una única copia delecionada del gen mutado en el cromosoma, además de secuenciar el producto de la amplificación para comprobar que en la región delecionada se mantuviera la pauta de lectura.

4.1.6 Caracterización fenotípica del LPS por SDS-PAGE o SDS-Tricine-PAGE de mutantes en diversos genes de las tres regiones *wa* del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3

Se determinó el perfil electroforético del LPS de los mutantes de la cepa AH-3 obtenidos mediante recombinación en un punto (ver apartado 4.1.5.1) y doble recombinación (ver apartado 4.1.5.3). Para ello, se obtuvieron muestras de LPS de los mutantes construidos (ver Material y Métodos, 3.7.1.2) y se analizaron mediante SDS-PAGE y SDS-Tricine-PAGE (ver Material y Métodos, 3.7.2), consiguiendo con el segundo tipo de geles una mayor definición de las fracciones de bajo peso molecular y la visualización de alteraciones diferentes a nivel del núcleo del LPS.

4.1.6.1 Mutantes que carecen de antígeno O

Los mutantes AH-3 Δ 3.1, AH-3 Δ 4.1, AH-3 Δ 2.2 y AH-3 Δ 4.2, así como los mutantes AH-3005, AH-3006 y AH-3007, como ya se observó anteriormente (ver apartado 4.1.1.1), carecían por completo de antígeno O:34 y su núcleo, a excepción del mutante AH-3 Δ 3.1, migraba más rápido que el de la cepa parental, en diferentes grados, indicando la pérdida de uno o varios residuos del oligosacárido (Fig. 4.6).

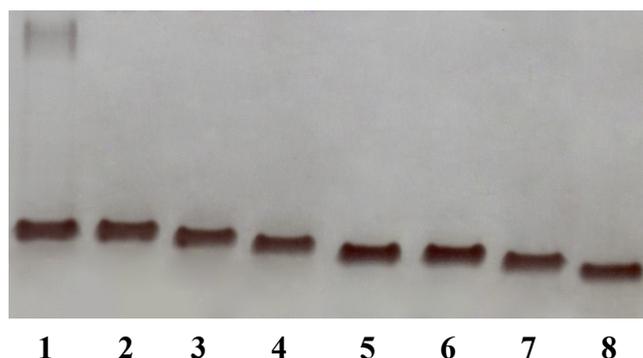


Figura 4.6. Gel de SDS-Tricine-PAGE teñido con nitrato de plata de muestras de LPS de *A. hydrophila* AH-405 (carril 1) y de los mutantes en el núcleo del LPS que carecen de antígeno O:34: AH-3 Δ 3.1 (2), AH-3 Δ 4.1 (3), AH-3005 (4), AH-3 Δ 2.2 (5), AH-3006 (6), AH-3 Δ 4.2 (7) y AH-3007 (8).

El núcleo del mutante en el gen *waaL* (AH-3 Δ 3.1) no migraba más rápido que el de la cepa parental, de acuerdo con el hecho de que permaneciese intacto al haber sido mutada la ligasa del antígeno O, del cual carecía (ver apartado 4.1.4.1.3).

En el caso del mutante en el gen *wahB* (AH-3 Δ 4.1), la ausencia del antígeno O y la migración de su núcleo, sólo un poco más rápida que la del núcleo completo, indicaba que podría tratarse del gen que codifica la β -1,4-galactosiltransferasa responsable de la unión del residuo de galactosa al cual se une el antígeno O, en base a los resultados obtenidos en el análisis de su secuencia (ver apartado 4.1.4.1.4).

El mutante AH-3005, cuyo gen afectado es el *wahD*, carecía de antígeno O y presentaba un núcleo que aparecía un poco más bajo que el del mutante AH-3 Δ 4.1, lo que junto con los datos del análisis de su secuencia concuerda con que el hecho de que el gen mutado codificase la α -1,6-D,D-heptosiltransferasa (ver apartado 4.1.4.1.6).

Tanto el núcleo del mutante en el gen *wahF* (AH-3 Δ 2.2) como el del mutante en el gen *waaF* (AH-3 Δ 4.2) migraban más rápido que el del mutante AH-3005, por lo que las heptosiltransferasas afectadas (ver apartados 4.1.4.2.2 y 4.1.4.2.4) producirían la pérdida

de más residuos que en el caso de la mutación en el gen *wahD*, de manera que los genes mutados estarían implicados en la transferencia de alguna de las L,D-Hep.

Respecto al mutante AH-3006, su núcleo también aparecía más bajo que el del mutante AH-3005, y como ya se había comentado, el gen *waaE* estaría implicado en la transferencia del residuo de glucosa, lo que afectaría a la construcción de la cadena principal (ver apartado 4.1.4.2.3).

La migración del núcleo del mutante en el gen *waaC* (AH-3007), mucho más rápida que el resto, era indicativa de la falta de una gran cantidad de residuos, lo que era de esperar si el gen afectado estuviese implicado en la transferencia de la primera heptosa, función que sugería la comparación de su secuencia con las de las bases de datos (ver apartado 4.1.4.3.1).

4.1.6.1 Mutantes que presentan antígeno O

Los mutantes AH-3 Δ 2.1, AH-3 Δ 5.1 y AH-3 Δ 7.1 mostraban diferentes cantidades de antígeno O y también cambios en el patrón de migración del núcleo respecto a la cepa parental (Fig. 4.7).

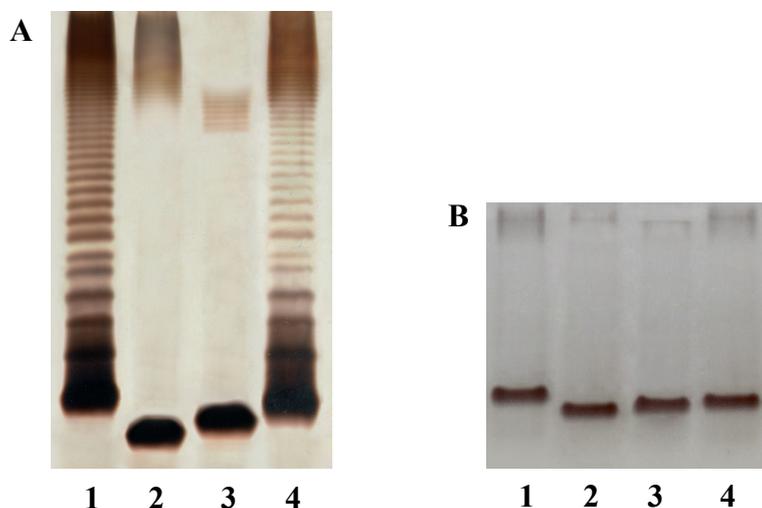


Figura 4.7. Geles de SDS-PAGE (A) y SDS-Tricine-PAGE (B) teñidos con nitrato de plata de muestras de LPS de *A. hydrophila* AH-405 (carril 1) y de los mutantes en el núcleo del LPS que presentan antígeno O:34 en diferentes cantidades: AH-3 Δ 2.1 (2), AH-3 Δ 5.1 (3) y AH-3 Δ 7.1 (4).

El mutante en el gen *wahA* (AH-3 Δ 2.1) presentaba un núcleo que migraba más rápido que el de la cepa parental, sin embargo también mostraba una pequeña cantidad de antígeno O, de moléculas con un elevado número de repeticiones. El análisis de la secuencia de este gen revelaba que podría estar implicado en la transferencia del residuo de

GlcNAc y en su desacetilación, el cual se halla en el extremo de una ramificación (ver apartado 4.1.4.1.2). Si así fuera, la ausencia del residuo de glucosamina afectaría de alguna manera a la unión del antígeno O.

En el caso del mutante en el gen *wahC* (AH-3Δ5.1), el núcleo migraba un poco más rápido que el de la cepa salvaje, aunque no tanto como el del mutante AH-3Δ2.1, y presentaba una pequeña cantidad de moléculas de antígeno O de elevado peso molecular. La heptosiltransferasa codificada por el gen mutado (ver apartado 4.1.4.1.5) sería, por lo tanto, también importante para la unión del antígeno O, aunque no la impediría de forma completa.

La mutación en el gen *wahE* (AH-3Δ5.1) no provocaba prácticamente alteraciones en el patrón de migración del LPS respecto a la cepa parental, tan sólo se podía apreciar la presencia de un núcleo un poco más bajo, lo que podría ser indicativo de la ausencia de un único residuo de Hep que no afectaría a la ligación del antígeno O, ya que la proteína codificada por este gen presentaba similitud con diferentes heptosiltransferasas (ver apartado 4.1.4.1.7).

4.1.7 Análisis de complementación de mutantes en el núcleo del LPS

4.1.7.1 Complementación de los mutantes en el núcleo del LPS de *A.*

***hydrophila* AH-3**

Se realizaron ensayos de complementación de los mutantes obtenidos en los diferentes genes del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3 para comprobar la recuperación del fenotipo debido a la reintroducción del gen mutado.

Para ello, los genes de *A. hydrophila* AH-3 correspondientes a las siguientes ORF (el primer número es el de la ORF y el segundo hace referencia a la región *wa* a la que pertenece): ORF2.1, ORF3.1, ORF4.1, ORF5.1, ORF6.1, ORF7.1, ORF2.2, ORF3.2, ORF4.2 y ORF1.3 se amplificaron a partir de ADN cromosómico de la cepa AH-3 con los cebadores descritos en los apartados 3.4.5, 3.4.6 y 3.5.7 de Material y Métodos. Los fragmentos obtenidos fueron de 1904 pb, 1471 pb, 1017 pb, 1200 pb, 1379 pb, 1167 pb, 1276 pb, 1011 pb, 1223 pb y 1158 pb, respectivamente. Estos productos amplificados se digirieron con las enzimas de restricción cuya diana había sido incluida en el diseño de los cebadores: *Sma*I, o *Sca*I en el caso de las ORF2.2 y ORF1.3, en el cebador directo, y *Xba*I en el cebador reverso. Posteriormente, se ligó cada uno de ellos al vector pBAD33 digerido

con las enzimas *Sma*I y *Xba*I, asegurando así la correcta orientación de los genes bajo el control del promotor P_{BAD} (ver Material y Métodos, 3.8.15.1). Las ligaciones se transfirieron por separado a la cepa de *E. coli* LMG194 mediante electroporación y se seleccionaron los transformantes a 30°C en placas de LB con cloranfenicol, los cuales se comprobaron mediante amplificación del inserto clonado y su secuenciación utilizando los cebadores PBAD-F y PBAD-R del vector pBAD33.

Las construcciones obtenidas fueron transferidas de manera independiente al mutante en la ORF correspondiente mediante conjugación triparental y los transconjugantes fueron seleccionados en placas de TSA con cloranfenicol y rifampicina a 30°C y confirmados mediante PCR del plásmido purificado con los cebadores específicos de cada ORF. Paralelamente, a cada uno de los mutantes, también se le transfirió el vector pBAD33 sin inserto, cuya presencia se comprobó mediante la extracción y visualización del plásmido.

Los ensayos de complementación, para cada uno de los mutantes, se llevaron a cabo a 30°C en condiciones inducidas con arabinosa, manteniendo también un cultivo de cada cepa reprimido con glucosa como control (ver Material y Métodos, 3.8.15.1). A continuación, se obtuvieron muestras de LPS (ver Material y Métodos, 3.7.1.2) que fueron analizadas mediante SDS-PAGE. En todos los casos, la complementación del mutante con la expresión inducida del gen correspondiente en el plásmido pBAD33 restauraba el perfil electroforético del LPS, idéntico al de la cepa parental, mientras que no se originaba ningún cambio del fenotipo en los mutantes con el vector pBAD33 sin inserto.

4.1.7.2 Complementación de mutantes en el núcleo del LPS de *Klebsiella pneumoniae* 52145

Con el objetivo de caracterizar mejor algunos de los genes del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3, se realizaron ensayos de complementación de varios mutantes de *Klebsiella pneumoniae* 52145 (O1:K2) definidos para diversos genes de biosíntesis del núcleo.

Las construcciones en pBAD33 con los genes que codificaban las diferentes putativas heptosiltransferasas de *A. hydrophila* AH-3 (ver apartado 4.1.7.1): pBAD-ORF5.1, pBAD-ORF6.1, pBAD-ORF7.1, pBAD-ORF2.2, pBAD-ORF4.2 y pBAD-ORF1.3 fueron utilizadas en ensayos de complementación independientes de las cepas 52145 Δ *waaQ*, 52145 Δ *waaF* y 52145 Δ *waaC*, mutantes de la cepa 52145 en las

heptosiltransferasas III, II y I, respectivamente. Por otro lado, se utilizó la construcción pBAD-ORF3.2 (ver apartado 4.1.7.1) para realizar la complementación del mutante 52145 Δ *waaE* y comprobar si el gen *waaE* de *A. hydrophila* AH-3 podía tener una posible función α -L,D-Hep β -1,4-glucosiltransferasa. Las cepas mutantes que habían incorporado la construcción correspondiente, mediante electroporación y selección a 37°C en placas de LB con cloranfenicol, fueron confirmadas mediante PCR del plásmido purificado con los cebadores específicos de cada ORF.

Los ensayos de complementación, en cada uno de los casos, se realizaron a 37°C en condiciones de inducción con arabinosa, manteniendo también un cultivo de cada cepa reprimido con glucosa como control (ver Material y Métodos, 3.8.15.1). El análisis de las muestras de LPS mediante SDS-PAGE reveló que el plásmido pBAD-ORF3.2 era capaz de complementar al mutante 52145 Δ *waaE*, el cual presentaba una migración más rápida del núcleo y una reducción de la cantidad de antígeno O, de manera que recuperaba el fenotipo de la cepa 52145 usada como control. El plásmido pBAD-ORF4.2 fue el único entre los que contenían genes de putativas heptosiltransferasas que complementó al mutante 52145 Δ *waaF*. Sin embargo, ninguno de estos mismos vectores fue capaz de complementar al mutante 52145 Δ *waaC* ni al mutante 52145 Δ *waaQ* (Fig. 4.8).

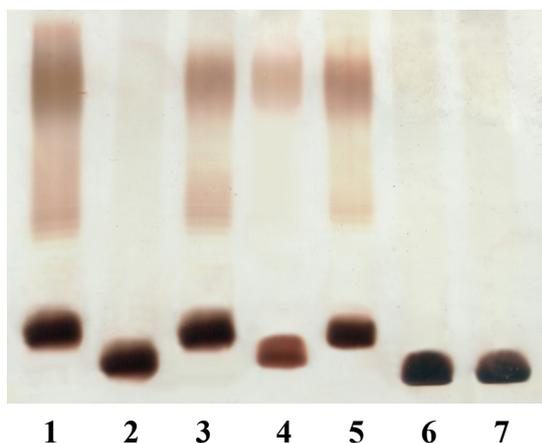


Figura 4.8. Gel de SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de muestras de LPS de *K. pneumoniae* 52145 (carril 1), 52145 Δ *waaF* (2), 52145 Δ *waaF* complementado con pBAD-ORF4.2 (3), 52145 Δ *waaE* (4), 52145 Δ *waaE* complementado con pBAD-ORF3.2 (5), 52145 Δ *waaC* (6), 52145 Δ *waaC* con pBAD-ORF1.3 (7). Las cepas con el plásmido pBAD33 fueron crecidas bajo condiciones de inducción.

4.1.7.3 Complementación de la cepa de *E. coli* CJB26

Con el objetivo de confirmar la función Kdo transferasa del gen *waaA* de *A.*

hydrophila AH-3, se realizó el análisis de complementación de la cepa de *E. coli* CJB26, mutante condicional que presenta un determinante para la resistencia a la kanamicina insertado en su gen *waaA* y una copia del gen salvaje en un plásmido cuya replicación es sensible a la temperatura (vector recombinante pJSC2) y que permite el crecimiento de la bacteria a 30°C, pero no a la temperatura restrictiva de 44°C (Belunis *et al.*, 1995).

Las construcciones pGEMT-ORF1.2 y pGEMT-ORF2.3-1.2, obtenidas tal y como se describe en el apartado 3.8.15.2 de Material y Métodos, se utilizaron en dos ensayos de complementación independientes. El plásmido pGEMT-ORF1.2, el cual contenía el gen *waaA* de AH-3, una vez electroporado en la cepa CJB26, no cambió su fenotipo sensible a la temperatura, de manera que era incapaz de crecer a 44°C. La electroporación, en cambio, del plásmido pGEMT-ORF2.3-1.2, con en el que además del gen *waaA* se introducía el gen *kdkA*, permitió el crecimiento a 44°C de colonias que fueron, posteriormente, seleccionadas por su incapacidad de crecer en cloranfenicol, resistencia contenida en el vector pJSC2. El aislamiento del ADN plasmídico de los candidatos, junto con el de la cepa CJB26, y la digestión con *SalI* reveló la presencia del plásmido introducido (bandas de 4114 pb y 1513 pb) y la ausencia del vector pJSC2 (banda de 9,2 Kb).

La complementación observada sugiere con cierta seguridad que la ORF1.2 y la ORF2.3 codifican la Kdo transferasa WaaA y la Kdo kinasa KdkA de la ruta de biosíntesis del núcleo interno de *A. hydrophila* AH-3, ya que es necesaria la coexpresión de ambas para que un mutante de *E. coli* en su WaaA sea viable, tal y como ocurre en el caso de coexpresar los mismos genes de *Haemophilus* en un mutante de *E. coli* similar (Brabetz *et al.*, 2000).

4.1.8 Elucidación de la estructura química del LPS de los mutantes en diversos genes de las tres regiones *wa* del núcleo de *A. hydrophila* AH-3

Las moléculas de LPS se obtuvieron por el método fenol-agua o por el método PCP a partir de células deshidratadas de cada uno de los mutantes (ver Material y Métodos, 3.7.1.1). Las muestras de LPS fueron degradadas mediante hidrólisis ácida suave (ver Material y Métodos, 3.7.3.1) y la fracción oligosacáridica correspondiente al núcleo fue purificada por GPC (ver Material y Métodos, 3.7.3.2). En el caso del mutante AH-3007, la degradación de su LPS consistió en una hidrólisis básica (ver Material y Métodos, 3.7.3.3). En ambos casos, el estudio de las moléculas obtenidas se realizó mediante espectrometría de masas con ionización por *electrospray* (ESI-MS) de alta resolución (ver Material y

Métodos, 3.7.3.5). Cuando fue necesario, también se llevó a cabo un análisis de metilación de monosacáridos (ver Material y Métodos, 3.7.3.4), lo que permitía, no sólo la determinación de las posiciones de los enlaces en la mayoría de los residuos de azúcares, sino también la diferenciación entre D,D-Hep y L,D-Hep, cuyos derivados metilados presentan diferente tiempo de retención en GLC. Los resultados obtenidos se compararon con la estructura del núcleo completo de un mutante en la cepa AH-3 sin antígeno O:34, *A. hydrophila* AH-901, caracterizado con anterioridad (Knirel *et al.*, 2004).

4.1.8.1 Estructura química de los mutantes AH-3Δ3.1 y AH-3Δ4.1

La muestra oligosacáridica del mutante en el gen *waaL*, AH-3Δ3.1, resultó ser idéntica a la del R-LPS de *A. hydrophila* AH-901 (Knirel *et al.*, 2004). El pico del ión molecular más intenso en su espectro de masas, con una relación m/z de 1857,63, correspondía al núcleo completo, cuya masa molecular calculada es de 1857,61 uma. La heterogeneidad observada en el espectro está asociada a la presencia de la Gal en una cantidad no estequiométrica (Fig. 4.9).

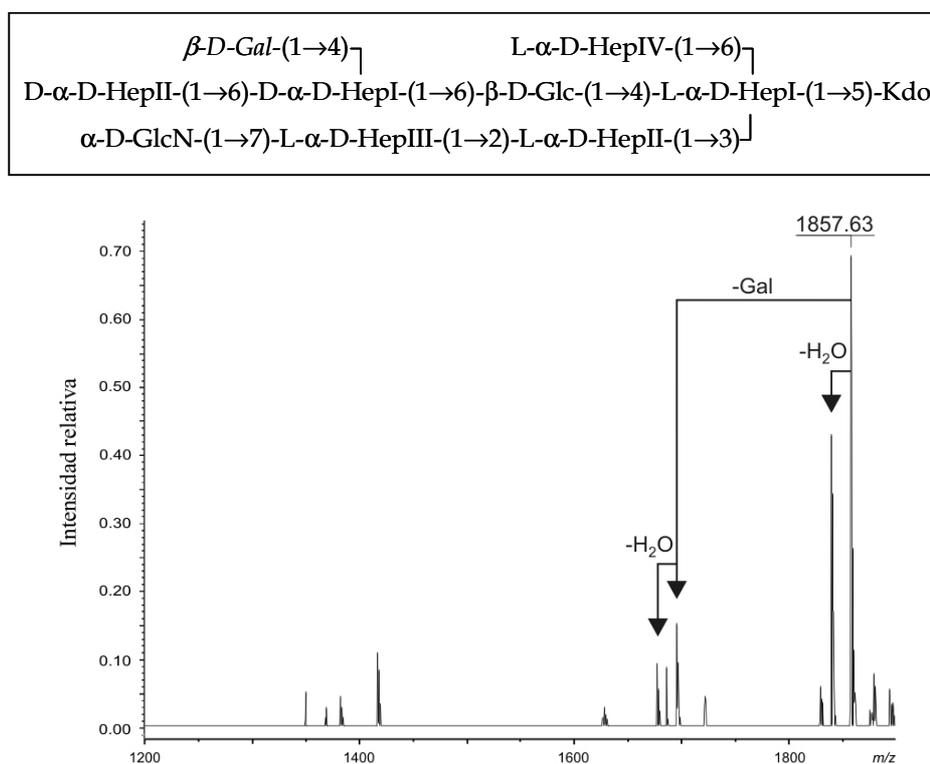


Figura 4.9. Espectro de ESI-MS, con deconvolución de las cargas, del núcleo obtenido por hidrólisis ácida suave del LPS del mutante AH-3Δ3.1. En el recuadro superior se muestra la estructura química propuesta, los componentes presentes en una cantidad no estequiométrica están en cursiva.

El pico del ión molecular más intenso en el caso del mutante AH-3Δ4.1, cuyo gen mutado era el *wahB*, se hallaba en $m/z = 1695,57$, de manera que mostraba una estructura

idéntica a la del mutante AH-3Δ3.1, pero carecía del residuo de Gal, ya que la masa molecular calculada para esta estructura es de 1695,55 uma (Fig. 4.10).

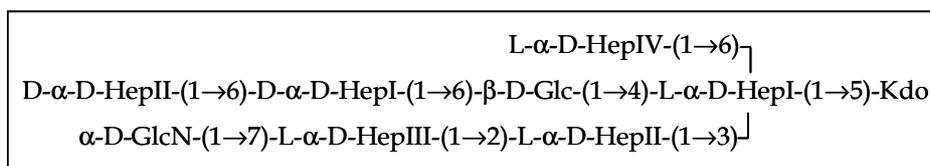


Figura 4.10. Estructura química propuesta correspondiente al núcleo obtenido por hidrólisis ácida suave del LPS del mutante AH-3Δ4.1.

4.1.8.2 Estructura química de los mutantes AH-3Δ7.1 y AH-3Δ5.1

El espectro de masas del núcleo del mutante AH-3Δ7.1, afectado en el gen *wahE*, era similar al del mutante AH-3Δ3.1, pero las masas observadas en los picos eran inferiores en 192 uma, lo que se correspondía con la pérdida de un residuo de heptosa, y existían, también, dos glicofomas que se diferenciaban en la presencia o la ausencia de Gal (Fig. 4.11). El análisis de metilación indicaba que el residuo perdido era la L,D-HepIV terminal, mientras que la D,D-HepII estaba presente.

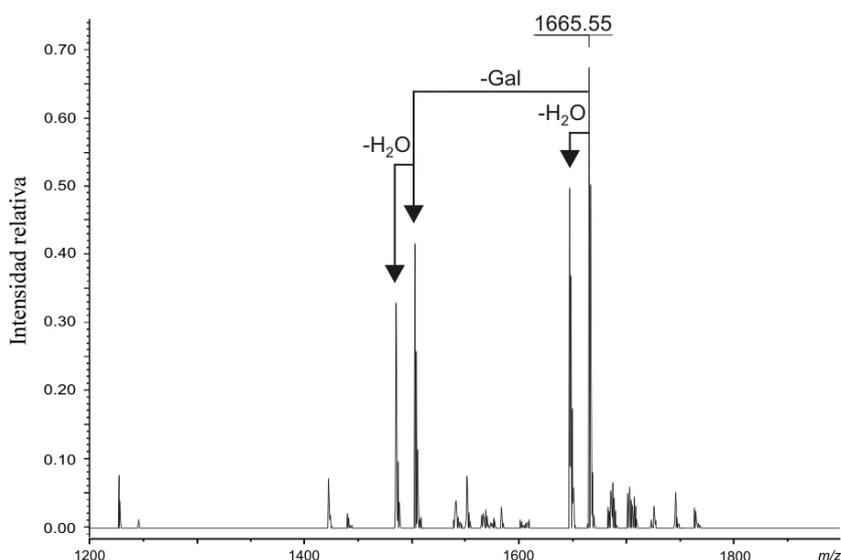
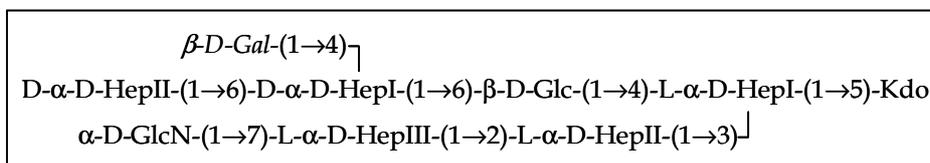


Figura 4.11. Espectro de ESI-MS, con deconvolución de las cargas, del núcleo obtenido por hidrólisis ácida suave del LPS del mutante AH-3Δ7.1. En el recuadro superior se muestra la estructura química propuesta, los componentes presentes en una cantidad no estequiométrica están en cursiva.

En el mutante en el gen *wahC*, AH-3Δ5.1, también se producía la pérdida de un residuo de heptosa, pero, contrariamente a lo que ocurría en el mutante AH-3Δ7.1, el análisis de metilación mostraba que la L,D-HepIV terminal no había sido afectada y que la pérdida correspondía a la D,D-HepII terminal. Según lo observado en el espectro de masas, la estructura mayoritaria del núcleo de este mutante, pico del ión molecular en $m/z = 1503,53$, carecía también de Gal (Fig. 4.12). De manera que la D,D-HepII debe ser importante para la unión de la Gal sobre la D,D-HepI.

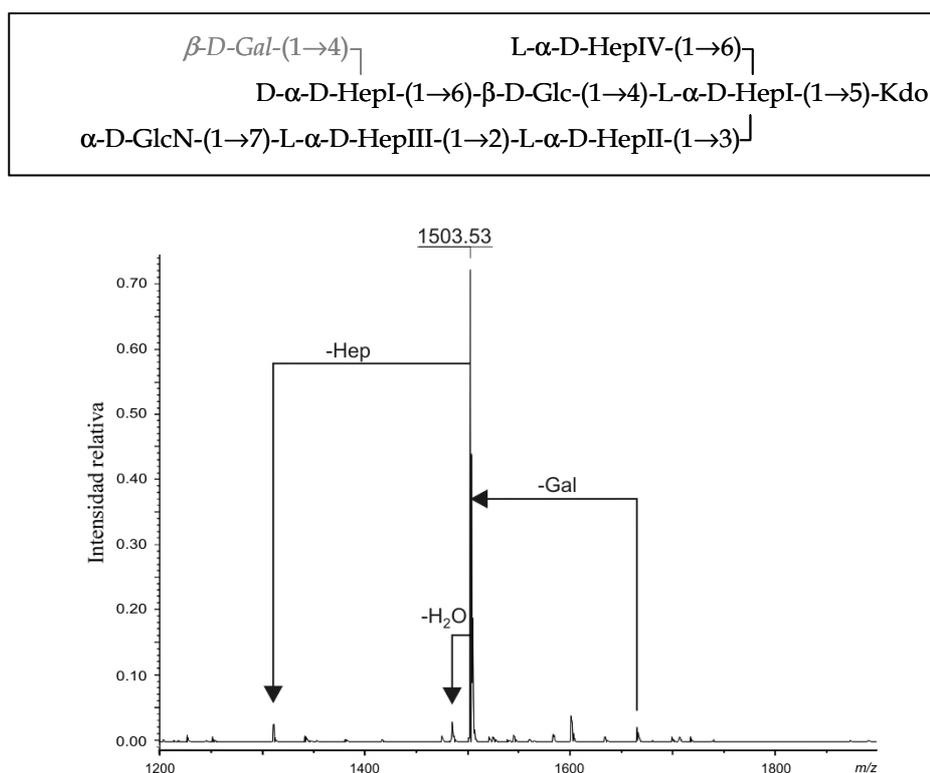


Figura 4.12. Espectro de ESI-MS, con deconvolución de las cargas, del núcleo obtenido por hidrólisis ácida suave del LPS del mutante AH-3Δ5.1. En el recuadro superior se muestra la estructura química propuesta, los componentes presentes en una cantidad no estequiométrica están en cursiva y en negro se indica la estructura mayoritaria.

4.1.8.3 Estructura química del mutante AH-3Δ2.1

El espectro de masas del mutante en el gen *wahA*, AH-3Δ2.1, mostraba la falta del residuo de GlcN. Las estructuras mayoritarias estaban desprovistas también de Gal y de uno o tres residuos de Hep, en base a la aparición de picos de iones moleculares intensos en $m/z = 1342,43$ y en $m/z = 958$, respectivamente (Fig. 4.13).

La estructura más abundante es la correspondiente al pico mayoritario en $m/z = 958$ (no representado en la Fig. 4.13), el cual pertenecería a una glicofoma truncada del núcleo constituida por Kdo, Glc y tres residuos de Hep.

En el espectro también se podían observar dos picos minoritarios, uno correspondiente a la estructura del núcleo completo sin GlcN y otro a esta misma estructura sin Gal.

El residuo de GlcN parece ser importante para la unión de los azúcares del núcleo externo y de la L,D-HepIV terminal.

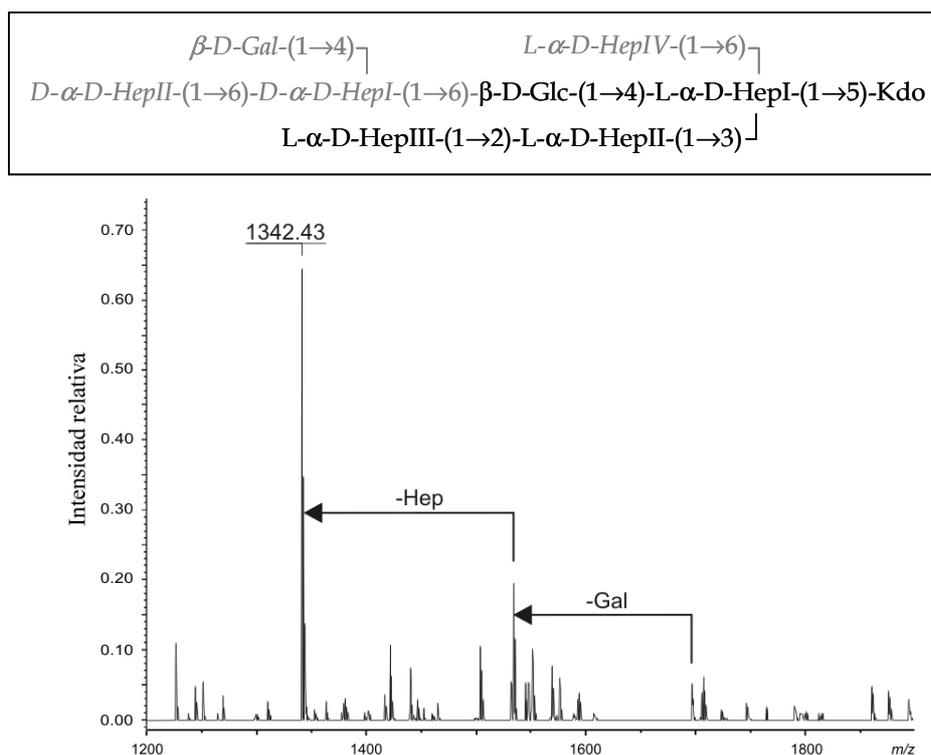


Figura 4.13. Espectro de ESI-MS, con deconvolución de las cargas, del núcleo obtenido por hidrólisis ácida suave del LPS del mutante AH-3Δ2.1. Sólo se muestra la parte del espectro con las masas moleculares más elevadas, de manera que el pico en $m/z = 958$ no está representado. En el recuadro superior se muestra la estructura química propuesta, los componentes presentes en una cantidad no estequiométrica están en cursiva y en negro se indica la estructura mayoritaria.

4.1.8.4 Estructura química del mutante AH-3005

El espectro de masas del mutante en el gen *wahD*, AH-3005, mostraba la falta del fragmento trisacárido del núcleo externo consistente en Gal, D,D-HepII y D,D-HepI, mientras que el resto del núcleo, que daba un pico del ión molecular en $m/z = 1311,44$, no estaba afectado (Fig. 4.14).

El análisis de metilación confirmó la conservación de la L,D-HepIV terminal, la ausencia de Gal y D,D-Hep y la aparición de Glc en posición terminal.

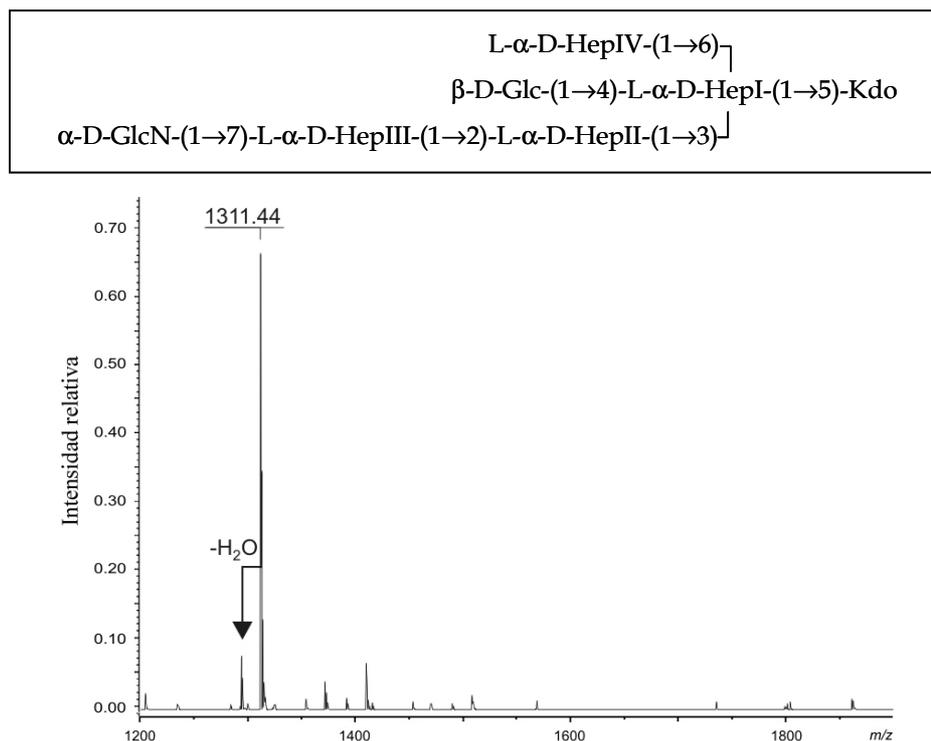


Figura 4.14. Espectro de ESI-MS, con deconvolución de las cargas, del núcleo obtenido por hidrólisis ácida suave del LPS del mutante AH-3005. En el recuadro superior se muestra la estructura química propuesta.

4.1.8.5 Estructura química de los mutantes AH-3 Δ 2.2 y AH-3006

El núcleo del mutante en el gen *wahF*, AH-3 Δ 2.2, y el del mutante en el gen *waaE* (AH-3006) mostraban un espectro de masas similar. Ambos contenían un único pico del ión molecular en $m/z = 796,25$ ó $796,24$, respectivamente, para un oligosacárido que consiste en un Kdo y tres residuos de Hep.

El análisis de metilación indicaba en los dos mutantes la presencia, únicamente, de L,D-Hep terminales, mientras que sólo en el caso del mutante AH-3006 aparecían residuos de L,D-Hep terminales sustituidos en la posición 2.

En base a estos datos, la estructura ramificada de tres heptosas se asignó al oligosacárido del mutante AH-3 Δ 2.2 (Fig. 4.15) y, la linear, al del mutante AH-3006 (Fig. 4.16). La estructura del mutante AH-3 Δ 2.2 sugiere que la L,D-HepIII sería importante para la unión de la Glc y, la del mutante AH-3006, que la ausencia de Glc afectaría a la incorporación de la GlcN.

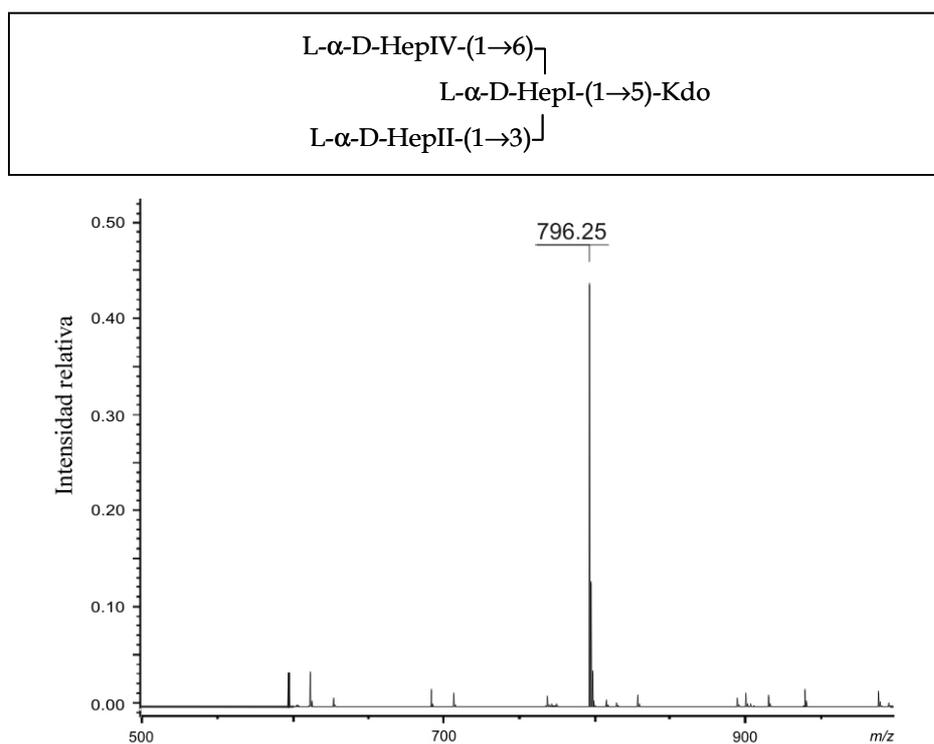


Figura 4.15. Espectro de ESI-MS, con deconvolución de las cargas, del núcleo obtenido por hidrólisis ácida suave del LPS del mutante AH-3 Δ 2.2. En el recuadro superior se muestra la estructura química propuesta.

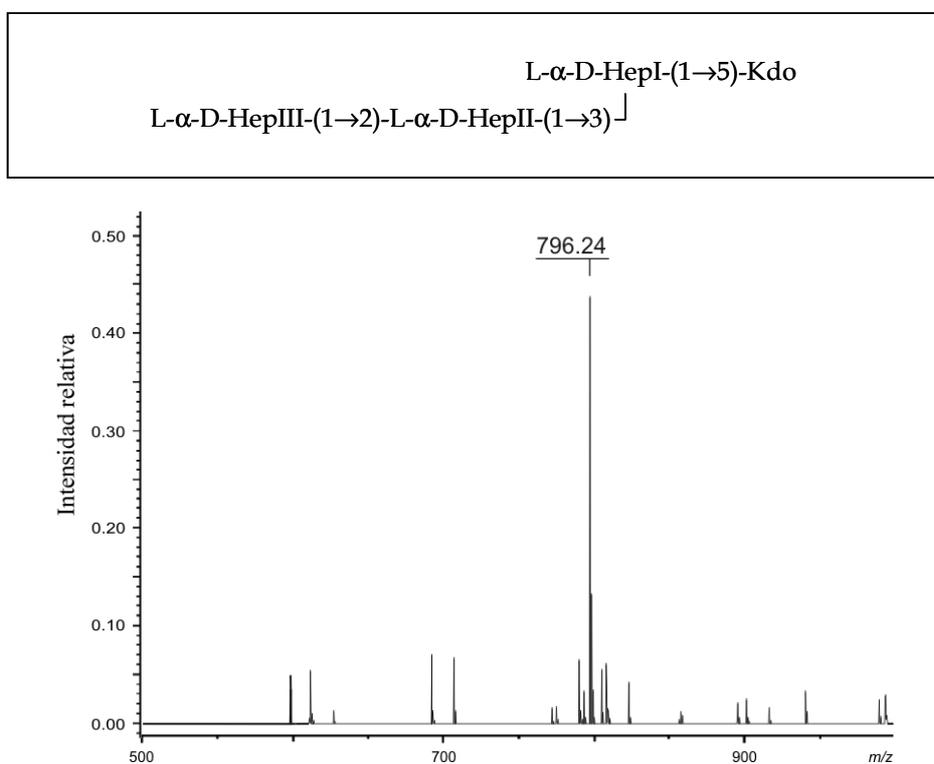


Figura 4.16. Espectro de ESI-MS, con deconvolución de las cargas, del núcleo obtenido por hidrólisis ácida suave del LPS del mutante AH-3006. En el recuadro superior se muestra la estructura química propuesta.

4.1.8.6 Estructura química del mutante AH-3Δ4.2

El mutante en el gen *waaF*, AH-3Δ4.2, presentaba un núcleo todavía más truncado que los anteriores con un único Kdo y dos residuos de Hep identificados como un intenso pico del ión molecular en $m/z = 604,19$ (Fig. 4.17), de manera que la L,D-HepII podría ser importante para la unión de la Glc.

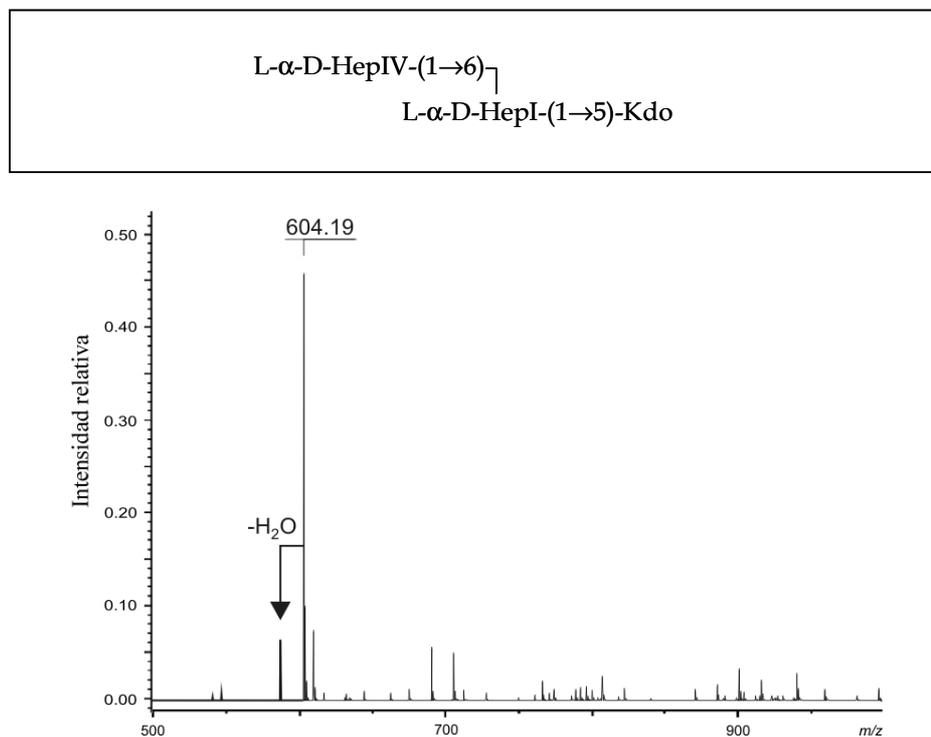


Figura 4.17. Espectro de ESI-MS, con deconvolución de las cargas, del núcleo obtenido por hidrólisis ácida suave del LPS del mutante AH-3Δ4.2. En el recuadro superior se muestra la estructura química propuesta.

4.1.8.7 Estructura química del mutante AH-3007

El LPS del mutante en el gen *waaC*, AH-3007, se estudió a partir del producto de la hidrólisis básica, así como también se realizó un análisis de la molécula completa. El espectro de masas mostró que la región del núcleo de este mutante está restringida a una molécula de Kdo fosforilada.

La heterogeneidad observada en el espectro del LPS completo es debida a la aparición de varias formas del lípido A que difieren en el número de ácidos grasos y de Ara4N y la presencia de lípido A libre (Fig. 4.18).

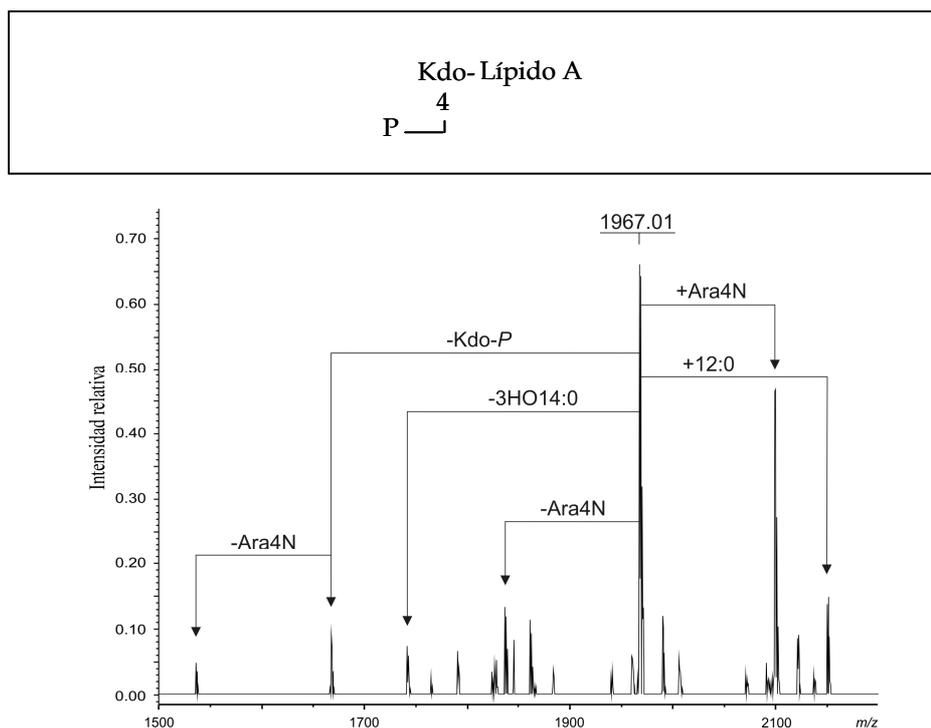


Figura 4.18. Espectro de ESI-MS, con deconvolución de las cargas, del LPS completo del mutante AH-3007. En el recuadro superior se muestra la estructura química propuesta.

4.1.9 Estudio de la distribución de los genes *wahB*, *wahC*, *wahD* y *wahE* en *Aeromonas* mesófilas

Con el fin de valorar la distribución en diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas de algunos de los genes implicados en la biosíntesis del núcleo externo: *wahB*, *wahC* y *wahD*; así como también del gen que codifica la heptosiltransferasa que cataliza la unión de la L,D-HepIV al núcleo interno, *wahE*, se realizó un ensayo de *dot blot*.

Se elaboraron sondas de ADN marcadas con digoxigenina correspondientes a fragmentos internos de cada uno de los genes, mediante PCR a partir de ADN cromosómico de la cepa AH-3 con los cebadores descritos en el apartado 3.4.5 de Material y Métodos, y se realizó con ellas una hibridación del ADN genómico de diferentes serotipos de *Aeromonas* mesófilas, entre las que se incluyen cepas de las especies *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* bv. *sobria* (ver Material y Métodos, 3.8.12.3).

Los serotipos analizados fueron 32 (O:1, O:5, O:6, O:8, O:10, O:11, O:13, O:14, O:16, O:17, O:18, O:19, O:20, O:21, O:22, O:23, O:24, O:25, O:26, O:27, O:28, O:29, O:30, O:32, O:33, O:34, O:35, O:37, O:38, O:40, O:42 y O:44), como control positivo se utilizó la cepa AH-3 (serotipo O:34) y como control negativo la cepa *E. coli* DH5 α . Así

mismo, también se analizó la cepa psicrófila A450 de *A. salmonicida*. El resultado fue una hibridación positiva de la mayoría de las cepas y el mismo patrón en cada una de ellas, independientemente de la sonda utilizada, a excepción de la cepa A450 que dio una hibridación positiva con la sonda del gen *wahE* y negativa con las sondas de los genes *wahB*, *wahC* y *wahD* (Fig. 4.19). Se observó, por lo tanto, una elevada conservación de los genes del núcleo externo entre las diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas analizadas, de manera que la conservación del núcleo interno debe ser todavía mayor.

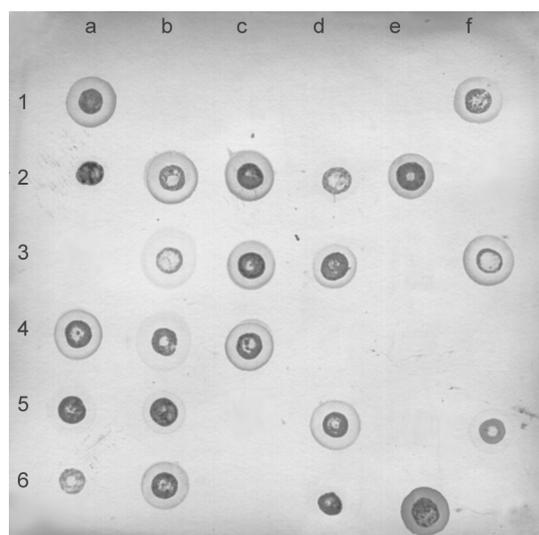


Figura 4.19. Distribución del gen *wahE* en distintas cepas de *Aeromonas* spp. mediante *dot blot*. Los serotipos estudiados fueron los siguientes: **a1**, O:1; **b1**, O:5; **c1**, O:6; **d1**, O:8; **e1**, O:10; **f1**, O:11; **a2**, O:13; **b2**, O:14; **c2**, O:16; **d2**, O: 17; **e2**, O:18; **f2**, O:19; **a3**, O:20; **b3**, O:21; **c3**, O:22; **d3**, O:23; **e3**, O:24; **f3**, O:25; **a4**, O:26; **b4**, O:27; **c4**, O:28; **d4**, O:29; **e4**, O:30; **f4**, O:32; **a5**, O:33; **b5**, O:34; **c5**, O:35; **d5**, O:37; **e5**, O:38; **f5**, O:40; **a6**, O:42 y **b6**, O:44. La cepa A450 ocupa la posición **d6**. La posición **e6** es el control positivo (AH-3) y la posición **f6** corresponde al control negativo (*E. coli* DH5 α). La hibridación con las sondas de los genes *wahB*, *wahC* y *wahD* presentó el mismo patrón, excepto en la posición **d6**, en la que fue negativa.

4.2 Discusión

El aislamiento de tres mutantes diferentes por inserción del transposón mini-Tn5::Km1 en la cepa de *A. hydrophila* AH-3 (serotipo O:34), con un LPS sin antígeno O y con una mayor migración electroforética del núcleo, permitió la caracterización de tres regiones genómicas diferentes que contenían genes implicados en la biosíntesis del núcleo del LPS. De manera que, en la cepa AH-3, no existe una única agrupación *wa* a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de enterobacterias, así como también en el caso del género *Vibrio* (Nesper *et al.*, 2002). La región 1 *wa* contiene siete genes y está flanqueada por un gen que codifica una putativa proteína reguladora TetR y por otro que codifica una proteína hipotética; la región 2 *wa* contiene cuatro genes y está localizada entre un gen que

codifica una proteína integral de membrana de función desconocida y el gen *coaD*, implicado en la biosíntesis de la coenzima A (Geerlof *et al.*, 1999); y la región 3 *wa*, constituida por dos genes, está flanqueada por un gen que codifica una guanilato quinasa y por otro que contiene un dominio GGDEF. Las tres regiones y los genes contenidos en cada una de ellas se corresponden completamente con los de la recientemente secuenciada *A. hydrophila* ATCC7966^T (Seshadri *et al.*, 2006), en la cual la región 1 (AHA4232 a AHA4226), la región 2 (AHA0170 a AHA0167) y la región 3 (AHA0042 a AHA0043) están delimitadas por los mismos putativos genes, pero, mientras que la estructura química del LPS de *A. hydrophila* AH-3 es conocida (Knirel *et al.*, 2002; Knirel *et al.*, 2004), no es éste el caso para *A. hydrophila* ATCC7966^T.

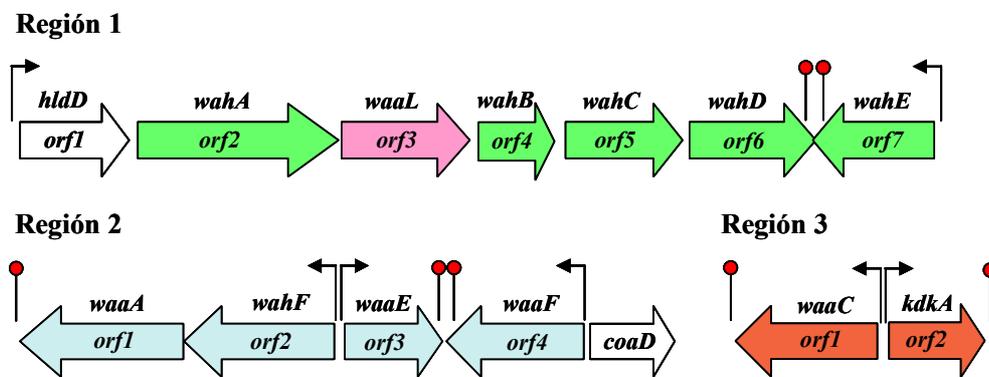


Figura 4.20. Esquema de las tres regiones génicas *wa* del LPS de *A. hydrophila* AH-3 con los nombres asignados a cada una de las ORF. En rosa se indica el gen de la ligasa del antígeno O y, en blanco, el gen no relacionado con la biosíntesis del núcleo (*coaD*) y el relacionado indirectamente (*hldD*). Los putativos promotores detectados se indican con flechas finas y los terminadores Rho-independientes mediante círculos.

La construcción de mutantes en cada uno de los genes en los que fue posible y la caracterización fenotípica de su LPS, junto con los datos obtenidos en base a la secuencia y a los ensayos de complementación, permitió la asignación de presuntivas funciones a cada uno de ellos.

En la región 3 *wa* (Fig. 4.20), la ORF1 y la ORF2 codifican la L,D-HepI transferasa WaaC y la Kdo kinasa KdkA, respectivamente. La función del gen *waaC* fue confirmada por el espectro de masas del LPS completo del mutante AH-3007 (Fig. 4.18). El LPS de *A. hydrophila* AH-3 contiene un residuo de Kdo fosforilado, probablemente en la posición 4, como en el caso de *Vibrio* (Knirel *et al.*, 2004; Vinogradov *et al.*, 1995), lo que concuerda con la similitud entre la proteína WaaC de *A. hydrophila* y una heptosiltransferasa de *Vibrio*, no determinada como WaaC. Este hecho también está relacionado con que la proteína WaaC de *A. hydrophila* no pueda complementar al mutante en la

heptosiltransferasa I de *K. pneumoniae* (Fig. 4.8), ya que posee un Kdo no fosforilado en su núcleo. Por otro lado, el fracaso en la obtención de un mutante en el gen *kdkA* puede ser debido a que la mutación en la Kdo kinasa sea letal en *A. hydrophila* AH-3.

La región 2 *wa* incluye cuatro genes (Fig. 4.20), de la ORF1 a la ORF4, que codifican la Kdo transferasa WaaA, una nueva heptosiltransferasa denominada WahF, la glucosiltransferasa WaaE, y la L,D-HepII transferasa WaaF, respectivamente. La mutación en el gen *waaA* de *A. hydrophila* parece ser letal al igual que ocurre en la mayoría de bacterias Gram negativas (Raetz y Whitfield, 2002). Debido a que *E. coli* contiene dos moléculas de Kdo y no un único Kdo fosforilado, el WaaA de *A. hydrophila* es capaz de complementar a la cepa de *E. coli* CJB26 (mutante en el gen *waaA* sensible a la temperatura) solamente cuando se coexpresa junto con la Kdo kinasa KdkA que fosforilaría el Kdo en la posición 4, confirmando la función de ambas proteínas. Esto mismo ocurre en el caso de coexpresar los mismos genes de *Haemophilus* en un mutante de *E. coli* similar (Brabetz *et al.*, 2000). El hecho de hallar un putativo dominio transmembrana en la enzima WaaA concuerda con su actuación en la cara citoplasmática de la membrana interna.

WaaE es una L-glicero-D-mano-heptosa β -1,4-D-glucosiltransferasa, no sólo en base a la similitud con otras proteínas con esta función, sino también por su capacidad de complementar al mutante de *K. pneumoniae* 52145 Δ *waaE*. El núcleo oligosacárido del mutante AH-3006 consiste en un fragmento lineal constituido por el Kdo y tres residuos de L,D-Hep (Fig. 4.16). Este resultado sugiere que la transferencia del residuo de Glc precede a la incorporación del núcleo externo y puede que también a la del residuo de GlcN. Respecto a la posibilidad de preceder a la unión del residuo de L,D-HepIV, esto no parece ocurrir si la L,D-HepIII no está presente. El gen *waaE*, presenta, por lo tanto, una amplia distribución y se halla también en otros géneros diferentes a los de la familia *Enterobacteriaceae*, con la excepción de *E. coli* y *Salmonella* (Izquierdo *et al.*, 2002).

La ORF4 codifica la L,D-HepII transferasa WaaF, ya que es la única heptosiltransferasa capaz de complementar al mutante de *K. pneumoniae* 52145 Δ *waaF*. Su función fue confirmada mediante el espectro de masas del núcleo oligosacárido del mutante en el gen *waaF*, AH-3 Δ 4.2, el cual posee un núcleo más truncado que tan sólo contiene Kdo y dos residuos de L,D-Hep (Fig. 4.17). Por lo tanto, la incorporación de la L,D-HepII precedería a la de la Glc.

A la proteína WahF se le asignó la función de L-*glicero*-D-*mano*-heptosa α -1,2-L-*glicero*-D-*mano*-heptosiltransferasa (L,D-HepIII transferasa) debido a que el mutante correspondiente, AH-3 Δ 2.2, posee un núcleo truncado al que le falta la L,D-HepIII pero contiene los otros tres residuos de L,D-Hep del núcleo interno (Fig. 4.15), lo que concuerda, por otra parte, con el hecho de que WahF no pueda complementar al mutante de *K. pneumoniae* 52145 Δ waaF. De manera que la L,D-HepIII también precedería a la incorporación de la Glc.

De los siete genes presentes en la región 1 *wa* (Fig. 4.20), la ORF1 fue identificada como el gen que codifica la ADP-L-*glicero*- β -D-*mano*-heptosa-6-epimerasa (HldD), enzima que convierte la D,D-Hep en L,D-Hep (Kneidiger *et al.*, 2002), debido a la elevada similitud observada con esta proteína de otras bacterias. A la proteína codificada por la ORF2 se la denominó WahA y se le atribuyó una doble funcionalidad: L-*glicero*-D-*mano*-heptosa α -1,7-N-acetilglucosaminiltransferasa/N-desacetilasa. La proteína WahA presenta dos dominios conservados: un dominio de las glicosiltransferasas de la familia 1 en la región N-terminal y un dominio polisacárido desacetilasa en la región C-terminal, los cuales también están presentes en la proteína WavL de *V. cholerae* (Schild *et al.*, 2005). Al núcleo del mutante en el gen *wahA*, AH-3 Δ 2.1, le falta el residuo de GlcN y un oligosacárido con todos los otros componentes del núcleo está presente de forma minoritaria, mientras que el oligosacárido mayoritario también está desprovisto de una parte del núcleo externo o del núcleo externo completo y uno de los residuos de L,D-Hep (Fig. 4.13). El LPS del mutante AH-3 Δ 2.1 aún muestra algo de antígeno O:34 en geles de poliacrilamida, pero en una cantidad mucho menor que la de la cepa parental (Fig. 4.7). El proceso de incorporación del residuo de GlcN en el núcleo del LPS de *A. hydrophila* se diferenciaría del que tiene lugar en la familia *Enterobacteriaceae*, en la cual, si bien también se incorpora en forma de GlcNAc que es, seguidamente, desacetilada, estas dos actividades son llevadas a cabo por dos enzimas distintas (Regué *et al.*, 2005a).

La ORF3 de la región 1 *wa* codifica la ligasa WaaL, ya que el mutante en el gen *waaL*, AH-3 Δ 3.1, produce un LPS con un núcleo completo y carece de antígeno O:34 y, al igual que en la cepa parental, la Gal terminal está presente en una cantidad no estequiométrica (Fig. 4.9). Es característico que estas enzimas muestren un nivel bajo de similitud en su secuencia primaria con las de otras especies. Además, la proteína WaaL de *A. hydrophila* presenta 12 hélices transmembrana, hecho característico de las ligasas del

antígeno O al complejo núcleo-lípido A (Abeyrathne *et al.*, 2005). La ORF4 codifica una proteína denominada WahB a la que se le adjudicó la función de D-glicero-D-mano-heptosa β -1,4-galactosiltransferasa en base al hecho de que al LPS del mutante en el gen *wahB*, AH-3 Δ 4.1, le falta únicamente la Gal del núcleo y el antígeno O:34.

La proteína codificada en la región 1 *wa* por la ORF5, denominada WahC, es la D-glicero-D-mano-heptosa α -1,6-D-glicero-D-mano-heptosiltransferasa ya que el núcleo del mutante en el gen *wahC*, AH-3 Δ 5.1, está desprovisto de la D,D-HepII (Fig. 4.12). La presencia de la D,D-HepII parece ser importante para la incorporación de la Gal al núcleo debido a que sólo una cantidad minoritaria de Gal y, consecuentemente, una cantidad reducida de antígeno O:34 se halla en el LPS del mutante (Fig. 4.7).

A la proteína codificada por la ORF6 de la región 1 *wa*, denominada WahD, se le asignó la función D-glucosa α -1,6-D-glicero-D-mano-heptosiltransferasa (D,D-HepI transferasa) en base a la falta del antígeno O:34 y del núcleo externo en el LPS correspondiente al mutante AH-3005 (Fig. 4.14). Finalmente, la ORF7 de la región 1 *wa* codifica una proteína que recibió el nombre de WahE y a la que le fue asignada la función L-glicero-D-mano-heptosa α -1,6-L-glicero-D-mano-heptosiltransferasa (L,D-HepIV transferasa), ya que el núcleo del mutante en el gen *wahE*, AH-3 Δ 7.1, difiere únicamente del núcleo completo en la ausencia del residuo de L,D-HepIV (Fig. 4.11), lo que concuerda con la presencia de antígeno O:34 (Fig. 4.7).

La figura 4.21 muestra la estructura química del núcleo del LPS de *Aeromonas hydrophila* AH-3 y la función asignada a las enzimas implicadas en su biosíntesis.

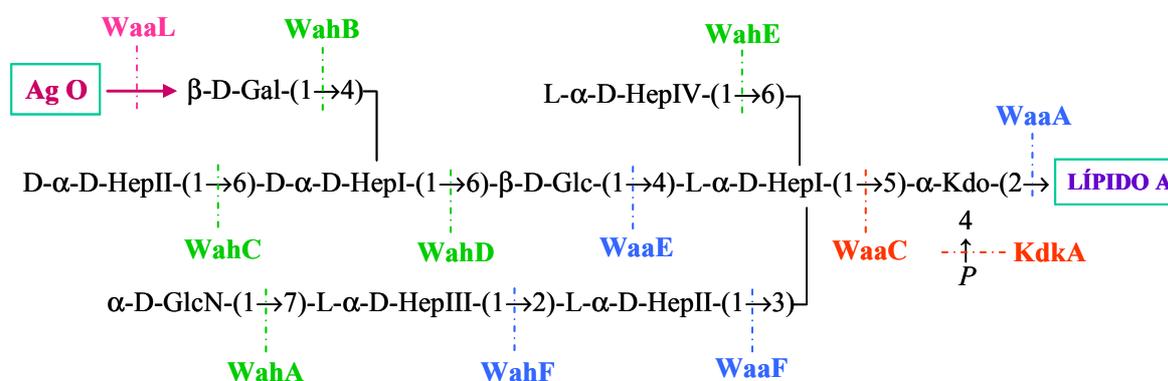


Figura 4.21. Esquema de la estructura química y de la función asignada a las enzimas implicadas en la biosíntesis del núcleo del LPS de *A. hydrophila* AH-3. Las enzimas codificadas por genes que se hallan en la región 1 están en verde, a excepción de la ligasa del antígeno O, que está en rosa; las codificadas por genes de la región 2, en azul; y las codificadas por genes de la región 3, en rojo.

El estudio de la distribución de algunos de los genes del núcleo externo y del gen *wahE* mediante sondas de ADN mostró su elevada conservación dentro de las *Aeromonas* mesófilas, siendo de esperar una conservación del núcleo interno todavía mayor.

Los datos obtenidos muestran que el núcleo interno, consistente en Kdo, tres L,D-Hep (I, II y III) y Glc, es decir, el dominio del LPS sintetizado por la regiones *wa* 2 y 3 de los genes del núcleo interno, es absolutamente necesario para la adición de los monosacáridos del núcleo externo. La ausencia de GlcN afectaba, también, significativamente, la incorporación de los azúcares del núcleo externo.

Mientras que la contribución del lípido A y del antígeno O en la patogenicidad ha sido bien estudiada, se sabe mucho menos sobre el papel que desarrolla el dominio del núcleo del LPS. El núcleo parece contribuir también en la patogénesis o en la adaptación a varias dianas del organismo hospedador, como sugiere la prevalencia de algunos tipos de núcleo entre los aislamientos clínicos. El intercambio de los dos tipos de núcleo de *K. pneumoniae* tiene un apreciable efecto en la virulencia de esta bacteria en un modelo experimental de infección animal (Regué *et al.*, 2005b). En *Yersinia pestis*, la mutación en cualquiera de los genes para la biosíntesis de la región de las heptosas del núcleo interno induce susceptibilidad a la acción bactericida del suero humano normal (Knirel *et al.*, 2007). El conocer las funciones de todos los genes implicados en las vías de biosíntesis del núcleo del LPS de *A. hydrophila* y poseer la mayoría de mutantes en cada uno de ellos permitirá la realización del trabajo experimental dirigido al estudio del papel del núcleo del LPS en la virulencia de esta bacteria.