



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

“Si tú tienes una manzana y yo tengo una manzana,
e intercambiamos manzanas, entonces tanto tú como
yo seguimos teniendo una manzana.
Pero si tú tienes una idea y yo tengo una idea,
e intercambiamos ideas, entonces ambos tenemos dos ideas”.

George Bernard Shaw (1856-1950).

| | |
|--|----|
| ABREVIACIONES | 1 |
| 1 INTRODUCCIÓN | 7 |
| 1.1 El género <i>Aeromonas</i> | 9 |
| 1.1.1 Taxonomía..... | 9 |
| 1.1.2 Hábitat | 11 |
| 1.1.3 Patogenia y epidemiología | 11 |
| 1.1.4 Factores de virulencia..... | 12 |
| 1.1.4.1 El lipopolisacárido (LPS) | 13 |
| 1.1.4.2 Cápsula | 13 |
| 1.1.4.3 Lámina S..... | 15 |
| 1.1.4.4 Adhesinas | 16 |
| 1.1.4.4.1 Fimbrias o <i>pili</i> (adhesinas filamentosas) | 17 |
| 1.1.4.4.2 Adhesinas no filamentosas..... | 18 |
| 1.1.4.5 Flagelo | 18 |
| 1.1.4.6 Sistemas de captación de hierro..... | 20 |
| 1.1.4.7 Secreción de exotoxinas y otras enzimas extracelulares | 21 |
| 1.1.4.7.1 Exotoxinas | 21 |
| 1.1.4.7.1.1 Enterotoxinas..... | 21 |
| 1.1.4.7.1.1.1 Enterotoxinas citotóxicas..... | 22 |
| 1.1.4.7.1.1.2 Enterotoxinas citotónicas..... | 22 |
| 1.1.4.7.1.2 Hemolisinas..... | 23 |
| 1.1.4.7.2 Otras enzimas extracelulares | 24 |
| 1.1.4.7.2.1 Proteasas..... | 24 |
| 1.1.4.7.2.2 Lipasas/Fosfolipasas | 25 |
| 1.1.4.7.3 Toxinas asociadas al sistema de secreción de tipo III..... | 25 |
| 1.1.4.8 Sistema de secreción de tipo III (T3SS)..... | 26 |
| 1.2 El lipopolisacárido (LPS) | 27 |
| 1.2.1 Importancia biológica..... | 28 |
| 1.2.1.1 Receptores humorales y celulares del LPS..... | 29 |
| 1.2.2 El lípido A | 31 |
| 1.2.2.1 Características principales del lípido A..... | 31 |
| 1.2.2.2 Estructura química del lípido A..... | 32 |
| 1.2.2.3 Biosíntesis del lípido A | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 1.2.2.4 Organización genética del lípido A | 36 |
| 1.2.2.5 Lípido A y viabilidad celular | 38 |
| 1.2.3 El núcleo del LPS | 40 |
| 1.2.3.1 Características principales del núcleo del LPS | 40 |
| 1.2.3.2 Estructura química del núcleo del LPS | 41 |
| 1.2.3.3 Biosíntesis del núcleo del LPS | 44 |
| 1.2.3.4 Organización genética del núcleo del LPS..... | 50 |
| 1.2.4 El antígeno O..... | 52 |
| 1.2.4.1 Características principales del antígeno O | 52 |
| 1.2.4.2 Estructura química del antígeno O | 53 |
| 1.2.4.3 Biosíntesis del antígeno O..... | 55 |
| 1.2.4.3.1 Biosíntesis de los precursores azúcar nucleótido | 56 |
| 1.2.4.3.2 Biosíntesis de la unidad O | 57 |
| 1.2.4.3.3 Translocación y polimerización..... | 58 |
| 1.2.4.3.3.1 Sistema Wzy-dependiente..... | 58 |
| 1.2.4.3.3.2 Sistema transportador ABC-dependiente..... | 60 |
| 1.2.4.3.3.3 Sistema sintasa-dependiente | 61 |
| 1.2.4.4 Organización genética del antígeno O | 62 |
| 1.2.5 Ligación del antígeno O al núcleo del LPS..... | 64 |
| 1.2.6 Transporte del LPS a la membrana externa | 65 |
| 2 OBJETIVOS | 67 |
| 3 MATERIAL Y MÉTODOS | 71 |
| 3.1 Cepas bacterianas | 73 |
| 3.2 Bacteriófagos | 74 |
| 3.3 Vectores | 74 |
| 3.4 Cebadores | 75 |
| 3.4.1 Cebadores de los vectores | 75 |
| 3.4.2 Cebadores del transposón mini-Tn5::Km1 | 76 |
| 3.4.3 Cebadores provistos en el <i>kit 5' RACE System</i> | 76 |
| 3.4.4 Cebadores del gen <i>rrsA</i> del ARNr 16S de <i>Aeromonas hydrophila</i> | 76 |
| 3.4.5 Cebadores de la región 1 <i>wa</i> del núcleo del lipopolisacárido de <i>Aeromonas hydrophila</i> AH-3 | 76 |
| 3.4.6 Cebadores de la región 2 <i>wa</i> del núcleo del lipopolisacárido de <i>Aeromonas hydrophila</i> AH-3 | 78 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.7 Cebadores de la región 3 <i>wa</i> del núcleo del lipopolisacárido de <i>Aeromonas hydrophila</i> AH-3 | 79 |
| 3.4.8 Cebadores de la agrupación génica <i>wb</i> del antígeno O:34 del lipopolisacárido de <i>Aeromonas hydrophila</i> AH-3 | 80 |
| 3.4.9 Cebadores de la agrupación génica <i>wb</i> del antígeno O:18 del lipopolisacárido de <i>Aeromonas hydrophila</i> PPD134/91 | 81 |
| 3.5 Medios de cultivo y suplementos | 81 |
| 3.6 Estudios con bacteriófagos | 82 |
| 3.7 Estudios de la superficie celular | 82 |
| 3.7.1 Obtención del lipopolisacárido (LPS) | 82 |
| 3.7.1.1 Aislamiento a gran escala del LPS | 82 |
| 3.7.1.1.1 Deshidratación de las células | 82 |
| 3.7.1.1.2 Extracción del LPS por el método fenol-agua | 83 |
| 3.7.1.1.3 Extracción del LPS por el método PCP | 84 |
| 3.7.1.2 Aislamiento a pequeña escala del LPS | 84 |
| 3.7.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción del LPS | 85 |
| 3.7.2.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) en tampón Tris-Glicina-SDS | 85 |
| 3.7.2.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS en tampón Tris-Tricina-SDS (SDS-Tricine-PAGE) | 86 |
| 3.7.2.3 Tinción del LPS con nitrato de plata | 86 |
| 3.7.3 Análisis químico del LPS | 87 |
| 3.7.3.1 Hidrólisis ácida del LPS | 87 |
| 3.7.3.2 Cromatografía de filtración en gel (GPC) | 88 |
| 3.7.3.3 Hidrólisis básica del LPS | 88 |
| 3.7.3.3.1 <i>O</i> -desacilación del LPS: hidrazinolisis | 88 |
| 3.7.3.3.2 <i>N</i> -desacilación del LPS: tratamiento alcalino fuerte | 89 |
| 3.7.3.4 Análisis de metilación de monosacáridos | 89 |
| 3.7.3.4.1 Obtención de metilglicósidos acetilados | 89 |
| 3.7.3.4.2 Obtención de acetatos de alditol parcialmente metilados | 90 |
| 3.7.3.4.3 Cromatografía de gas-líquido (GLC) | 91 |
| 3.7.3.4.4 Cromatografía de gas-líquido acoplada a espectrometría de masas (GLC-MS) | 91 |
| 3.7.3.5 Espectrometría de masas con ionización por <i>electrospray</i> (ESI-MS) | 91 |
| 3.7.4 Métodos inmunológicos | 92 |
| 3.7.4.1 Transferencia a nivel colonial e inmunodetección del LPS | 92 |

| | |
|---|-----|
| 3.8 Técnicas de genética molecular | 94 |
| 3.8.1 Aislamiento de ácidos nucleicos | 94 |
| 3.8.1.1 Aislamiento del ADN genómico | 94 |
| 3.8.1.2 Aislamiento del ADN plasmídico | 94 |
| 3.8.1.3 Aislamiento del ARN | 94 |
| 3.8.2 Purificación del ADN mediante extracción fenólica..... | 95 |
| 3.8.3 Precipitación del ADN | 95 |
| 3.8.4 Electroforesis del ADN en geles de agarosa | 96 |
| 3.8.5 Cuantificación de ácidos nucleicos | 96 |
| 3.8.5.1 Cuantificación en geles de agarosa | 96 |
| 3.8.5.2 Cuantificación espectrofotométrica..... | 97 |
| 3.8.6 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa..... | 97 |
| 3.8.7 Procesamiento enzimático del ADN | 97 |
| 3.8.7.1 Restricciones | 97 |
| 3.8.7.2 Desfosforilación de vectores | 98 |
| 3.8.7.3 Ligación..... | 98 |
| 3.8.7.4 Obtención de extremos romos | 98 |
| 3.8.8 Métodos de transferencia del ADN plasmídico | 98 |
| 3.8.8.1 Conjugación en medio sólido..... | 98 |
| 3.8.8.2 Transformación por electroporación | 99 |
| 3.8.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 99 |
| 3.8.9.1 Amplificación de fragmentos de ADN..... | 99 |
| 3.8.9.1.1 Amplificación de fragmentos de ADN por PCR directa | 100 |
| 3.8.9.1.2 Amplificación de fragmentos de ADN por PCR inversa | 101 |
| 3.8.9.2 Secuenciación de fragmentos de ADN..... | 102 |
| 3.8.9.3 Transcripción reversa y PCR (RT-PCR)..... | 103 |
| 3.8.9.3.1 RT-PCR semicuantitativa | 103 |
| 3.8.9.4 Amplificación rápida de extremos 5' del ADNc (5' RACE) | 104 |
| 3.8.10 Programas informáticos utilizados para el análisis de secuencias | 106 |
| 3.8.11 Construcción de una librería genómica | 107 |
| 3.8.12 Inmunodetección de fragmentos de ADN | 108 |
| 3.8.12.1 Preparación de sondas | 108 |
| 3.8.12.2 <i>Colony blot</i> | 108 |
| 3.8.12.3 <i>Dot blot</i> | 109 |
| 3.8.12.4 <i>Southern blot</i> | 109 |

| | |
|--|-----|
| 3.8.13 Técnicas de mutagénesis | 110 |
| 3.8.13.1 Mutagénesis por inserción del transposón mini-Tn5::Km1 | 110 |
| 3.8.13.2 Mutagénesis dirigida por recombinación en un punto..... | 110 |
| 3.8.13.3 Mutagénesis dirigida por doble recombinación..... | 111 |
| 3.8.14 Estudio de la expresión génica mediante el gen indicador <i>lacZ</i> | 113 |
| 3.8.14.1 Construcción de fusiones transcripcionales promotor- <i>lacZ</i> | 113 |
| 3.8.14.2 Ensayo de la actividad β -galactosidasa | 114 |
| 3.8.15 Ensayos de complementación..... | 115 |
| 3.8.15.1 Análisis de complementación de mutantes..... | 115 |
| 3.8.15.2 Análisis de complementación de la cepa de <i>E. coli</i> CJB26..... | 116 |
| 4 Análisis molecular de las tres agrupaciones génicas del núcleo del LPS de <i>A. hydrophila</i> AH-3 (serotipo O:34) | 119 |
| 4.1 Resultados | 121 |
| 4.1.1 Obtención y caracterización de mutantes de <i>A. hydrophila</i> AH-3 por inserción del transposón mini-Tn5::Km1 | 121 |
| 4.1.1.1 Análisis fenotípico del LPS por SDS-PAGE y SDS-Tricine-PAGE..... | 121 |
| 4.1.1.2 Caracterización genética de los mutantes AH-3005, AH-3006 y AH-3007 | 122 |
| 4.1.1.2.1 Clonaje del transposón mini-Tn5::Km1 | 122 |
| 4.1.1.2.2 Secuenciación de las zonas adyacentes al transposón | 123 |
| 4.1.2 Clonaje de las agrupaciones génicas del núcleo del LPS de <i>A. hydrophila</i> AH-3 | 124 |
| 4.1.2.1 Obtención de una sonda específica..... | 124 |
| 4.1.2.2 Hibridación de la librería genómica | 125 |
| 4.1.3 Secuenciación de las tres agrupaciones génicas del núcleo del LPS de <i>A. hydrophila</i> AH-3 | 125 |
| 4.1.3.1 Secuenciación de los genes no clonados a partir de PCR inversa | 125 |
| 4.1.3.2 Secuenciación de los clones COS-CORE2 y COS-CORE3..... | 126 |
| 4.1.4 Análisis de las secuencias nucleotídicas de las tres regiones <i>wa</i> del núcleo del LPS de <i>A. hydrophila</i> AH-3..... | 127 |
| 4.1.4.1 Región 1 <i>wa</i> del núcleo del LPS de <i>A. hydrophila</i> AH-3..... | 127 |
| 4.1.4.1.1 ORF1: <i>hldD</i> | 128 |
| 4.1.4.1.2 ORF2: <i>wahA</i> | 128 |
| 4.1.4.1.3 ORF3: <i>waaL</i> | 129 |
| 4.1.4.1.4 ORF4: <i>wahB</i> | 129 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.4.1.5 ORF5: <i>wahC</i> | 130 |
| 4.1.4.1.6 ORF6: <i>wahD</i> | 130 |
| 4.1.4.1.7 ORF7: <i>wahE</i> | 131 |
| 4.1.4.2 Región 2 <i>wa</i> del núcleo del LPS de <i>A. hydrophila</i> AH-3 | 131 |
| 4.1.4.2.1 ORF1: <i>waaA</i> | 132 |
| 4.1.4.2.2 ORF2: <i>wahF</i> | 132 |
| 4.1.4.2.3 ORF3: <i>waaE</i> | 133 |
| 4.1.4.2.4 ORF4: <i>waaF</i> | 133 |
| 4.1.4.3 Región 3 <i>wa</i> del núcleo del LPS de <i>A. hydrophila</i> AH-3 | 134 |
| 4.1.4.3.1 ORF1: <i>waaC</i> | 134 |
| 4.1.4.3.2 ORF2: <i>kdkA</i> | 135 |
| 4.1.5 Construcción de mutantes en diversos genes de las tres regiones <i>wa</i> del núcleo del LPS de <i>A. hydrophila</i> AH-3 | 135 |
| 4.1.5.1 Construcción de mutantes mediante recombinación en un punto en los genes <i>wahE</i> y <i>waaF</i> | 136 |
| 4.1.5.2 Intento de construcción de mutantes mediante recombinación en un punto en los genes <i>waaA</i> y <i>kdkA</i> | 137 |
| 4.1.5.3 Construcción de mutantes mediante doble recombinación en los genes <i>wahA</i> , <i>waaL</i> , <i>wahB</i> , <i>wahC</i> y <i>wahF</i> | 138 |
| 4.1.6 Caracterización fenotípica del LPS por SDS-PAGE o SDS-Tricine-PAGE de mutantes en diversos genes de las tres regiones <i>wa</i> del núcleo del LPS de <i>A. hydrophila</i> AH-3 | 139 |
| 4.1.6.1 Mutantes que carecen de antígeno O | 140 |
| 4.1.6.1 Mutantes que presentan antígeno O | 141 |
| 4.1.7 Análisis de complementación de mutantes en el núcleo del LPS | 142 |
| 4.1.7.1 Complementación de los mutantes en el núcleo del LPS de <i>A. hydrophila</i> AH-3 | 142 |
| 4.1.7.2 Complementación de mutantes en el núcleo del LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i> 52145 | 143 |
| 4.1.7.3 Complementación de la cepa de <i>E. coli</i> CJB26 | 144 |
| 4.1.8 Elucidación de la estructura química del LPS de los mutantes en diversos genes de las tres regiones <i>wa</i> del núcleo de <i>A. hydrophila</i> AH-3 | 145 |
| 4.1.8.1 Estructura química de los mutantes AH-3 Δ 3.1 y AH-3 Δ 4.1 | 146 |
| 4.1.8.2 Estructura química de los mutantes AH-3 Δ 7.1 y AH-3 Δ 5.1 | 147 |
| 4.1.8.3 Estructura química del mutante AH-3 Δ 2.1 | 148 |
| 4.1.8.4 Estructura química del mutante AH-3005 | 149 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.8.5 Estructura química de los mutantes AH-3Δ2.2 y AH-3006 | 150 |
| 4.1.8.6 Estructura química del mutante AH-3Δ4.2 | 152 |
| 4.1.8.7 Estructura química del mutante AH-3007 | 152 |
| 4.1.9 Estudio de la distribución de los genes <i>wahB</i> , <i>wahC</i> , <i>wahD</i> y <i>wahE</i> en <i>Aeromonas</i> mesófilas | 153 |
| 4.2 Discusión | 154 |
| 5 Análisis genético de la agrupación <i>wb</i>_{O:34} de <i>A. hydrophila</i> AH-3 y su regulación por temperatura | 161 |
| 5.1 Precedentes | 163 |
| 5.2 Resultados | 163 |
| 5.2.1 Análisis de la secuencia nucleotídica de la agrupación <i>wb</i> _{O:34} de <i>A. hydrophila</i> AH-3 | 163 |
| 5.2.1.1 Biosíntesis de precursores azúcar nucleótido | 166 |
| 5.2.1.1.1 Biosíntesis de dTDP-L-ramnosa y dTDP-6-desoxi-L-talosa | 166 |
| 5.2.1.1.1.1 ORF1: <i>rmlB</i> | 166 |
| 5.2.1.1.1.2 ORF2: <i>rmlA</i> | 166 |
| 5.2.1.1.1.3 ORF3: <i>rmlC</i> | 166 |
| 5.2.1.1.1.4 ORF4: <i>tll</i> | 167 |
| 5.2.1.1.1.5 ORF16: <i>rmlD</i> | 167 |
| 5.2.1.1.2 Biosíntesis de GDP-manosa | 168 |
| 5.2.1.1.2.1 ORF13: <i>manC</i> | 168 |
| 5.2.1.1.2.2 ORF14: <i>manB</i> | 168 |
| 5.2.1.2 Transferasas de azúcares | 169 |
| 5.2.1.2.1 ORF8: <i>wbxD</i> | 169 |
| 5.2.1.2.2 ORF10: <i>wbxE</i> | 169 |
| 5.2.1.2.3 ORF12: <i>wbxG</i> | 169 |
| 5.2.1.3 Transferasas de grupos acetilo | 170 |
| 5.2.1.3.1 ORF6: <i>wxB</i> | 170 |
| 5.2.1.3.2 ORF7: <i>wxC</i> | 170 |
| 5.2.1.3.3 ORF11: <i>wxF</i> | 171 |
| 5.2.1.4 Iniciación, translocación y polimerización de las subunidades | 171 |
| 5.2.1.4.1 ORF15: <i>wecA</i> | 171 |
| 5.2.1.4.2 ORF5: <i>wzx</i> | 171 |
| 5.2.1.4.3 ORF9: <i>wzy</i> | 172 |

| | |
|--|-----|
| 5.2.1.4.4 ORF17: <i>wzz</i> | 172 |
| 5.2.2 Unidades transcripcionales de la agrupación <i>wb</i> _{O:34} de <i>A. hydrophila</i> AH-3..... | 173 |
| 5.2.3 Construcción de mutantes en los genes <i>wecA</i> , <i>wzy</i> y <i>wzz</i> de la agrupación <i>wb</i> _{O:34} de <i>A. hydrophila</i> AH-3..... | 174 |
| 5.2.4 Caracterización del LPS de <i>A. hydrophila</i> AH-3 y PPD134/91 y de los mutantes AH-405Δ <i>wecA</i> , AH-405Δ <i>wzy</i> y AH-405Δ <i>wzz</i> | 175 |
| 5.2.4.1 Caracterización del LPS de <i>A. hydrophila</i> AH-3 y <i>A. hydrophila</i> PPD134/91..... | 175 |
| 5.2.4.2 Caracterización del LPS de los mutantes AH-405Δ <i>wecA</i> , AH-405Δ <i>wzy</i> y AH-405Δ <i>wzz</i> | 176 |
| 5.2.5 Análisis de complementación de los mutantes AH-405Δ <i>wecA</i> , AH-405Δ <i>wzy</i> y AH-405Δ <i>wzz</i> | 178 |
| 5.2.6 Análisis de la regulación por temperatura de la agrupación <i>wb</i> _{O:34} de <i>A. hydrophila</i> AH-3..... | 180 |
| 5.2.6.1 Análisis transcripcional mediante RT-PCR semicuantitativa..... | 180 |
| 5.2.6.2 Localización del promotor del gen <i>wzz</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3..... | 181 |
| 5.2.6.3 Análisis de la expresión génica mediante la construcción de fusiones transcripcionales promotor- <i>lacZ</i> | 182 |
| 5.2.6.3.1 Obtención de fusiones transcripcionales promotor <i>wzz</i> _{AH-3} - <i>lacZ</i> y promotor <i>wzz</i> _{PPD134/91} - <i>lacZ</i> | 182 |
| 5.2.6.3.2 Ensayo de la actividad β-galactosidasa..... | 183 |
| 5.3 Discusión | 185 |
| 6 CONCLUSIONES | 191 |
| 7 BIBLIOGRAFÍA | 195 |
| 8 ANEXO | 227 |
| 8.1 Secuencia nucleotídica de la región 1 <i>wa</i> del núcleo del LPS de <i>Aeromonas hydrophila</i> AH-3 | 229 |
| 8.2 Secuencia nucleotídica de la región 2 <i>wa</i> del núcleo del LPS de <i>Aeromonas hydrophila</i> AH-3 | 244 |
| 8.3 Secuencia nucleotídica de la región 3 <i>wa</i> del núcleo del LPS de <i>Aeromonas hydrophila</i> AH-3 | 253 |