



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Farmàcia

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

**Estudi estructural i genètic del nucli del lipopolisacàrid de  
*Serratia marcescens* N28b**

Núria Coderch Marco  
2008

## **2. OBJECTIUS**



## 2. OBJECTIUS

### 2.1 ANTECEDENTS: BASES PER A L'ESTABLIMENT DELS OBJECTIUS

*Serratia marcescens* N28b O4 produeix la bacteriocina 28b que té capacitat bactericida enfront *E. coli* K12 (Viejo *et al.*, 1992), i que s'uneix tant al nucli del LPS com a les proteïnes de membrana externa OmpA i OmpF de les cèl·lules sensibles de *E. coli* (Enfedaque *et al.*, 1996). Aquest fet va fer pensar que l'expressió de gens externs en *E. coli* K12 que conduïssin a alteracions en les quantitats relatives o en la composició de les molècules de membrana externa implicades en la interacció amb la bacteriocina 28b podrien conferir un fenotip de resistència a la bacteriocina. Això va permetre usar la bacteriocina 28b com a eina per a seleccionar clons recombinants de *E. coli* K12 resistents a la bacteriocina que portaven gens que codificaven per enzims implicats en la biosíntesi de l'antigen O de *S. marcescens* (Rubirés *et al.*, 1997; Saigí *et al.*, 1999); o en la biosíntesi del nucli del LPS de *S. marcescens* (Guasch *et al.*, 1996) i *K. pneumoniae* (Regué *et al.*, 2001) o bé que portaven gens que codificaven per proteïnes de membrana externa (Guasch *et al.*, 1995).

En el marc del present treball, és important destacar que, mitjançant assajos de resistència a la bacteriocina, el nostre grup d'investigació va poder inicialment aïllar i caracteritzar el gen *waaA*, que codifica per la Kdo transferasa i el gen *waaE* de *S. marcescens* N28b a partir del clon recombinat CosFGR2 (Guasch *et al.*, 1996). A partir d'aquí, treballs successius de subclonatge i seqüenciació realitzats en el nostre grup d'investigació (Piqué, 2000; Abitiu, 2000) van permetre estendre i completar la seqüència de l'agrupació gènica *waa* de *S. marcescens* N28b, on es troben agrupats els gens implicats en la biosíntesi del nucli del seu LPS.

L'anàlisi de la seqüència de 20.693 pb corresponent a l'agrupació gènica *waa* de *S. marcescens* N28b va revelar la presència de 14 ORFs que s'organitzaven en tres operons; el primer amb 6 ORFs, el segon, incloïa els *orf 8, 9 i 10* i el tercer, contenia els *orf 12, 13 i 14*, mentre que els *orf 7 i 11* corresponien a gens monocistrònics que es transcrivien en direcció oposada (Abitiu, 2000) (veure Figura 2.1).

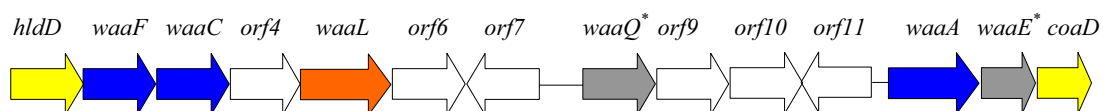
Com ja s'ha dit anteriorment a la secció 1.2.4.1.1 *El nucli intern*, la regió del nucli intern del LPS de la majoria d'enterobacteris estudiats fins el moment està constituïda per d'un a tres residus de Kdo i com a mínim per tres residus de L,D-heptosa, constituint l'estructura L- $\alpha$ -D-HepIII-(1 $\rightarrow$ 7)-L- $\alpha$ -D-HepII-(1 $\rightarrow$ 3)-L- $\alpha$ -D-HepI (1 $\rightarrow$ 5)-[ $\alpha$ -KdoII-(2 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -KdoI. Gràcies a l'elevat grau d'identitat i similitud aminoacídica amb les proteïnes implicades en la transferència d'aquests residus en la resta d'enterobacteris i als resultats satisfactoris de complementació gènica de mutants de gens implicats en la biosíntesi del nucli intern del LPS de *S. enterica* sv. Typhimurium i de *E. coli*, es van poder identificar els gens que codificaven pels enzims implicats en la biosíntesi del nucli intern del LPS de *S. marcescens* N28 (Abitiu, 2000), tal i com s'indica a la Taula 2.1. No obstant, cal remarcar que l'assignació del gen responsable de la transferència de l'HepIII (*waaQ*) era temptativa ja que no s'havia pogut comprovar per complementació gènica al no disposar de mutants d'aquest gen a *E. coli* i/o *Samonella* i per això, es va proposar corroborar en aquest treball (veure secció 4.2.2.1 *ORF8*). D'altra banda, el ORF final de l'agrupació *waa* de *S. marcescens* N28b es va nomenar com a gen *coaD* ja que la proteïna que codificava mostrava una similitud molt elevada amb aquest enzim a d'altres enterobacteris i a més ocupava la mateixa posició dins l'agrupació *waa*. Aquest enzim però no estava relacionat amb la biosíntesi del nucli sinó del coenzim A (Geerlof *et al.*, 1999).

**Taula 2.1.** Assignació de les funcions dels gens de l'agrupació *waa* de *S. marcescens* N28b comuns a tots els enterobacteris

ORF	Proteïna codificada	Funció assignada	Similitud amb proteïnes d'altres enterobacteris
<i>orf1</i> (truncat a 5')	HldD	ADP-D-glicero-D-manno epimerasa	95-96%
<i>orf2</i>	WaaF	ADP-heptosa-LPS heptosiltransferasa II	82-88%
<i>orf3</i>	WaaC	ADP-heptosa-LPS heptosiltransferasa I	82-88%
<i>orf8</i>	WaaQ*	ADP-heptosa-LPS heptosil transferasa II	60-78%
<i>orf12</i>	WaaA	CMP-Kdo:lipidA Kdo transferasa bifuncional	85-95%
<i>orf14</i>	CoaD	Fosfopanteteina adenililtransferasa CoaD	~ 90%

\*) Assignació temptativa

D'altra banda, a l'extrem 3' del gen *waaA* s'havia identificat un gen (*waaE*) (Guasch *et al.*, 1996), que es creia que podia estar implicat en la transferència d'un residu de  $\beta$ -glucosa a l'heptosa I del nucli intern (Piqué, 2000), i que era molt similar al gen *waaE* de *Klebsiella pneumoniae* (Regué *et al.*, 2001). La funció suggerida per aquest gen es va proposar de corroborar en aquest treball (veure secció 4.2.2.2 *ORF13*). Finalment, *orf5* es va postular com a candidat per ser el gen *waaL*, ja que la proteïna que codificava presentava nivells significatius de similitud (45- 46%) i d'identitat (24 – 27%) amb la proteïna WaaL (llogasa de l'antigen O) de *E. coli* R1, R2, R4 i K12, contenia 10 presumibles dominis transmembrana i a més, compartia amb les proteïnes WaaL un perfil hidropàtic i un nombre i distribució similar de presumptes dominis transmembrana (Abitiu, 2000). La caracterització funcional de la resta de gens no compartits requeria l'elucidació prèvia de l'estructura del nucli del LPS de *S. marcescens*.



**Figura 2.1.** Agrupació gènica *waa* de *S. marcescens* N28b

En colors (excepte gris) s'indiquen els gens amb la funció assignada a l'inici d'aquest treball, mentre que en gris s'indiquen els gens als que se'ls hi atribuïa una presumpta funció però que ha estat confirmada en el present treball. Concretament, en blau es mostren els gens implicats en la formació del nucli intern, en taronja, el gen que codifica per la llogasa i en groc, els gens que no estan implicats directament en la biosíntesi del LPS (*coaD*) o bé els que no estan directament involucrats en la transferència de sucres al nucli del LPS (*hldD*)

## 2.2 OBJECTIUS

Tenint en compte aquests antecedents, ens vam proposar els següents objectius:

- **Elucidar l'estructura química de la regió del nucli del LPS** de *S. marcescens* N28b O4, desconeguda per tots els serovars d'aquesta espècie bacteriana;
- Completar la **caracterització funcional** de la resta de gens de l'agrupació gènica *waa* de *S. marcescens* N28b i en aquells casos en què hi havia una funció proposada de manera temptativa (gens *waaQ* i *waaE*), corroborar-la. L'assignació de les funcions als gens no compartits amb la resta d'enterobacteris es proposà de fer a través de la generació de mutants per deleció d'aquests gens i l'estudi de les estructures de nucli incomplet que es generaven o els canvis fenotípics que es produïen respecte a la soca salvatge.



