



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

**5. Análisis genético de la agrupación  $wb_{O:34}$   
de *A. hydrophila* AH-3  
y su regulación por temperatura**

## 5.1 Precedentes

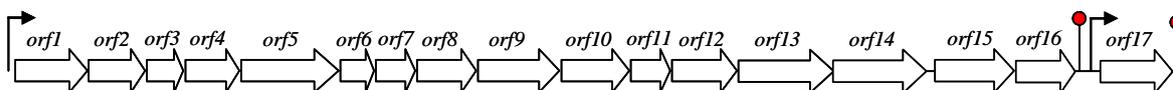
La agrupación  $wb$  del antígeno O:34 de *Aeromonas hydrophila* AH-3 había sido clonada, secuenciada y caracterizada, en parte, por nuestro grupo de investigación en un estudio anterior. Se trata de una agrupación de 17 genes que permiten la biosíntesis de un heteropolisacárido dependiente de Wzy (Aguilar, 1999). Sin embargo, restaban algunos genes por identificar y, a nivel genético, no había sido descrita la síntesis de talosa, la cual, según un estudio posterior, se vio que formaba parte de la estructura química del antígeno O:34 (Knirel *et al.*, 2002). De manera que la agrupación requería un análisis más profundo y detallado de la funcionalidad de sus genes, así como, en algunos casos, cambios en la nomenclatura utilizada.

Por otro lado, también habían sido descritos cambios en el LPS de la cepa AH-3, como consecuencia de una adaptación térmica, que implicaban la presencia o la ausencia del antígeno O:34. Las bacterias crecidas a 20°C, o a 37°C y elevada osmolaridad, presentaban moléculas de LPS de tipo S, mientras que las crecidas a 37°C en condiciones de baja osmolaridad eran de tipo R (Aguilar *et al.*, 1997), por lo que se decidió estudiar la regulación de la expresión de la agrupación  $wb_{O:34}$  a ambas temperaturas.

## 5.2 Resultados

### 5.2.1 Análisis de la secuencia nucleotídica de la agrupación $wb_{O:34}$ de *A. hydrophila* AH-3

Se procedió a reanalizar la secuencia nucleotídica de unas 18 Kb de la agrupación  $wb_{O:34}$ , implicada en la biosíntesis del antígeno O:34 del LPS de *A. hydrophila* AH-3. 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. De esta manera, se identificaron las 17 ORF, transcritas todas en la misma dirección, descritas anteriormente (Aguilar, 1999) (Fig. 5.1), así como también putativos RBS a 5' del codón de inicio de traducción de cada una de ellas.



**Figura 5.1.** Esquema de la organización genética de la agrupación  $wb_{O:34}$  de *A. hydrophila* AH-3. Los posibles promotores detectados se muestran con flechas finas y los posibles terminadores Rho-independientes, mediante círculos.

El porcentaje de G+C de la agrupación era de un 44,3%, inferior al 57-63% esperado para las especies del género *Aeromonas*.

En base a la localización de posibles secuencias promotoras a 5' de la ORF1 y de la ORF17 y de presuntos terminadores Rho-independientes a 3' de la ORF16 y de la ORF17, esta agrupación génica estaría constituida por dos unidades transcripcionales, transcritas en la misma dirección: una policistrónica formada por las 16 primeras ORF y una monocistrónica formada por la ORF17.

El análisis de la secuencia a 3' del promotor predicho a 5' de la agrupación reveló la presencia de una secuencia JUMPStart conservada con el elemento *ops* de 8 pb (GGCGGTAG), reconocido por el antiterminador RfaH, a unas 120 pb del inicio de traducción de la ORF1 (Aguilar, 1999).

La secuencia primaria de la proteína deducida de cada una de las ORF fue analizada y comparada con las de las bases de datos, con la finalidad de detectar nuevas similitudes con productos génicos descritos con anterioridad, implicados en la biosíntesis del antígeno O del LPS (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1.** Análisis y características principales de las 17 ORF de agrupación *wb*<sub>O:34</sub> de *A. hydrophila* AH-3, así como su localización en la secuencia nucleotídica (Aguilar, 1999).

ORF		Proteína homóloga (número de acceso) (% Identidad/% Similitud)	Posición nucleotídica	G+C (%)	aa	PM <sup>1</sup> (kDa)	pI <sup>2</sup>	GRAVY <sup>2</sup>
nº	Nombre de la proteína							
1	RmlB	dTDP-D-glucosa-4,6-deshidratasa, <i>A. hydrophila</i> PPD134/91 (AAM74474) (92/95) <i>E. coli</i> ATCC8739 (ACA77260) (82/89)	322-1407	56,6	361	40,5	5,1	-0,391
2	RmlA	Glucosa-1-fosfato timidiltransferasa, <i>A. hydrophila</i> PPD134/91 (AAM74475) (95/97) <i>Yersinia pestis</i> KIM (AAM83956) (75/86)	1407-2270	45,2	287	32	5,2	-0,197
3	RmlC	dTDP-4-deshidroramnosa-3,5-epimerasa, <i>A. hydrophila</i> PPD134/91 (AAM74476) (93/96) <i>E. coli</i> S88 (CAN87671) (60/75)	2283-2834	47,6	183	20,7	5,3	-0,329
4	TII	dTDP-6-desoxi-L-lixo-4-hexulosa reductasa, <i>E. coli</i> (AAZ20758) (56/72)	2837-3664	45,8	275	30,5	5,5	-0,04
5	Wzx	Flipasa de la subunidad O, <i>A. hydrophila</i> PPD134/91 (AAM74478) (37/59) <i>Salmonella enterica</i> (AAK83016) (26/45)	3664-5151	30,7	495	55,1	9,2	0,921

6	WbxB	O-acetil transferasa, <i>E. coli</i> (AAZ20764) (33/53)	5155-5661	34,6	168	18,4	9,4	0,113
7	WbxC	O-acetil transferasa, <i>A. hydrophila</i> PPD134/91 (AAM74480) (35/55) <i>Enterobacter</i> sp. 638 (ABP61321) (62/77)	5649-6245	48,1	198	21,8	9,1	0,024
8	WbxD	Ramnosiltransferasa, <i>A. hydrophila</i> PPD134/91 (AAF45033) (87/93) Glicosiltransferasa de la familia 2, <i>Enterobacter</i> sp. 638 (ABP61315) (44/63)	6230-7132	40,2	300	33,6	8,6	0,086
9	Wzy	Proteína integral de membrana, <i>A. hydrophila</i> PPD134/91 (AAM74481) (69/83) Polimerasa del antígeno O, <i>Salmonella enterica</i> (AAC38177)	7134-8381	38,9	415	46,4	8,9	0,824
10	WbxE	Manosiltransferasa, <i>A. hydrophila</i> PPD134/91 (AAF45034) (84/91) Manosiltransferasa (proteína similar), <i>Yersinia pestis</i> KIM (NP668407) (53/69)	8378-9415	43,2	345	39,2	8,5	-0,188
11	WbxF	O-acetil transferasa, <i>A. hydrophila</i> PPD134/91 (AAM74482) (83/90) <i>E. coli</i> W3110 (AAC31635) (43/58)	9419-10018	48	199	21,8	9,1	0,024
12	WbxG	Glicosiltransferasa, <i>E. coli</i> (AAZ20765) (29/50)	10008-12459	38,9	332	37,5	8,3	-0,072
13	ManC	Manosa-1-fosfato guanililtransferasa, <i>A. hydrophila</i> PPD134/91 (AAM74484) (88/94) Manosa-1-fosfato guanililtransferasa/ Manosa-6-fosfato isomerasa, <i>E. coli</i> ATCC8739 (ACA77251) (63/82)	11008-12459	43,3	483	54	5,2	-0,243
14	ManB	Fosfomanomutasa, <i>A. hydrophila</i> PPD134/91 (AAF67004) (82/90) <i>Salmonella enterica</i> (Q00330) (60/73)	12452-13882	44,1	476	51,8	5,4	0,035
15	WecA	Undecaprenil-galactosil transferasa, <i>Leptospira borgpetersenii</i> L550 (YP_797655) (51/69)	14019-15212	50,4	397	45,6	9,2	0,153
16	RmlD	dTDP-4-deshidroramnosa reductasa, <i>A. hydrophila</i> PPD134/91 (AAM74486) (73/81) <i>Salmonella enterica</i> (AAG09499)(42/60)	15219-16121	50,7	300	33	6,1	-0,038
17	Wzz	Regulador de la longitud de cadena del antígeno O, <i>A. hydrophila</i> PPD134/91 (AAM74481) (80/90) <i>Vibrio cholerae</i> (AAO88947) (32/50)	16632-17714	48	360	40,2	6,1	-0,193

<sup>1</sup> 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.

### **5.2.1.1 Biosíntesis de precursores azúcar nucleótido**

El análisis de las ORF en las bases de datos reveló que en la agrupación *wb*<sub>O:34</sub> se hallaban genes implicados en la biosíntesis de los precursores azúcar nucleótido de tres azúcares diferentes: L-ramnosa, 6-desoxi-L-talosa y D-manosa.

#### **5.2.1.1.1 Biosíntesis de dTDP-L-ramnosa y dTDP-6-desoxi-L-talosa**

##### **5.2.1.1.1.1 ORF1: *rmlB***

La ORF inicial codificaba una proteína de 361 aminoácidos que mostraba niveles elevados de identidad con proteínas con función dTDP-D-glucosa-4,6-deshidratasa de *A. hydrophila* PPD134/91 (92%) y de *E. coli* (82%), así como también de otras bacterias Gram negativas. Estas proteínas están implicadas en el segundo paso de la vía de biosíntesis de dTDP-L-Rha o dTDP-L-6dTal a partir de glucosa-1-P, por lo que el gen recibió el nombre de *rmlB*.

Los genes responsables de la biosíntesis de dTDP-L-Rha: *rmlA*, *rmlB*, *rmlC* y *rmlD*, suelen localizarse juntos en el extremo 5' de la agrupación *wb*, por lo que parecía también ser éste el caso en *A. hydrophila* AH-3.

##### **5.2.1.1.1.2 ORF2: *rmlA***

La proteína de 287 aminoácidos codificada por la ORF2 resultó ser similar a una serie de proteínas con actividad glucosa-1-P timidiltransferasa. Los niveles de identidad eran de un 97% con la proteína RmlA de *A. hydrophila* PPD134/91, de un 85% con la proteína RffH de *Yersinia pestis* y de alrededor del 85%, también, con la de otras bacterias Gram negativas. Esta proteína cataliza la primera reacción necesaria para la biosíntesis de dTDP-L-Rha o dTDP-L-6dTal a partir de glucosa-1-P, de manera que el gen se denominó *rmlA*.

##### **5.2.1.1.1.3 ORF3: *rmlC***

La ORF3 codificaba una proteína de 183 aminoácidos que presentaba niveles altos de similitud e identidad con proteínas con función dTDP-4-deshidroramnosa-3,5-epimerasa. La similitud con la proteína RmlC de *A. hydrophila* PPD134/91 era de un 96% y con la de *E. coli*, de un 75%, similar al valor mostrado con la de otras bacterias. Se trata de la tercera proteína implicada en la ruta de biosíntesis de dTDP-L-Rha o dTDP-L-6dTal y el gen fue denominado *rmlC*.

El orden de los genes relacionados con la biosíntesis de dTDP-L-Rha suele ser *rmlBDAC* en la familia *Enterobacteriaceae*, aunque en otras especies no pertenecientes a esta familia puede variar, siendo *rmlBADC*, por ejemplo, en el caso de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Samuel y Reeves, 2003). De manera que en el caso de AH-3, nos encontraríamos delante de una organización genética diferente en esta región.

#### 5.2.1.1.1.4 ORF4: *tll*

La proteína de 275 aminoácidos codificada por la ORF4 presentaba una similitud del 72% y una identidad del 56% con una proteína con actividad dTDP-6-desoxi-L-lixo-4-hexulosa reductasa, Tll, de *E. coli*. Por otro lado, aparecían niveles parecidos con una epimerasa/deshidratasa de *Enterobacter* sp. (73% de similitud y 57% de identidad) y niveles menores con putativas oxidoreductasas/epimerasas de *Azotobacter vinelandii* (48% de similitud y 32% de identidad) y *Sinorhizobium meliloti* (46% de similitud y 33% de identidad). Proteínas con esta actividad serían responsables del último paso de biosíntesis de la dTDP-L-6dTal a partir de dTDP-4-ceto-6-desoxi-L-manosa (dTDP-6-desoxi-L-lixo-4-hexulosa).

Sin embargo, la proteína de *A. hydrophila* PPD134/91 con la que presentaba una elevada identidad, del 91%, había sido considerada una dTDP-D-glucosa-4,6-deshidratasa (RmlB).

La vía para la biosíntesis de dTDP-L-6dTal ha sido caracterizada en *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y en ella participan los productos de los genes *rmlA*, *rmlB*, *rmlC* y *tll* (Nakano *et al.*, 2000), de manera que la ORF4 podría corresponder al gen *tll* de *A. hydrophila*, por lo que recibió este nombre.

#### 5.2.1.1.1.5 ORF16: *rmlD*

La ORF16 codificaba una proteína de 300 aminoácidos que mostraba similitud con una serie de proteínas con actividad dTDP-4-deshidroramnosa reductasa. Las proteínas con las que presentaba mayor similitud eran RmlD de *A. hydrophila* PPD134/91 (81%) y de *Salmonella enterica* (60%). El producto de esta ORF correspondería a la enzima responsable del paso final de biosíntesis de la dTDP-L-Rha, reduciendo el mismo sustrato que utiliza la enzima Tll para sintetizar la dTDP-L-6dTal, por lo que el gen recibió el nombre de *rmlD*.

En el caso de la agrupación *wb*<sub>0:34</sub>, los genes *rml*, frecuentemente hallados formando

un grupo, presentan una organización distinta. Los genes *rmlBAC* se localizan uno adyacente del otro, pero el gen *rmlD* aparece separado unas 12,4 Kb, en el extremo 3' de la agrupación.

Por otro lado, la presencia de este gen *rmlD* puede que no sea necesaria para la biosíntesis del antígeno O:34, debido a que en su composición química no está presente la ramnosa (Knirel *et al.*, 2002).

### **5.2.1.1.2 Biosíntesis de GDP-manosa**

#### **5.2.1.1.2.1 ORF13: *manC***

La proteína codificada por la ORF13, de 483 aminoácidos, presentaba una elevada identidad y similitud con proteínas con función manosa-1-P guanililtransferasa (GDP-manosa pirofosforilasa) de una gran cantidad de bacterias Gram negativas. El nivel de similitud con la proteína ManC de *A. hydrophila* PPD134/91 era del 94% y el de identidad, del 88%. Por otro lado, también, presentaba una similitud elevada con algunas proteínas ManC descritas como bifuncionales, con actividad manosa-1-P guanililtransferasa y manosa-6-P isomerasa, como la de una *E. coli* (82% de similitud y 63% de identidad). En base a estos resultados, el gen recibió el nombre de *manC*.

La manosa es una hexosa frecuente en antígenos O de *E. coli*, *S. enterica* y otras bacterias Gram negativas. La enzima ManC está implicada en el último paso de biosíntesis del precursor GDP-Man a partir de manosa-1-P, y en los casos en los que es bifuncional, podría también llevar a cabo la función de la enzima ManA y actuar sobre la fructosa-6-P para convertirla en su isómero manosa-6-P.

#### **5.2.1.1.2.2 ORF14: *manB***

La proteína de 476 aminoácidos codificada por la ORF14 mostraba elevados niveles de identidad y similitud con numerosas enzimas con actividad fosfomanomutasa de diferentes bacterias Gram negativas. Los niveles más altos de similitud correspondían a la proteína ManB de *A. hydrophila* PPD134/91 (90%) y a la de *Salmonella enterica* (73%). Al gen se lo denominó, por lo tanto, *manB*.

La proteína ManB está implicada, junto con ManC, en la vía de biosíntesis de GDP-Man a partir de manosa-6-P. En general, los genes que codifican ambas enzimas se sitúan juntos en la agrupación *wb*.

### 5.2.1.2 Transferasas de azúcares

En base a la estructura química del antígeno O:34, tres genes implicados en la transferencia de azúcares serían los responsables de la unión de la D-Man y de los dos residuos distintos de L-6dTal a la subunidad del antígeno O en formación.

#### 5.2.1.2.1 ORF8: *wbxD*

La ORF8 codificaba una proteína de 300 aminoácidos que presentaba una similitud del 93% y una identidad del 87% con una ramnosiltransferasa de *A. hydrophila* PPD134/91. Mostraba, a su vez, niveles inferiores, de un 63% de similitud y de un 44% de identidad, con una glicosiltransferasa de la familia 2 de *Enterobacter* sp. y valores parecidos con otras glicosiltransferasas de la misma familia de otras bacterias Gram negativas.

Se trata de una proteína que contenía, ciertamente, un dominio conservado de las glicosiltransferasas de la familia 2 (aminoácidos 12 a 192), implicados, algunos de sus miembros, en la transferencia de L-Rha. Esta enzima, podría, por lo tanto, ser la responsable de la transferencia de uno de los residuos de 6dTal, azúcar epímero de la L-Rha, y el gen que la codifica recibió el nombre de *wbxD*.

#### 5.2.1.2.2 ORF10: *wbxE*

La proteína de 345 aminoácidos codificada por la ORF10 presentaba similitud con diversas manosiltransferasas de distintas bacterias. Los niveles de similitud e identidad eran, respectivamente, del 91% y del 84%, con una manosiltransferasa de *A. hydrophila* PPD134/91; y del 69% y del 53%, con una proteína parecida a una manosiltransferasa de *Yersinia pestis*.

Esta proteína contenía un dominio conservado de la familia 1 de glicosiltransferasas (aminoácidos 162 a 323) y podría ser la encargada de la unión del residuo de D-Man. El gen que la codifica fue denominado *wbxE*.

#### 5.2.1.2.3 ORF12: *wbxG*

La ORF12 codificaba una proteína de 332 aminoácidos que, aunque no presentaba dominios conservados, mostraba un 50% de similitud y un 29% de identidad con la glicosiltransferasa WfaE de *E. coli* y similitudes inferiores, de alrededor del 24%, con la glicosiltransferasa de biosíntesis capsular CpsH de *Streptococcus iniae* y con otras

putativas proteínas implicadas en la biosíntesis del LPS de varias bacterias. Respecto a *A. hydrophila* PPD134/91, presentaba una identidad del 86% con una proteína de función desconocida.

El producto de esta ORF podría incorporar mediante una función glicosiltransferasa uno de los dos residuos de 6dTal de la subunidad del antígeno O:34 y el gen recibió el nombre de *wbxG*.

### **5.2.1.3 Transferasas de grupos acetilo**

En la agrupación *wb*<sub>O:34</sub>, se identificaron tres ORF que codificaban proteínas similares a *O*-acetiltransferasas que participarían en la adición de grupos acetilo a diferentes posiciones de la 6dTal, ya que la subunidad repetitiva del antígeno O:34 de *A. hydrophila* presenta tres grupos acetilo. La 6dTal<sup>I</sup> está *O*-acetilada estequiométricamente en la posición 2 y la 6dTal<sup>II</sup>, que forma parte de la ramificación, puede contener uno o dos grupos *O*-acetilo en cualquier posición o estar desacetilada (Knirel *et al.*, 2002). Los genes responsables de las modificaciones del antígeno O suelen localizarse fuera de la agrupación *wb* (Samuel y Reeves, 2003), en cambio los genes que modifican con acetilaciones el antígeno O:34 formaban parte de ella.

#### **5.2.1.3.1 ORF6: *wbxB***

La proteína de 168 aminoácidos codificada por la ORF6 mostraba un 53% de similitud y un 33% de identidad con la *O*-acetiltransferasa WfaD de *E. coli* y niveles parecidos con una *O*-acetiltransferasa de *Vibrio fischeri* y con muchas otras de diferentes bacterias con esta misma función putativa. Así mismo, los niveles eran de un 29% de identidad y de un 55% de similitud con una putativa *O*-acetiltransferasa de *A. hydrophila* PPD134/91.

Se trataba de una proteína que estaría encargada de la acetilación del antígeno O:34 y el gen que la codificaba recibió el nombre de *wbxB*.

#### **5.2.1.3.2 ORF7: *wbxC***

La ORF7 codificaba una proteína de 198 aminoácidos que presentaba también similitud con varias proteínas encargadas de la transferencia de grupos acetilo al antígeno O. Los niveles mayores fueron con una *O*-acetiltransferasa de *Enterobacter* sp. (77% de similitud y 62% de identidad) y resultaron inferiores con una *O*-acetiltransferasa de *A. hydrophila* PPD134/91 (55% de similitud y 37% de identidad) y con la proteína WfaD de

*E. coli* (47% de similitud y 31% de identidad).

El gen que codificaba esta segunda proteína implicada en acetilación fue denominado *wbxC*.

#### **5.2.1.3.3 ORF11: *wbxF***

La proteína codificada por la ORF11, de 199 aminoácidos, era también similar a proteínas que transferían grupos acetilo. Presentaba un 90% de similitud y un 83% de identidad con una *O*-acetiltransferasa de *A. hydrophila* PPD134/91 y niveles de un 58% de similitud y de un 43% de identidad con la proteína WbbJ de *E. coli*.

Al gen que codificaba esta tercera proteína implicada en acetilación se lo denominó *wbxF*.

#### **5.2.1.4 Iniciación, translocación y polimerización de las subunidades**

##### **5.2.1.4.1 ORF15: *wecA***

La proteína de 397 aminoácidos codificada por la ORF15 presentaba similitud con proteínas encargadas de la transferencia de azúcares-fosfato, a partir de su precursor activado, al transportador lipídico undecaprenil-fosfato. Niveles de un 69% de similitud y de un 51% de identidad aparecían con la undecaprenil-galactosil transferasa de *Leptospira borgpetersenii*; y de un 64% de similitud y un 43% de identidad con la transferasa de glucosa-P al transportador lipídico de *Oceanobacter* sp. Así mismo, esta proteína también mostraba niveles menores de similitud con otras transferasas de galactosa-P o glucosa-P de otras bacterias Gram negativas. El nivel de identidad con la putativa transferasa de glucosa-P al transportador lipídico de *A. hydrophila* PPD134/91 era del 96%.

Mediante el análisis de hidrofobicidad de esta proteína, se identificaron 4 putativos dominios transmembrana (aminoácidos 24-46, 53-75, 85-102 y 214-235), lo que sugería que se trataba de una proteína integral de membrana. Debido a la presencia de GalNAc en la estructura química del antígeno O:34, el producto de esta ORF podría estar implicado en la reacción de iniciación de la formación de las subunidades repetitivas mediante la transferencia de GalNAc-P al transportador lipídico, por lo que el gen que la codifica recibió el nombre de *wecA*.

##### **5.2.1.4.2 ORF5: *wzx***

La ORF5 codificaba una proteína de 495 aminoácidos que presentaba cierta similitud

con proteínas con actividad flipasa implicadas en el transporte de las subunidades del antígeno O a través de la membrana interna. Los niveles de similitud e identidad fueron, respectivamente, de un 59% y de un 37% con la proteína Wzx de *A. hydrophila* PPD134/91; de un 45% y de un 26% con la proteína Wzx de *Salmonella enterica* y de alrededor de éstos valores con las proteínas RfbE de *Shigella flexneri* y Wzx de *Francisella tularensis*. En base a estos resultados, al gen se lo denominó *wzx*.

La proteína Wzx presentaba 14 putativos dominios transmembrana (aminoácidos 12-34, 44-66, 87-107, 127-149, 162-179, 184-206, 227-249, 259-281, 303-325, 345-367, 380-397, 402-424, 436-455 y 460-482), tratándose, pues, de una proteína integral de membrana. La presencia de 10 a 12 dominios transmembrana, así como, la baja similitud en su secuencia primaria entre las de diferentes especies, son características comunes de estas flipasas (Marolda *et al.*, 2004).

#### **5.2.1.4.3 ORF9: *wzy***

La proteína codificada por la ORF9, de 415 aminoácidos, mostraba una similitud del 83% con una proteína integral de membrana de *A. hydrophila* PPD134/91, considerada la putativa polimerasa del antígeno O. La similitud resultaba mucho menor, del 41%, con la proteína Wzy de *Salmonella enterica*. El análisis de hidrofobicidad y la identificación de 10 dominios transmembrana (aminoácidos 7-29, 33-35, 68-85, 100-122, 129-148, 163-185, 194-216, 226-244, 331-353 y 377-399), sugería que también se trataba de una proteína integral de membrana.

Estos resultados hicieron considerar a esta proteína como la posible antígeno O polimerasa Wzy, implicada en la polimerización de las subunidades del antígeno O en la cara periplasmática de la membrana interna. Se trata de proteínas que presentan de 8 a 12 dominios transmembrana y una baja similitud en su secuencia primaria entre las de diferentes especies, debido a una elevada especificidad por el sustrato (Samuel y Reeves, 2003).

La presencia de este gen, denominado *wzy*, junto con el gen *wzx* (ORF5) en la agrupación *wb<sub>O:34</sub>* indica un sistema de polimerización del antígeno O dependiente de Wzy, característico de la biosíntesis de antígenos O heteropolisacáridicos.

#### **5.2.1.4.4 ORF17: *wzz***

La última ORF de la agrupación *wb<sub>O:34</sub>* codificaba una proteína de 360 aminoácidos

que mostraba similitud con algunos reguladores de la longitud de la cadena del antígeno O. Así, presentaba una similitud del 90% y una identidad del 80% con la proteína Wzz de *A. hydrophila* PPD134/91 y mostraba, además, niveles inferiores, de un 50% de similitud y de un 32% de identidad, con la proteína Wzz de *Vibrio cholerae*. Por otro lado, también aparecía una similitud del 47% y una identidad del 30% con la proteína FepE de *E. coli*, la cual presenta un perfil de hidrofobicidad parecido al de Wzz, relacionada con el transporte de enterobactina (Whitfield *et al.*, 1997). De manera que el gen correspondiente a esta ORF fue denominado *wzz*.

Dos putativos dominios transmembrana fueron identificados en la proteína Wzz (aminoácidos 41-63 y 332-354) en las regiones N-terminal y C-terminal, quedando un gran dominio central hidrofílico situado en la cara periplasmática de la membrana interna, esencial para llevar a cabo su función (Guo *et al.*, 2006).

La presencia del gen *wzz*, junto con los genes *wzy* (ORF9) y *wzx* (ORF5), corrobora un sistema de biosíntesis Wzy-dependiente.

### **5.2.2 Unidades transcripcionales de la agrupación *wb*<sub>O:34</sub> de *A. hydrophila* AH-3**

Para confirmar las dos unidades transcripcionales determinadas *in silico* de la agrupación *wb*<sub>O:34</sub>, se realizaron ensayos de RT-PCR entre diferentes genes de la agrupación. Para ello, se aisló ARN total, libre de ADN, de la cepa AH-3 crecida en TSB a 20°C y a 37°C (ver Material y Métodos, 3.8.1.3) y, mediante *random* RT, se sintetizó la primera cadena de ADNc para, posteriormente, mediante PCR con cebadores específicos, comprobar las unidades transcripcionales predichas (ver Material y Métodos, 3.8.9.3). Los cebadores empleados en cada una de las PCR se detallan en el apartado 3.4.8 de Material y Métodos.

Para la amplificación del transcrito correspondiente al conjunto *rmlB-rmlD* (ORF1-ORF16) (Fig. 5.1), se emplearon tres parejas de cebadores: A3-B1 y A3-TR4 (4524 pb), situados en los genes *rmlB* (ORF1) y *wbxC* (ORF7), respectivamente; A3-TR3 y A3-NR (4410 pb), localizados en *wbxC* y *wbxG* (ORF12); A3-NF y A3-RO4 (4804 pb), situados en *wbxG* y *rmlD*. Todas las amplificaciones anteriores fueron positivas, tanto a 20°C como a 37°C, confirmando así, que los 16 genes de este grupo se transcriben juntos.

Por otro lado, también se amplificó el transcrito correspondiente al gen *wzz* (ORF17)

mediante los cebadores GSP2-O34 y GSP3-O34 (253 pb), localizados en una región interna, pero la intensidad de la banda obtenida fue mucho mayor a 20°C que a 37°C. Sin embargo, no se obtuvo amplificación en la región comprendida entre el gen *rmlD* y el gen *wzz*, empleando la pareja de oligonucleótidos A3-RO3 y A3-PRP (253 pb), localizados en los genes *rmlD* y *wzz*, respectivamente, a ambas temperaturas, confirmando que el gen *wzz* se transcribe de manera independiente.

Estos resultados indican que dichos genes forman parte de dos unidades transcripcionales distintas, de acuerdo con la predicción inicial.

### **5.2.3 Construcción de mutantes en los genes *wecA*, *wzy* y *wzz* de la agrupación *wb*<sub>O:34</sub> de *A. hydrophila* AH-3**

Con el fin de determinar la funcionalidad de los genes *wecA*, *wzy* y *wzz* de la agrupación *wb*<sub>O:34</sub> de *A. hydrophila* AH-3, se decidió construir mutantes mediante mutagénesis dirigida por doble recombinación de manera que no se alterase la pauta de lectura y se evitase un posible efecto polar en el resto de genes de la agrupación (ver Material y Métodos, 3.8.13.3), ya que, aunque se disponía de mutantes en los dos primeros genes, éstos habían sido obtenidos como resultado de la inserción del transposón miniTn5::Km1 (Aguilar, 1999).

Se realizaron, a partir de ADN cromosómico de la cepa AH-3, las PCR A-B y C-D con los cebadores descritos en el apartado 3.4.8 de Material y Métodos. De esta manera, se obtuvieron los fragmentos que sirvieron de molde en las PCR A-D. Los extremos de los productos de amplificación obtenidos (de 1132 pb, en el caso de *wecA*; 1176 pb, en el caso de *wzy*; y 1068 pb en el caso de *wzz*), copias delecionadas de cada uno de los genes, fueron digeridos con las enzimas de restricción: *Bam*HI, en el caso del gen *wecA*, y *Sal*II, en el caso de los genes *wzy* y *wzz*, cuyas dianas habían sido incluidas en los cebadores A y D. Cada uno de los fragmentos, se ligó, posteriormente, al vector suicida pDM4 digerido con *Bgl*III o *Sal*II, según el caso, y desfosforilado, y se transformó a la cepa *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir). Las colonias transformantes se seleccionaron a 30°C en placas de LB con cloranfenicol y, mediante la purificación del plásmido y la digestión con *Sal*I y, en el caso de la construcción con el gen *wecA*, con *Sph*I y *Sal*II, que flanquean el lugar de inserción, se comprobó la presencia del inserto.

A continuación, las construcciones obtenidas se transfirieron, independientemente, a

la cepa AH-405, mutante de AH-3 resistente a la rifampicina, mediante conjugación triparental seleccionando los transconjugantes a 30°C en placas de TSA con rifampicina y cloranfenicol. La inserción del vector en el cromosoma, mediante una primera recombinación, se comprobó por PCR con los cebadores A y D, con los que se obtenían dos bandas: una banda correspondiente a la copia correcta del gen y otra a la copia delecionada.

Finalmente, se realizó un banco de diluciones con cada uno de los transconjugantes para cada una de las mutaciones, se plaqueó en TSA con sacarosa al 15% y se incubó a 30°C. Se comprobó la capacidad de crecimiento en placas de LB suplementadas con cloranfenicol de las colonias obtenidas y se eligieron aquellas que fueron sensibles al antibiótico. Los candidatos se comprobaron por PCR con los cebadores A y D y se seleccionaron aquellos mutantes en los que, debido a una segunda recombinación, quedaba una única copia delecionada del gen mutado en el cromosoma, además, también se secuenció el producto de la amplificación para comprobar que en la región delecionada se mantenía la pauta de lectura.

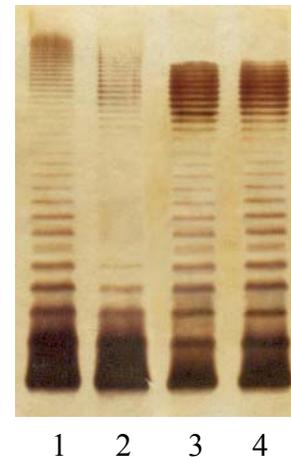
#### **5.2.4 Caracterización del LPS de *A. hydrophila* AH-3 y PPD134/91 y de los mutantes AH-405 $\Delta$ *wecA*, AH-405 $\Delta$ *wzy* y AH-405 $\Delta$ *wzz***

##### **5.2.4.1 Caracterización del LPS de *A. hydrophila* AH-3 y *A. hydrophila* PPD134/91**

Con el fin de analizar molecularmente el LPS de *A. hydrophila* AH-3 a las temperaturas de 20°C y 37°C, se obtuvieron muestras de LPS de crecimientos realizados a ambas temperaturas (ver Material y Métodos, 3.7.1.2) y se determinó su perfil electroforético mediante SDS-PAGE (ver Material y Métodos, 3.7.2) (Fig. 5.2). Por otro lado, también se realizó una extracción de las moléculas de LPS por el método fenol-agua a partir de células deshidratadas de la cepa AH-3 crecida a 20°C y a 37°C (ver Material y Métodos, 3.7.1.1) y se llevó a cabo el análisis de su composición química mediante la metilación de los monosacáridos (ver Material y Métodos, 3.7.3.4) para poder establecer la relación entre el núcleo del LPS y las unidades de repetición del antígeno O:34. En este sentido, se utilizó la relación entre la Glc, ya que hay un único residuo en el núcleo del LPS, y la Man, que se encuentra en forma de residuo único en la unidad repetitiva del antígeno O de la cepa a AH-3.

El LPS de la cepa AH-3 crecida a 20°C presentaba una relación de, aproximadamente, 1Glc/20Man, lo que indica un promedio de unas 20 subunidades del antígeno O:34 por cada molécula de núcleo. Sin embargo, el LPS obtenido de esta cepa crecida a 37°C mostraba, aproximadamente, una relación de 1Glc/2Man.

La subpoblación de moléculas de LPS a 20°C y a 37°C de la cepa AH-3, tal y como se observa en el gel de SDS-PAGE, es completamente diferente. A 20°C, existe una subpoblación de moléculas de S-LPS que presentan diferente cantidad de subunidades del antígeno O:34, de manera que aunque el promedio sea de 20 subunidades por cada molécula de núcleo, se incluyen moléculas de LPS que contienen de 1 hasta más de 40 repeticiones. Sin embargo, a 37°C, la subpoblación de moléculas de LPS está formada, principalmente, por R-LPS y, ocasionalmente, por algunas moléculas de S-LPS con un número muy elevado de subunidades del antígeno O:34, lo que da lugar a un promedio de dos unidades repetitivas por cada molécula de núcleo pero no distribuidas de una manera uniforme (Fig. 5.2).



**Figura 5.2.** Gel de SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de muestras de LPS de *A. hydrophila* AH-3 (carriles 1 y 2) y PPD134/91 (3 y 4) crecidas a 20°C (1 y 3) y a 37°C (2 y 4).

Por otro lado, con el fin de comprobar si también existían diferencias en el perfil electroforético del LPS de la cepa de *A. hydrophila* PPD134/91 (serotipo O:18) debidas a la temperatura, se analizaron las moléculas de LPS obtenidas a partir de su crecimiento a 20°C y a 37°C mediante SDS-PAGE. En este caso, el perfil de su LPS resultó ser idéntico a ambas temperaturas, con una expresión completa del antígeno O (Fig. 5.2).

#### **5.2.4.2 Caracterización del LPS de los mutantes AH-405ΔwecA, AH-405Δwzy y AH-405Δwzz**

Se obtuvieron muestras de LPS de los mutantes de la cepa AH-3 contruidos por doble recombinación a partir de su crecimiento a 20°C y a 37°C (ver Material y Métodos, 3.7.1.2) y se determinó el perfil electroforético de las mismas mediante SDS-PAGE y SDS-Tricine-PAGE (ver Material y Métodos, 3.7.2).

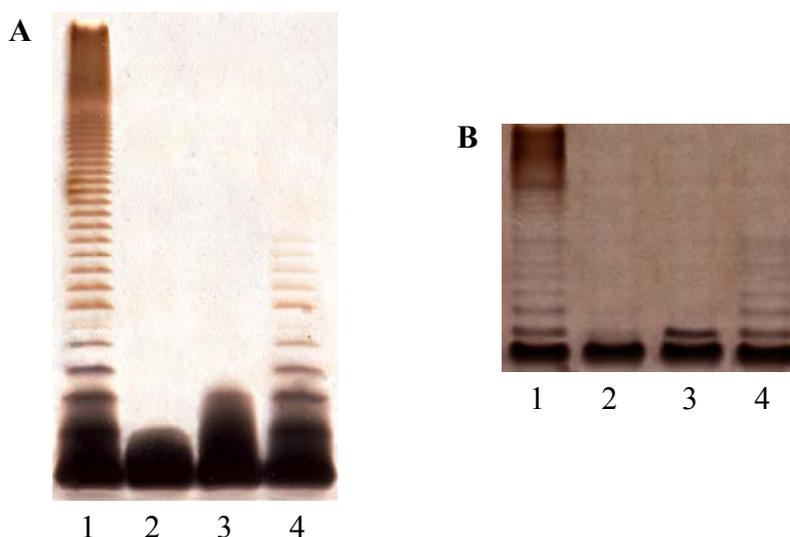
En el gel de SDS-PAGE, se apreciaba que los mutantes AH-405ΔwecA y

AH-405 $\Delta$ *wzy* carecían de las bandas de elevado peso molecular correspondientes al antígeno O del LPS, sin embargo en el gel de SDS-Tricine-PAGE, en el caso del mutante AH-405 $\Delta$ *wzy*, podía observarse la presencia de una banda intensa al mismo nivel que la primera repetición del antígeno O de la cepa parental (Fig. 5.3).

El fenotipo observado en el mutante AH-405 $\Delta$ *wecA* concuerda con el hecho de haber mutado la transferasa iniciadora de la síntesis del antígeno O, mientras que el LPS del mutante AH-405 $\Delta$ *wzy*, presenta un patrón de tipo SR-LPS, en el que sólo existiría una repetición de la unidad básica del antígeno O por la falta de la proteína encargada de su polimerización.

El mutante AH-405 $\Delta$ *wzz* mostraba un LPS que presentaba antígeno O pero no aparecían las bandas correspondientes a cadenas de antígeno O formadas por un número elevado de repeticiones, de manera que se perdía la distribución modal de longitudes típica de la cepa parental (Fig. 5.3).

El fenotipo de los tres mutantes resultó ser el mismo tanto a 20°C como a 37°C.



**Figura 5.3.** 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-405 $\Delta$ *wecA* (2), AH-405 $\Delta$ *wzy* (3) y AH-405 $\Delta$ *wzz* (4). Todas las cepas fueron crecidas a 20°C.

Por otro lado, se obtuvieron también moléculas de LPS por el método fenol-agua o por el método PCP a partir de células deshidratadas de cada uno de los mutantes, habiendo realizado los crecimientos a 20°C y a 37°C (ver Material y Métodos, 3.7.1.1) y se analizó su composición química mediante la metilación de los monosacáridos (ver Material y

Métodos, 3.7.3.4) para llevar a cabo su caracterización molecular.

No se observó Man en el mutante AH-405 $\Delta$ *wecA* crecido a 20°C o a 37°C, lo que era indicativo de la ausencia total del antígeno O del LPS. En cambio, la relación era de 1Glc/1Man en el caso del LPS del mutante AH-405 $\Delta$ *wzy*, tanto a 20°C como a 37°C, hecho característico de los mutantes en la polimerasa del antígeno O, los cuales contienen una única repetición de su subunidad. El LPS del mutante AH-405 $\Delta$ *wzz*, crecido tanto a 20°C como a 37°C, mostraba, sin embargo, una relación de 1Glc/4Man, lo que indicaba un promedio de 4 subunidades del antígeno O:34 por cada molécula de núcleo, como resultado de una subpoblación de formas S del LPS que contenían de 1 hasta 10 subunidades (Fig. 5.3).

### **5.2.5 Análisis de complementación de los mutantes AH-405 $\Delta$ *wecA*, AH-405 $\Delta$ *wzy* y AH-405 $\Delta$ *wzz***

Se realizaron ensayos de complementación de los mutantes obtenidos en los genes *wecA*, *wzy* y *wzz* de la agrupación *wb*<sub>O:34</sub> de *A. hydrophila* AH-3 con el fin de comprobar la recuperación del fenotipo debido a la reintroducción del gen mutado.

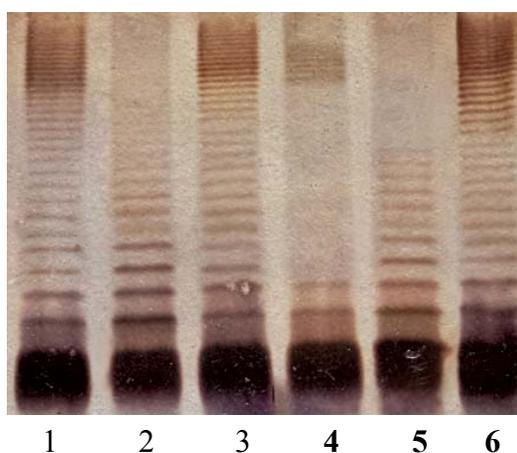
Cada uno de los genes se amplificó a partir de ADN cromosómico de la cepa AH-3 con los cebadores descritos en el apartado 3.4.8 de Material y Métodos. Los productos amplificados (de 1497 pb, en el caso de *wecA*; 1596 pb, en el caso de *wzy*; y 1234 pb, en el caso de *wzz*) se digirieron con las enzimas de restricción cuya diana había sido incluida en el diseño de los cebadores: *ScaI*, en el cebador directo, y *PstI*, o *SalI* en el caso del gen *wzz*, en el cebador reverso. Cada uno de los fragmentos obtenidos se ligó al vector pBAD33 digerido con las enzimas *SmaI* y *PstI* o *SalI*, dependiendo del caso, asegurando la correcta orientación de los genes bajo el control del promotor P<sub>BAD</sub> (ver Material y Métodos, 3.8.15.1). Las ligaciones se transfirieron por separado a la cepa de *E. coli* LMG194 mediante electroporación, se seleccionaron los transformantes a 30°C en placas de LB con cloranfenicol y 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 correspondiente mediante conjugación triparental, se seleccionaron los transconjugantes en placas de TSA con cloranfenicol y rifampicina a 30°C y se confirmaron mediante PCR del plásmido purificado con los cebadores específicos de cada gen. 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 de cada uno de los mutantes se llevaron a cabo tanto a 20°C como a 37°C y 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. Los mutantes AH-405 $\Delta$ *wecA* y AH-405 $\Delta$ *wzy* recuperaban el fenotipo electroforético del LPS de *A. hydrophila* AH-3, a 20°C y a 37°C, al ser complementados con el gen correspondiente clonado en el vector pBAD33 en condiciones de inducción de su expresión, mientras que no se observaba ningún cambio del fenotipo en la complementación con el vector sin inserto.

Sin embargo, el LPS del mutante AH-405 $\Delta$ *wzz* complementado con pBAD-*wzz* en condiciones de inducción con arabinosa, tanto a 20°C como a 37°C, mostraba un patrón electroforético idéntico al de la cepa AH-3 crecida a 20°C (Fig. 5.4). El análisis de la composición química de los monosacáridos del LPS, realizado a continuación, mostraba también, a ambas temperaturas, una relación de 1Glc/20Man típica de la cepa AH-3 crecida a 20°C. Debido a que en el ensayo de complementación realizado, el gen *wzz* se hallaba bajo el control del promotor P<sub>BAD</sub> del vector de expresión, se pensó que quizás el promotor propio de este gen podía presentar una regulación por temperatura, lo que implicaría niveles diferentes de expresión del gen *wzz*, pudiendo ser el responsable del diferente fenotipo del LPS de la cepa AH-3 a 20°C y a 37°C.



**Figura 5.4.** Gel de SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de muestras de LPS de *A. hydrophila* AH-405 (carriles 1 y 4), AH-405 $\Delta$ *wzz* (carriles 2 y 5), AH-405 $\Delta$ *wzz* complementado con pBAD-*wzz* (carriles 3 y 6). Las cepas de los carriles 1, 2 y 3 fueron crecidas a 20°C y las de los carriles 4, 5, y 6, a 37°C. La cepa con el plásmido pBAD33 fue crecida bajo condiciones de inducción.

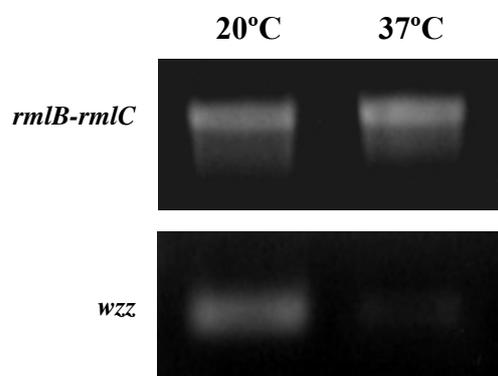
## 5.2.6 Análisis de la regulación por temperatura de la agrupación $wb_{O:34}$ de *A. hydrophila* AH-3

### 5.2.6.1 Análisis transcripcional mediante RT-PCR semicuantitativa

Para analizar si la transcripción de la agrupación génica  $wb_{O:34}$  presentaba una regulación por temperatura, se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativa de la región que comprendía los genes *rmlB-rmlC* y de una región interna al gen *wzz* a 20°C y a 37°C.

Para ello, se aisló el ARN total, libre de ADN, de *A. hydrophila* AH-3 crecida en TSB a 20°C y a 37°C (ver Material y Métodos, 3.8.1.3) y, mediante *random* RT, se sintetizó la primera cadena de ADNc. La PCR semicuantitativa se llevó a cabo con los cebadores A3-B1 y A3-CF2 (1126 pb) para amplificar un fragmento de la región *rmlB-rmlC* y con los cebadores GSP2-034 y GSP3-034 (253 pb) para amplificar un fragmento interno del gen *wzz*. Paralelamente, también se realizó el ensayo con cebadores del gen *rrsA* (137 pb), que codifica el ARNr 16S de *A. hydrophila*, como control de los niveles de transcripción (ver Material y Métodos, 3.8.9.3.1). Los cebadores empleados se describen en los apartados 3.4.4 y 3.4.8 de Material y Métodos.

El análisis en geles de agarosa de las alícuotas de los productos de PCR, obtenidas en diferentes ciclos de la amplificación, indicaba que los niveles de transcripción de la región *rmlB-rmlC* eran similares a 20°C y a 37°C, mientras que la transcripción del gen *wzz* era significativamente superior a 20°C, lo que sugiere una posible regulación negativa de la transcripción del gen *wzz* a 37°C. No se apreciaron, por otro lado, diferencias debidas a la temperatura en la intensidad de las bandas del gen *rrsA* durante la fase exponencial de la PCR (Fig. 5.5).



**Figura 5.5.** Fragmentos de ADNc, correspondientes al ciclo 25 de la PCR, obtenidos mediante RT-PCR de la región *rmlB-rmlC* y de una región interna al gen *wzz* de *A. hydrophila* AH-3 a partir del ARN total aislado de la cepa crecida a 20°C y a 37°C.

### 5.2.6.2 Localización del promotor del gen *wzz* de *A. hydrophila* AH-3

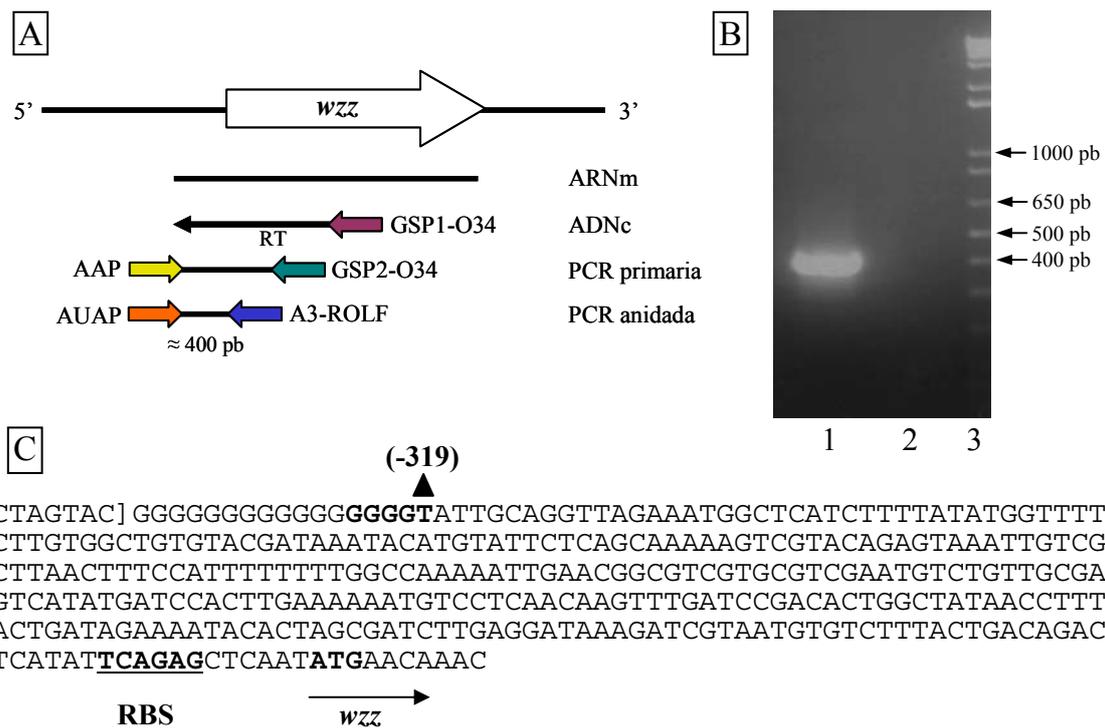
El análisis *in silico* del putativo promotor  $\sigma^{70}$  del gen *wzz* de *A. hydrophila* AH-3 en la región de unos 500 pb comprendida entre su inicio de traducción y el codón de terminación del gen *rmlD*, había revelado la existencia de tres posibles inicios de transcripción.

Con el fin de determinar la localización exacta del verdadero promotor del gen *wzz* para poder llevar a cabo posteriores análisis de expresión, se realizó un ensayo de 5' RACE que permitió hallar el inicio de transcripción del gen mediante la amplificación y secuenciación del extremo 5' de su ADNc (ver Material y Métodos 3.8.9.4).

La primera cadena de ADNc fue sintetizada a partir del ARN total, libre de ADN, aislado de *A. hydrophila* AH-3 crecida en medio líquido TSB a 20°C (ver Material y Métodos, 3.8.1.3) mediante RT con el cebador GSP1-O34 interno al gen *wzz*. El ADNc, una vez purificado y sometido a la adición de una cola de citosinas, fue amplificado mediante PCR con los cebadores AAP y GSP2-O34. Aunque con esta amplificación no se obtuvo ninguna banda, la siguiente PCR anidada con los cebadores AUAP y A3-ROLF dio lugar a una banda única de, aproximadamente, 400 pb, la cual fue purificada y secuenciada con el cebador A3-ROLF (Fig. 5.6).

Después de cada paso, se comprobaba la presencia de ADNc en la muestra mediante una PCR interna realizada con los cebadores GSP2-O34 y GSP3-O34 (253 pb). Cada uno de los cebadores se detalla en los apartados 3.4.3 y 3.4.8 de Material y Métodos.

La secuencia de la banda amplificada contenía los residuos de guanina, resultado de la adición de citosinas realizada, que indicaban que el inicio de transcripción estaba localizado en el nucleótido de la posición -319 del inicio de traducción del gen *wzz*. Sin embargo, debido a la cola de residuos de guanina generada, no es posible descartar que el inicio de transcripción se halle situado en los nucleótidos de las posiciones -320, -321, -322 o -323, ya que también están constituidos por guanina (Fig. 5.6). Esta región del inicio de transcripción no se correspondía con ninguno de los putativos inicios de promotores  $\sigma^{70}$  hallados mediante el análisis *in silico*, los cuales estaban situados a menor distancia, como mucho a 240 pb, del inicio de traducción del gen.



**Figura 5.6.** Amplificación del extremo 5' del ADNc del gen *wzz* de *A. hydrophila* AH-3 mediante 5'RACE. **A/** Esquema del procedimiento de 5'RACE en el que se indican los cebadores empleados y los productos obtenidos. **B/** Amplición obtenido mediante la PCR anidada con los cebadores AUAP y A3-ROLF. Carriles: **1,** ADN molde de la PCR primaria; **2,** control negativo de la PCR; **3,** marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder). **C/** Localización en la secuencia complementaria a la obtenida con el cebador A3-ROLF del inicio de transcripción (GGGGT) del gen *wzz*, marcado en negrita. Entre corchetes se indica el final del cebador AUAP; en negrita y subrayado, el putativo RBS; y en negrita y con una flecha, el inicio de traducción del gen *wzz*.

### 5.2.6.3 Análisis de la expresión génica mediante la construcción de fusiones transcripcionales promotor-*lacZ*

#### 5.2.6.3.1 Obtención de fusiones transcripcionales promotor *wzz*<sub>AH-3</sub>-*lacZ* y promotor *wzz*<sub>PPD134/91</sub>-*lacZ*

Para analizar la regulación de la secuencia promotora predicha por 5'RACE del gen *wzz* de *A. hydrophila* AH-3 (ver apartado 5.2.6.2) y compararla con la de la región promotora del mismo gen de *A. hydrophila* PPD134/91, cuyo análisis *in silico* mostraba tres putativos inicios de transcripción de promotores  $\sigma^{70}$  a una distancia de como mucho 160 pb del inicio de traducción del gen, se construyeron fusiones transcripcionales de ambos promotores con el gen indicador *lacZ*.

La construcción de la fusión promotor *wzz*<sub>AH-3</sub>-*lacZ* se obtuvo mediante la amplificación, a partir de ADN cromosómico de la cepa AH-3, de un fragmento de 220 pb,

localizado 262 pb a 5' del codón de inicio de traducción del gen *wzz*, que contenía el promotor predicho por 5'RACE. Para la construcción de la fusión promotor *WZZ*<sub>PPD134/91</sub>-*lacZ*, se amplificó un fragmento de 175 pb a partir de ADN cromosómico de la cepa PPD134/91, localizado 19 pb a 5' del inicio de traducción de su *wzz*, de manera que contenía la región intergénica entre los genes *rmlD* y *wzz*. Los cebadores utilizados se indican en los apartados 3.4.8 y 3.4.9 de Material y Métodos, respectivamente.

Los promotores amplificados se digirieron con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, incluidas en los cebadores utilizados, y se ligaron al vector pRS550 digerido con las mismas enzimas, asegurando así su correcta orientación para llevar a cabo el control del gen *lacZ* del vector, y las construcciones obtenidas, pRS-PWZZA y pRS-PWZZP, respectivamente, se clonaron en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  (ver Material y Métodos, 3.8.14.1).

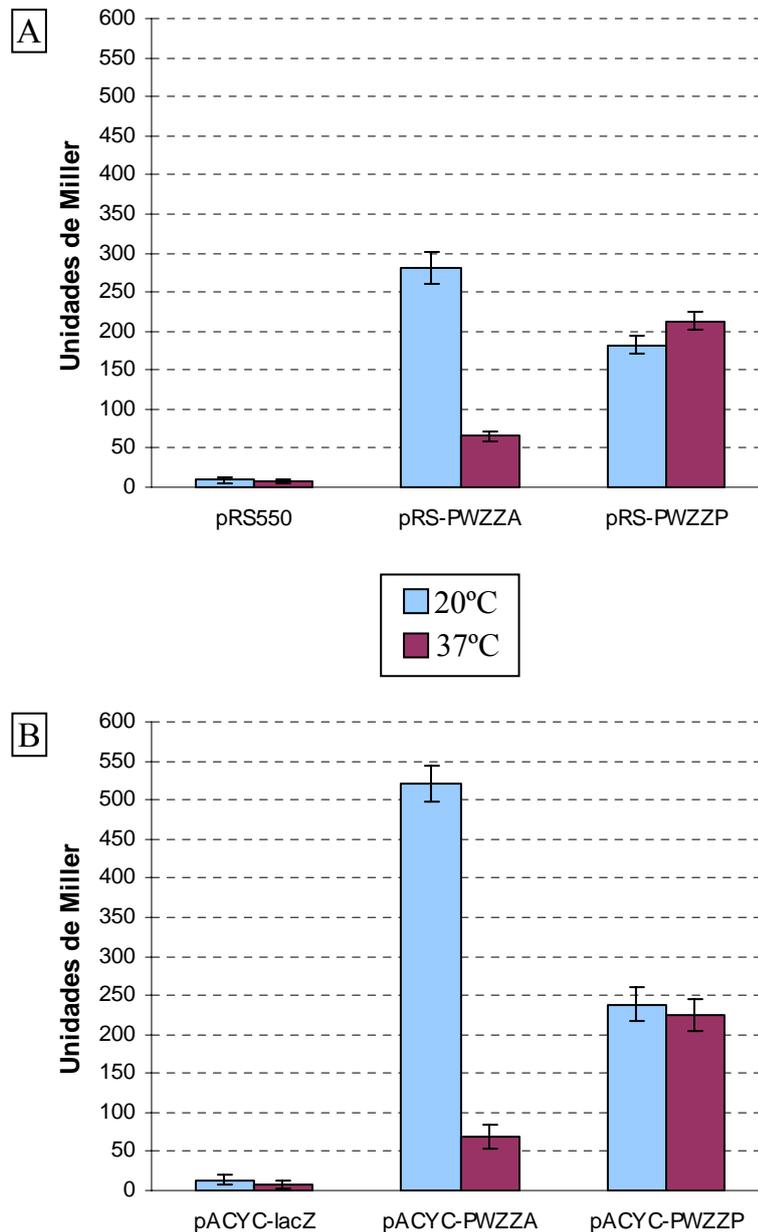
Por otro lado, las fusiones promotor-*lacZ* y el gen *lacZ* del pRS550 también se clonaron en el vector pACYC184 mediante digestión con *Stu*I y ligación de las bandas generadas de unas 6,3 Kb y 6,1 Kb, respectivamente, al vector digerido con *Hind*III y *Sal*I, tratado con el fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa y desfosforilado. Estas nuevas construcciones, pACYC-PWZZA, pACYC-PWZZP y pACYC-*lacZ*, fueron transferidas desde la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , a la que habían sido transformadas, a la cepa de *A. hydrophila* AH-405 mediante conjugación triparental (ver Material y Métodos, 3.8.14.1).

### **5.2.6.3.2 Ensayo de la actividad $\beta$ -galactosidasa**

El ensayo de la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, a 20°C y a 37°C, de las fusiones transcripcionales con el promotor del gen *wzz* de las cepas AH-3 y PPD134/91 de *A. hydrophila* permitió correlacionar la actividad de dicha enzima con el nivel de expresión de ambos genes (ver Material y Métodos, 3.8.14.2). Todas las muestras se analizaron por triplicado en tres experimentos independientes.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa a 20°C y a 37°C de la fusión transcripcional de la construcción pRS-PWZZA, que contiene el promotor del gen *wzz* de la cepa AH-3 predicho por 5'RACE, y de la fusión transcripcional de la construcción pRS-PWZZP, que contiene la región intergénica entre los genes *rmlD* y *wzz* de la cepa PPD134/91, fue analizada y comparada con la de la cepa DH5 $\alpha$  que contenía el vector pRS550 sin inserto. La actividad  $\beta$ -galactosidasa de la construcción pRS-PWZZA fue unas cuatro veces

superior a 20°C que a 37°C, en cambio, en el caso de pRS-PWZZP, la actividad  $\beta$ -galactosidasa observada fue similar a ambas temperaturas. La expresión basal en *E. coli* DH5 $\alpha$  con el vector pRS550 presentaba valores no significativos y similares a ambas temperaturas (Fig. 5.7).



**Figura 5.7.** A/ Actividad  $\beta$ -galactosidasa, a 20°C y a 37°C, de *E. coli* DH5 $\alpha$  con pRS-PWZZA (fusión transcripcional promotor  $wzz_{AH-3}$ -lacZ) y pRS-PWZZP (fusión transcripcional promotor  $wzz_{PPD134/91}$ -lacZ). Como control, se midió la actividad de *E. coli* DH5 $\alpha$  con pRS550. B/ Actividad  $\beta$ -galactosidasa, a 20°C y a 37°C, de *A. hydrophila* AH-405 con pACYC-PWZZA (fusión transcripcional promotor  $wzz_{AH-3}$ -lacZ) y pACYC-PWZZP (fusión transcripcional promotor  $wzz_{PPD134/91}$ -lacZ). Como control, se midió la actividad de la cepa AH-405 con pACYC-lacZ. Los datos son la media  $\pm$  desviación estándar de las muestras analizadas por triplicado en tres experimentos independientes. pRS-PWZZA y pACYC-PWZZA presentan diferencias significativas entre 20°C y 37°C (T-Student de una cola,  $P < 0,01$ ).

Además, también se analizó la actividad  $\beta$ -galactosidasa a 20°C y a 37°C de las fusiones transcripcionales de las construcciones pACYC-PWZZA y pACYC-PWZZP en *A. hydrophila* AH-405 y se comparó con las de la construcción pACYC-lacZ en esta misma cepa. La construcción pACYC-PWZZA mostraba una actividad 6-7 veces superior a 20°C que a 37°C, mientras que la construcción pACYC-PWZZP mostraba valores similares de actividad  $\beta$ -galactosidasa a ambas temperaturas. Por otro lado, en la cepa de *A. hydrophila* AH-405 con el vector pACYC-lacZ, no se observaron valores significativos de actividad  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 5.7).

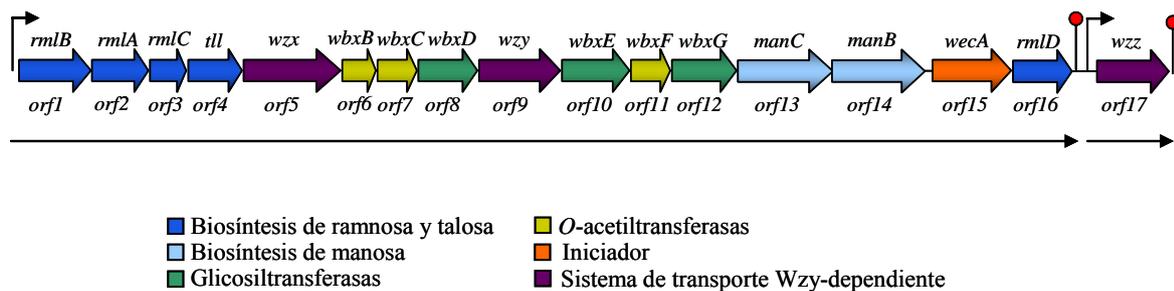
Estos resultados confirmaban la presencia de una secuencia de ADN a 5' de la región del gen *wzz* de *A. hydrophila* AH-3 que es capaz de funcionar como un promotor regulado por temperatura.

### 5.3 Discusión

La agrupación génica *wb* para la biosíntesis del antígeno O:34 de *A. hydrophila* AH-3 presenta un porcentaje de G+C del 44,3%, inferior al 57-63% esperado para las especies del género *Aeromonas*. Sin embargo, éste suele ser un hecho característico de este tipo de agrupaciones, de manera que algunas presentan un contenido de G+C, al menos, un 10% inferior al promedio del genoma de la especie correspondiente (Shepherd *et al.*, 2000).

La agrupación *wb*<sub>O:34</sub> presenta, además, una secuencia JUMPStart conservada con el elemento *ops* a unas 120 pb del inicio de traducción de la ORF1, a 3' del putativo promotor. La mayoría de las agrupaciones *wb* suelen estar precedidas por esta secuencia, reconocida por el antiterminador RfaH, el cual aumenta la procesividad del complejo de elongación de la transcripción al unirse a la ARN polimerasa, reduciendo las pausas y la posible terminación dentro de los operones largos y permitiendo la transcripción de los genes más distales (Bailey *et al.*, 1997; Artsimovitch y Landick, 2002).

Las proteínas codificadas por los 17 genes de la agrupación (Fig 5.8) concuerdan con la estructura química descrita del antígeno O:34 (Knirel *et al.*, 2002). La agrupación contiene, por lo tanto, los genes implicados en la biosíntesis de los monosacáridos activados GDP-manosa y dTDP-6-desoxi-L-talosa, correspondientes a las ORF13-14 y ORF1-4, respectivamente; y los genes que codifican sus putativas glicosiltransferasas: *wbxE* (ORF10), y *wbxD* (ORF8) y *wbxG* (ORF12), respectivamente.



**Figura 5.8.** Esquema de la agrupación génica  $wb_{O:34}$  de *A. hydrophila* AH-3. El posible promotor detectado delante del gen *rmlB* y el promotor del gen *wzz* se muestran con flechas finas y los posibles terminadores Rho-independientes, mediante círculos. Las flechas finas largas horizontales indican las dos unidades de transcripción.

El gen *rmlD* (ORF16) es necesario para la biosíntesis de dTDP-L-ramnosa, pero no de dTDP-6-desoxi-L-talosa. Sin embargo, la ramnosa no está presente en el antígeno O:34, por lo que este gen podría no ser necesario para la formación del antígeno O. Por otro lado, la biosíntesis de dTDP-L-ramnosa se caracteriza por la presencia de cuatro genes, *rmlA* a *rmlD*, normalmente adyacentes y en el extremo 5', pero en el caso de la agrupación  $wb_{O:34}$ , el gen *rmlD* parece haber sido reemplazado por el gen *tll*, implicado en la biosíntesis de dTDP-6-desoxi-L-talosa (Nakano *et al.*, 2000), y desplazado al extremo 3' de la agrupación, a unas 12,4 Kb. El orden presente en estos cuatro primeros genes, *rmlBAC* y *tll*, ha sido también descrito en la agrupación génica *wb* de *E. coli* O66 (Cheng *et al.*, 2007). Los genes implicados en la biosíntesis de azúcares activados suelen constituir módulos de genes separados, y, al igual que los genes para la biosíntesis de dTDP-6-desoxi-L-talosa, los genes *manC* (ORF13) y *manB* (ORF14) para la formación de GDP-manosa también se hallan juntos en la agrupación  $wb_{O:34}$ .

Los genes responsables de las modificaciones del antígeno O suelen localizarse fuera de la agrupación *wb* (Samuel y Reeves, 2003), sin embargo, la agrupación  $wb_{O:34}$  incluye, también, tres genes que codifican putativas *O*-acetiltransferasas: *wxB* (ORF6), *wxC* (ORF7) y *wxF* (ORF11), de acuerdo con los tres diferentes residuos acetilo que forman parte de la estructura química de la subunidad repetitiva del antígeno O:34.

Las dos vías conocidas más importantes establecidas para la polimerización y el transporte del antígeno O son la vía Wzy-dependiente, para heteropolisacáridos, y la vía transportador ABC-dependiente, para homopolisacáridos, principalmente (Raetz y Whitfield, 2002). La presencia de los genes *wzx* (ORF5) y *wzy* (ORF9), que codifican las proteínas responsables del transporte de las subunidades del antígeno O a través de la membrana interna y de su polimerización en la cara periplasmática, respectivamente,

indica que la biosíntesis del antígeno O:34 se realiza mediante la primera vía. Tanto el transportador Wzx, como la polimerasa Wzy, presentan putativos dominios transmembrana, 14 y 10, respectivamente, lo cual es una característica común de ambas proteínas. La utilización de esta vía concuerda, por otro lado, con el hecho de que el mutante en el gen de la polimerasa Wzy sólo muestre una repetición de la subunidad del antígeno O, dando lugar a un LPS del tipo SR (Fig. 5.3).

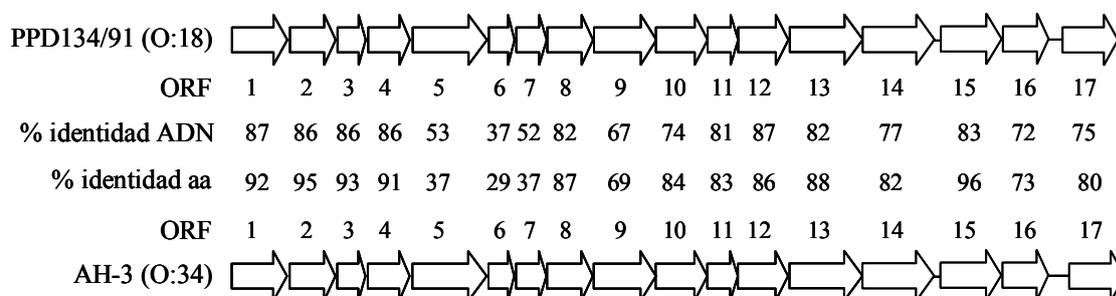
Para sintetizar las subunidades del antígeno O, los monómeros se ensamblan sobre un transportador lipídico, el undecaprenil-fosfato, mediante enzimas codificadas en la agrupación *wb*, y posteriormente, tiene lugar la polimerización de las mismas. El gen *wecA* (ORF15) codifica una undecaprenil-azúcar-P transferasa que presenta 4 putativos dominios transmembrana. La proteína WecA sería capaz de iniciar el ensamblaje de las subunidades del antígeno O:34 mediante la transferencia al transportador lipídico, en principio, de GalNAc-P, en base a la estructura química. El mutante en el gen *wecA* es, por lo tanto, incapaz de producir antígeno O (Fig. 5.3).

El gen *wzz* (ORF17) codifica una proteína capaz de regular la longitud de las cadenas del antígeno O:34, tal y como se ha descrito en otras bacterias (Murray *et al.*, 2006). Presenta dos putativos dominios transmembrana y un gran dominio central periplasmático que, según se ha descrito, es esencial para su función, mediante la interacción, al menos, con Wzy y el antígeno O, lo que le produce un cambio en su conformación (Guo *et al.*, 2006). Wzz resulta ser, además, la proteína implicada en la formación del antígeno O:34 que presenta una regulación por temperatura.

Los genes de la agrupación *wb*<sub>O:34</sub> están distribuidos en dos transcritos independientes: ORF1-ORF16 y ORF17. Ensayos de RT-PCR semicuantitativa y de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional del promotor *wzz*<sub>AH-3</sub> (de la ORF17) con el gen *lacZ* demostraron que los niveles de transcripción de la región ORF1-ORF16 eran similares tanto a 20°C como a 37°C, mientras que la ORF17 mostraba una transcripción/expresión diferencial, mayor a 20°C que a 37°C (Fig. 5.5 y 5.7).

La secuencia de ADN completa de la agrupación *wb* de la cepa de *A. hydrophila* PPD134/91 (serotipo O:18), que había sido descrita anteriormente (Zhang *et al.*, 2002), resulta ser muy similar a la de la agrupación *wb*<sub>O:34</sub> de *A. hydrophila* AH-3. La comparación entre ambas indica que la mayoría de las ORF presentan una identidad aminoacídica y nucleotídica mayor del 80% y del 74%, respectivamente. Aunque la ORF9

y la ORF16 muestran una ligera reducción en los niveles de identidad. La ORF5, la ORF6 y la ORF7, que codifican la flipasa del antígeno O y dos *O*-acetiltransferasas, respectivamente, son las que presentan los niveles de identidad de aminoácidos y de nucleótidos más bajos (Fig. 5.9).



**Figura 5.9.** Comparación entre la agrupación  $wb_{O:18}$  de *A. hydrophila* PPD134/91 y la agrupación  $wb_{O:34}$  de *A. hydrophila* AH-3.

La estructura química del antígeno O de la cepa PPD134/91 no ha sido caracterizada, no obstante, debe de ser similar a la del antígeno O:34 de la cepa AH-3, debido a la elevada similitud entre las proteínas codificadas por la mayoría de los genes de las agrupaciones  $wb$  de ambas. Además, también ha sido descrita la reactividad cruzada que muestran anticuerpos contra los serotipos O:18 y O:34 de distintas cepas de *Aeromonas* (Zhang *et al.*, 2002).

La cepa PPD134/91 presenta un perfil electroforético del LPS idéntico tanto si el crecimiento se realiza a 20°C como a 37°C, con claras bandas de las subunidades repetitivas del antígeno O (Fig. 5.2). Al analizar la secuencia de esta cepa, la distancia entre el gen *rmlD* (ORF16) y el gen *wzz* (ORF17) resulta ser más pequeña que la de la misma región de la cepa AH-3. Por otro lado, la fusión transcripcional de la región intergénica entre ambos genes de la cepa PPD134/91 (promotor  $wzz_{PPD134/91}$ ) con el gen *lacZ* mostró una actividad  $\beta$ -galactosidasa similar, tanto a partir del crecimiento a 20°C como a 37°C (Fig. 5.7). Además, el inicio de transcripción del gen *wzz* de la cepa AH-3, localizado mediante 5'RACE en la posición -319 de su inicio de traducción, se halla en una zona que no está presente en la cepa PPD134/91, debido al pequeño tamaño de esta región. Este hecho explica la diferente producción de ambos antígenos O a diferentes temperaturas de crecimiento en estas cepas.

Existen diferencias en la subpoblación de moléculas del LPS de la cepa AH-3 crecida a 20°C (de 1 hasta más de 40 repeticiones de las subunidades del antígeno O:34) y a 37°C

(principalmente, R-LPS y algunas moléculas de S-LPS con un número muy elevado de repeticiones), tal y como se aprecia en su perfil electroforético (Fig. 5.2). Estas diferencias podrían estar correlacionadas con la posible regulación negativa de la transcripción del gen *wzz* observada a 37°C (Fig. 5.5) y el papel que presenta la proteína Wzz de *A. hydrophila* AH-3 en la distribución de las subunidades repetitivas de la cadena del antígeno O, ya que un mutante en este gen pierde la distribución típica y presenta una subpoblación de moléculas que contienen desde 1 hasta 10 subunidades del antígeno O:34 (Fig. 5.3).

La diferente cantidad y distribución de las subunidades del antígeno O:34, en función del crecimiento de la cepa AH-3 a 20°C o a 37°C, explicaría la sensibilidad a la actividad bactericida del suero no inmune o la falta de infectividad que esta cepa presenta a 37°C, según se ha descrito anteriormente (Merino *et al.*, 1992c).

Se ha comprobado que la biosíntesis del antígeno O:34 está regulada, también, por la osmolaridad, de manera que la cepa AH-3 presenta R-LPS a 37°C y baja osmolaridad y, en cambio, a 37°C y elevada osmolaridad, las moléculas son de tipo S-LPS. La virulencia de esta cepa cambia en función de estas condiciones ambientales y de la ausencia o presencia del antígeno O:34, siendo mayor en este último caso (Aguilar *et al.*, 1997).