



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

4. RESULTATS

4. RESULTATS

4.1 ANÀLISI QUÍMIC I ESTRUCTURAL DE LA REGIÓ DEL NUCLI DEL LPS DE *S. marcescens* N28b

Com s'ha dit anteriorment a la secció 2. *Objectius*, la caracterització funcional dels gens implicats en la biosíntesi del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b que no eren compartits amb la resta d'enterobacteris requeria el coneixement previ de l'estructura química d'aquesta regió, que fins el moment, no era coneguda en cap de les soques de *S. marcescens*. Estudis preliminars havien però posat de manifest la presència de residus de D,D-Hep (Wang *et al.*, 1974) i d'àcid galacturònic (GalA) (Radziejewska-Lebrecht *et al.*, 1990). Posteriorment, resultats de composició química obtinguts en el nostre grup de treball van determinar la presència d'aquests residus en el nucli de *S. marcescens* N28b així com la presència de residus de β -glucosa (β -Glc) i de glucosamina (GlcN) i l'absència de grups fosfats (Piqué, 2000). Aquestes dades juntament amb les dades genètiques (per exemple, la presència del gen *waaE*) feien pensar que el nucli del LPS de *S. marcescens* N28b podia tenir una estructura química més pròxima als nuclis del LPS de *K. pneumoniae* i *Proteus* spp. que no pas als de *E. coli* i *Salmonella*.

Per tot això, en primer lloc ens vam proposar estudiar l'estructura química del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b. La soca de *S. marcescens* N28b utilitzada en aquest treball pertany al serovar O4. L'estructura química d'aquest antigen O4 és coneguda (Oxley i Wilkinson, 1988) (veure secció 1.2.5 *L'antigen O*).

4.1.1 CARACTERITZACIÓ DEL LPS EXTRET

L'anàlisi de l'estructura del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b O4 es va dur a terme amb un mutant d'aquesta soca deficient en antigen O (N28b4), prèviament obtingut en el nostre grup d'investigació (Saigi *et al.*, 1999). El lipopolisacàrid d'aquest mutant no presenta antigen O degut a una doble mutació en els gens *wzm* i *wzt* que impedeix l'exportació de l'antigen O complet al periplasma. La utilització d'aquest mutant deficient en antigen O enlloc de la soca salvatge permet augmentar la proporció de l'oligosacàrid del nucli en el LPS extret i així facilitar l'aïllament d'aquesta regió i l'obtenció en quantitats suficients per a dur a terme els estudis estructurals.

Per a l'extracció del LPS, la soca N28b4 es va fer créixer en 30 litres cultiu líquid TSB a 37°C en les condicions descrites a la secció 3.5.1 *Obtenció del lipopolisacàrid*. Després de més de 15 hores de cultiu, les cèl·lules es van deshidratar seguint el procediment descrit en la secció 3.5.1 i es van obtenir 44,6 g de pes sec. A partir d'aquesta quantitat de cèl·lules deshidratades es procedí a extraure el LPS pel mètode de PCP segons el procediment descrit a la secció 3.5.1.3 *Extracció de LPS pel mètode PCP* ja que és el mètode més adequat per extraure LPS de tipus R, que no presenten antigen O i per tant són més lipòfils. Es varen obtenir 589 mg de LPS que representa un 1,3% del pes total sec del bacteri.

En paral·lel, com a control es va extreure LPS de la soca salvatge de *S. marcescens* N28b (N28b) a partir d'un cultiu líquid de 30 litres a 37°C. Com que aquesta soca presenta un LPS de tipus S, l'extracció del LPS es va realitzar pel mètode de fenol-aigua (veure secció 3.5.1.2 *Extracció de LPS pel mètode de fenol – aigua*). S'obtingueren 450 mg de LPS que representa un 1,02% del pes total sec del bacteri.

En primer lloc, amb els LPSs extrets es va dur a terme un estudi del seu perfil electroforètic a través de gels de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE) al 15% d'acrilamida, seguint el mètode descrit a la secció 3.5.2 *Anàlisi del LPS per electroforesi en gels de poliacrilamida*. El perfil electroforètic obtingut per al LPS del mutant deficient en antigen O (N28b4) i per al de la soca salvatge (N28b) es mostra a la Figura 4.1.



Figura 4.1. Perfil electroforètic en gels SDS-PAGE. Carril 1: N28b4; carril 2: N28b

En aquests gel es va poder corroborar que el LPS extret corresponent a la soca salvatge N28b presentava el patró característic d'escala que presenten els LPS de tipus S quan s'analitzen per SDS-PAGE, on cada graó de l'escala representa una molècula de lípid A- nucli substituïda per una unitat O addicional i a on l'espai entre els diferents graons depèn de la mida de la unitat O (Raetz i Whitfield, 2002). Com era d'esperar per un LPS-R, el mutant deficient en antigen O no presentava el patró d'escala però mantenia la mateixa mobilitat electroforètica que la de la soca salvatge, ja que la regió lípid A – nucli és la mateixa.

Posteriorment, es va realitzar una tinció del mateix gel SDS-PAGE amb blau de Coomassie (veure secció 3.5.2.4 *Tinció dels gels*) per a descartar la presència de proteïnes contaminants a les mostres de LPS estudiades. Després de la solució destenyidora no van aparèixer bandes que poguessin correspondre a proteïnes, indicant que les mostres de LPS extretes estaven lliures de proteïnes contaminants.

4.1.1.1 Anàlisi composicional

Es va determinar la composició en sucres, fosfats i àcids grassos dels LPSs extrets tant de la soca salvatge N28b com del mutant deficient en antigen O (N28b4) per mètodes colorimètrics (per la determinació de fosfats, Kdo, glucosamina) i per cromatografia de gasos (per la determinació de sucres neutres, àcids urònics, àcids grassos i Ko), descrits a la secció 3. *Materials i mètodes*.

L'anàlisi de sucres i fosfats va revelar la presència de quantitats significatives de glucosa (Glc), galacturònic (GalA), L,D-heptosa (L,D-Hep), D,D-heptosa (D,D-Hep), glucosamina (GlcN), fosfats i Kdo en ambdues mostres analitzades (N28b i N28b4). Com era d'esperar, els residus de ramnosa (Rha) només es van detectar a la mostra N28b, ja que aquest monosacàrid, juntament amb la glucosa, és un constituent de les subunitats de repetició de l'antigen O4 de *S. marcescens* N28b, i per això no es detecta en el mutant deficient en antigen O. A la Taula 4.1 es mostra la concentració obtinguda d'aquests components per a cada mostra analitzada.

Taula 4.1. Composició qualitativa i quantitativa en sucres (neutres, àcids urònics, glucosamina, Kdo) i fosfats del LPS sencer de la soca salvatge *S. marcescens* N28b i del mutant deficient en antigen O (N28b4)

	Concentració nmols / mg LPS									
	Rha	Man	Glc	Gal	GalA ^{a)}	L,D-Hep	D,D-Hep	GlcN unida	Fosfat orgànic	Kdo _{HCl}
N28b	494	24	676	>0	82	218	65	417 ^{b)}	376	188
N28b4	>0	80	616	70	71	620	190	609	426	224

a) El contingut en galacturònic correspon a la diferència del valor obtingut per la galactosa en la determinació d'àcids urònics i sucres neutres. Aquest valor no representa el total de la mostra ja que hi ha part del galacturònic que no es pot quantificar perquè està unit a una hexosamina per un enllaç que és resistent a les condicions d'hidròlisi utilitzades en la determinació

b) Aquest valor correspon a GlcN total enlloc de GlcN unida (GlcN total – lliure) perquè la GlcN lliure no es va poder determinar per excessiu error analític

Abreviatures: Rha, ramnosa; Man, manosa; Glc, glucosa; Gal, galactosa; GalA, àcid galacturònic; Hep, heptosa; GlcN, glucosamina

Tal i com es pot observar a la Taula 4.1, el LPS d'ambdues mostres es caracteritza per la presència de residus d'àcid galacturònic i D,D-heptosa. D'altra banda, la concentració de fosfat orgànic és inclús més baixa que la de la glucosamina, fet que pot indicar que aquest fosfat està unit a la glucosamina del lípid A i per tant, no hi hauria residus de fosfat a la fracció polisacàridica. Aquestes dades preliminars concorden amb els resultats de composició obtinguts prèviament en el nostre grup d'investigació i també amb la nostra hipòtesi de que el nucli del LPS de *S. marcescens* sigui més similar al de *Klebsiella pneumoniae* que al de *E. coli* o *Salmonella*.

Durant l'anàlisi per cromatografia de gasos d'aquestes mostres per a la determinació d'àcids urònics es va detectar l'aparició d'un nou pic amb un temps de retenció de 47,6 minuts (150°C 3', 3°C/min, 300°C 5') que va fer sospitar la presència d'un disacàrid compost d'una hexosamina amb un àcid galacturònic (HexNAc-O-Gal(D₂)ol). Es coneix que les condicions habituals d'hidròlisi utilitzades per a la determinació d'àcids urònics no són capaces d'hidrolitzar l'enllaç entre un residu d'hexosamina que pot haver en l'oligosacàrid del nucli o polisacàrid O i un àcid galacturònic i per tant, apareix en el cromatograma un nou pic, corresponent al disacàrid, amb un temps de retenció més elevat. Per a corroborar-ho, les mostres derivatitzades a alditol derivats es van analitzar per cromatografia de gasos acoblada a masses (GC-MS) en les mateixes condicions cromatogràfiques anteriors. Amb aquest anàlisi es va poder corroborar que l'espectre de masses obtingut per a aquest nou pic corresponia a un disacàrid de HexNAc-O-

Gal(D₂)ol. Al mateix temps, aquest anàlisi va permetre corroborar la presència d'àcid galacturònic a ambdues mostres, ja que l'espectre de masses obtingut corresponia al de la galactosa amb la diferència que els pics apareixien com a doblets per la presència dels 2 deuteronomis incorporats la mostra. Cal tenir en compte que l'existència d'aquest disacàrid HexNAc-O-Gal(D₂)ol comporta una determinació errònia (per sota del valor real) del contingut en àcid galacturònic de les mostres, ja que part de l'àcid galacturònic no apareix en el temps de retenció de la galactosa sinó en un de posterior que correspon al del disacàrid.

També es va analitzar la presència de residus d'àcid *D-glicero-D-talo-oct-2-ulosònic* (Ko) pel mètode descrit a la *secció 3.5.4.3 Determinació de l'àcid D-glicero-D-talo-oct-2-ulosònic (Ko)*. Tant en la mostra de LPS de la soca salvatge N28b com la del mutant deficient en antigen O (N28b4) es detectà per cromatografia de gasos un pic nou molt petit que pel temps de retenció podia correspondre al del Ko. Ambdues mostres es van injectar a GC-MS on es va poder confirmar que l'espectre de masses obtingut per al nou pic corresponia a Ko en quantitats molt baixes. A més, GC-MS va permetre confirmar la presència de Kdo en les dues mostres, detectada prèviament per mètodes colorimètrics i a més, en la mostra N28b4 es va identificar un pic nou que es corresponia amb una estructura tipus Ko-O-Kdo.

Com exemple, a la Figura 4.2 es mostra l'espectre de masses obtingut per al pic a t_r 19,52 min que correspon al derivat acetilat del carboximetil metil èster del Kdo present a la mostra N28b. El fragment d'ió més abundant en el rang dels pesos moleculars elevats és un ió de $m/z = 375$, que es forma per trencament del grup carboximetil èster (COOCH₃; 59 Da) de la molècula sencera (M= 434Da). El trencament del grup metoxi OCH₃ forma en canvi un ió de $m/z = 403$.

A la Figura 4.3 es mostra l'espectre de masses obtingut per al pic t_r 37,68 min que correspon a una estructura tipus Ko-O-Kdo en l'anàlisi de la mostra de LPS de N28b4 derivatitzada per tractament de metanòlisi i peracetilació. La fragmentació d'una estructura tipus Ko-O-Kdo dóna lloc a un ió de $m/z = 461$ que correspon al derivat del Ko i a un de $m/z = 375$ que correspon al derivat de Kdo. D'altra banda, el pes molecular de l'estructura sencera és de 852Da, que per la pèrdua d'un grup carboximetil èster dóna lloc a un ió de $m/z = 793$, que també apareix en l'espectre de masses.

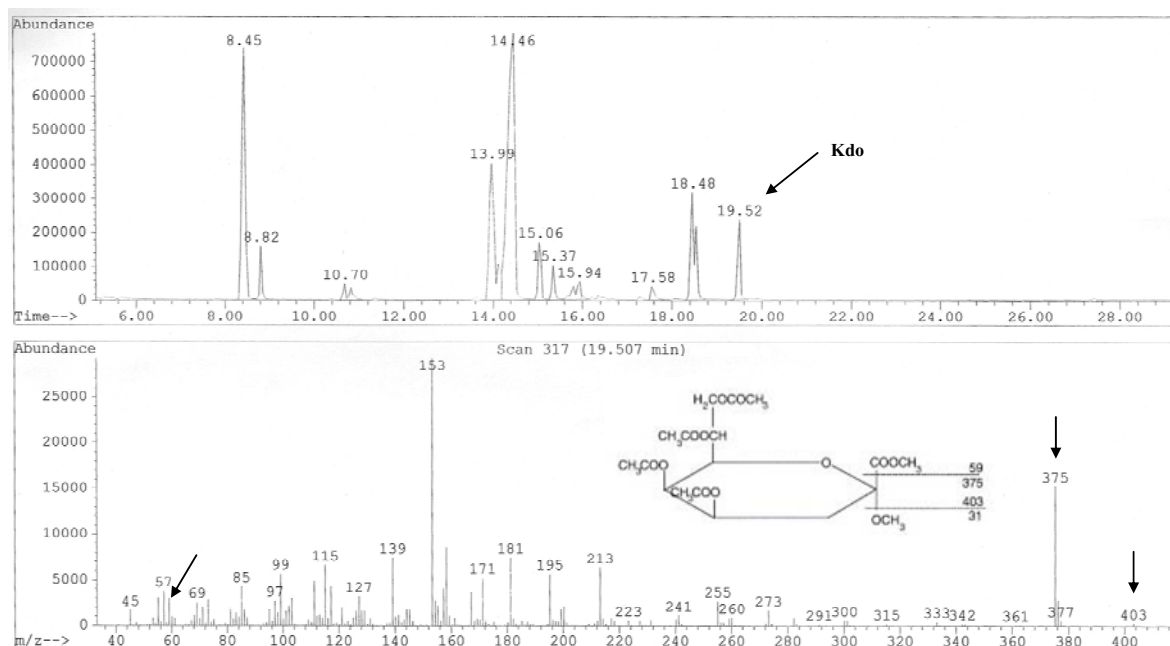


Figura 4.2. Cromatograma de GC-MS de la mostra de LPS de N28b metanolitzada i peracetilada i espectre de masses del pic t_r 19,52 min corresponent al Kdo

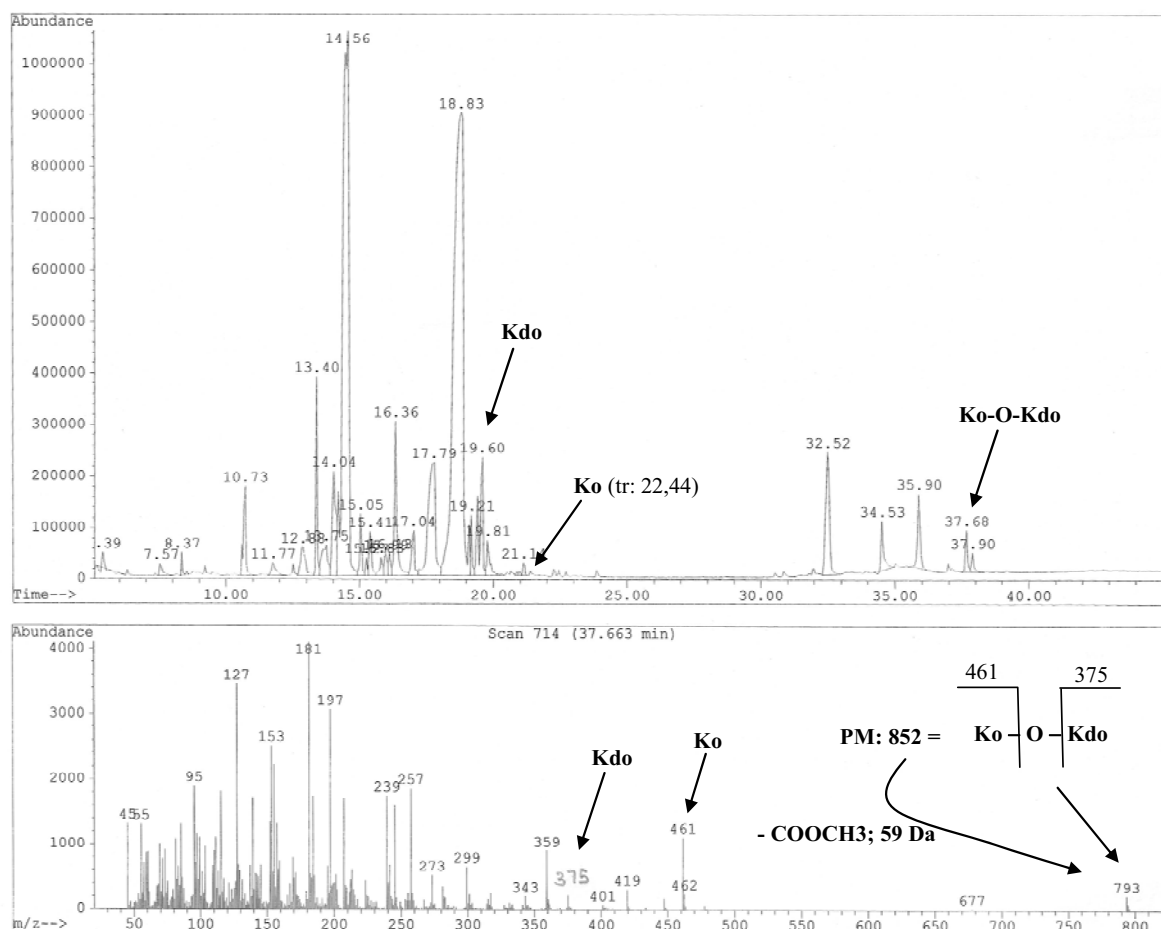


Figura 4.3. Cromatograma de GC-MS de la mostra de LPS de N28b4 metanolitzada i peracetilada i espectre de masses del pic t_r 37,68 min corresponent a Ko-O-Kdo

La caracterització de les dues mostres de LPS sencer estudiades (N28b i N28b4) es va completar amb la determinació de la **composició qualitativa i quantitativa en àcids grassos** del lípid A per cromatografia de gasos, segons el mètode descrit en la secció 3.5.4.4 *Determinació d'àcids grassos*. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 4.2. Tal i com es pot observar, la composició qualitativa d'ambdues mostres és la mateixa: l'àcid gras majoritari és el 3-hidroximiristat (3 OH – 14:O), com correspon a la majoria de lípids A i també es detecta la presència tant de làuric (12:0) com mirístic (14:0), que en el cas dels lípids de *E. coli* i *S. enterica* esterifiquen els grups hidroxils dels 3-hidroximiristat que ocupen les posicions 2' i 3', respectivament, del disacàrid de glucosamina. Els resultats obtinguts per les mostres de LPS estudiades són compatibles amb una estructura estàndard de lípid A similar a la de *E. coli*. La presència de la resta d'àcids grassos identificats (2 OH-14:0 i 16:O) es podria explicar per modificacions posteriors a l'estructura del lípid A, que en alguns casos es produeix en resposta a certs estímuls ambientals (veure secció 1.2.3 *El lípid A*).

Taula 4.2. Composició en àcids grassos de les mostres de LPS de N28b i N28b4

	Concentració nmols / mg LPS						
	12:0	14:0	2 OH – 14:O	3 OH – 14:O	16:O	18:1	18:0
N28b	17	87	135	568	77	>0	-
N28b4	13	94	311	936	142	>0	-

4.1.2 SEPARACIÓ I AÏLLAMENT DE LES DIFERENTS FRACCIONS DEL LPS EXTRET

El primer pas per a l'estudi de la regió del nucli del LPS correspon a la separació de la regió polisacàridica (regió del nucli + polisacàrid O) del lípid A, que es pot dur a terme principalment per dues tècniques d'hidròlisi: tractament amb hidrazina (hidrazinòlisi) o tractament amb àcid acètic.

La hidrazinòlisi és sovint el mètode d'elecció per a la separació de la fracció polisacàridica perquè permet obtenir la fracció polisacàridica sencera, incloent el disacàrid de glucosamina del lípid A (veure Figura 4.4), però està desaconsellada si se sospita de la presència d'àcids urònics substituïts en posició C-4. El tractament amb hidrazina provoca una O-deacilació del LPS trencant els enllaços èster entre el disacàrid

de glucosamina i els àcids grassos del lípid A, ja que aquest compost és un potent nucleòfil capaç d'atacar aquests enllaços èster. Seguidament, es fa un tractament d'hidròlisi bàsica amb KOH en calent (120°C durant 16h) per N-deacilar el LPS O-deacilat, que resulta en la hidròlisi dels enllaços amida que uneixen els residus acil al disacàrid de glucosamina. El problema és que aquest tractament provoca un procés de β -eliminació en presència d'àcids urònics substituïts en posició C-4, introduint un doble enllaç entre el carboni 4 i el carboni 5 i donant lloc a un residu *threo*-hex-4-enuronopiranosil (Frirdich *et al.*, 2004). Això resulta en el trencament de l'oligosacàrid i la pèrdua dels residus units en posició C-4 de l'àcid galacturònic.

En el nostre cas, els estudis de composició inicial sobre el LPS indicaven la presència d'àcid galacturònic. Per tal d'evitar qualsevol problema de β -eliminació i la conseqüent ruptura de l'oligosacàrid del nucli es va optar per una hidròlisi suau amb àcid acètic al 1%. Aquest tractament permet separar el lípid A (grups acil + disacàrid de glucosamina) de la fracció polisacàridica a través de la ruptura de l'enllaç entre la molècula de Kdo i el grup OH de la posició 6' del disacàrid de glucosamina (veure Figura 4.4). Aquest tractament però també pot trencar l'enllaç entre dues molècules de Kdo.

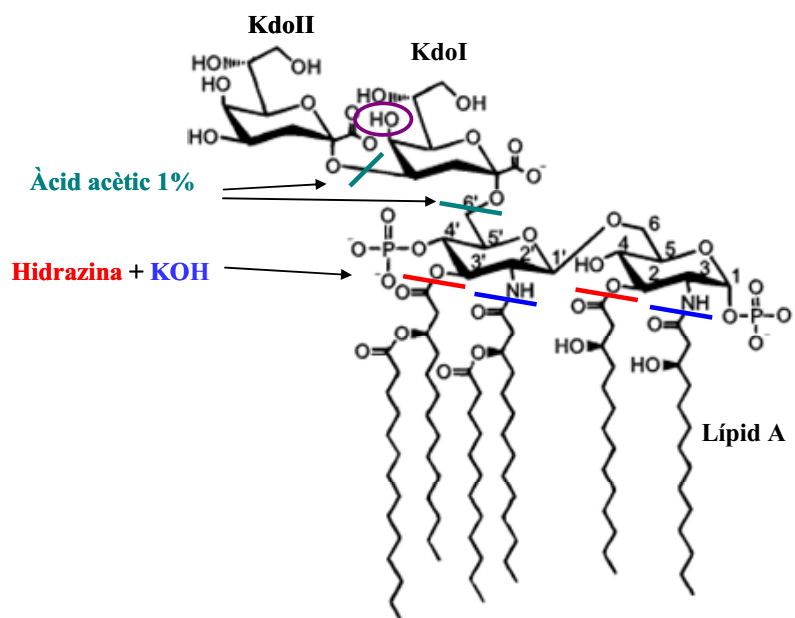


Figura 4.4. Efectes del tractament amb àcid acètic o hidrazina + hidròxid potàssic (KOH) sobre la regió del nucli del LPS i el lípid A

Per simplificar l'esquema es mostra només l'estructura corresponent a un lípidA – Kdo. En un cercle lila es mostra el lloc d'unió del primer residu d'heptosa a partir del qual s'estén l'oligosacàrid del nucli. La línia verda simula la ruptura de l'enllaç després de la hidròlisi amb àcid acètic 1%. La línia vermella mostra els enllaços hidrolitzats per tractament amb hidrazina mentre que la línia blava indica els enllaços hidrolitzats per tractament amb KOH en calent

Com s'ha dit anteriorment, l'estudi de l'estructura química del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b es va realitzar amb el mutant derivat de la soca salvatge que no presenta antigen O (N28b4). Així, per tal de separar la regió polisacàridica del lípid A, en primer lloc, es va dur a terme una hidròlisi a petita escala amb 30 mg del LPS de la mostra N28b4 a les següents condicions d'hidròlisi: 90 minuts 100°C, seguint el procediment descrit a la secció 3.5.5.1 *Hidròlisi amb àcid acètic*. Després de l'ultracentrifugació, es liofilitzà el sobrenedant, que correspon a la fracció polisacàridica. El sediment obtingut (13,5 mg) correspon al lípid A. Seguidament, tot el sobrenedant (13,5 mg) es dissolgué en 2 ml de tampó acetat de piridina i s'aplicà a una columna Sephadex G-50 (veure secció 3.5.5.2.1 *Cromatografia per gel-filtració*) per tal de separar i aïllar la fracció corresponent a la regió del nucli del LPS. A la Figura 4.5 es mostra el cromatograma obtingut per aquesta mostra, on es va posar de manifest la presència de tres pics, que es varen anomenar N28b4-A, N28b4-B i N28b4-C. Els tres pics varen donar resultats positius en cromatografia en capa fina, indicant la presència de sucres (veure secció 3.5.6 *Cromatografia en capa fina*). Les fraccions positives corresponents a cadascun dels pics s'ajuntaren i es liofilitzaren per conèixer el pes de cada fracció. El pic corresponent a la fracció N28b4-B fou el majoritari.

Un cop es va comprovar que les condicions d'hidròlisi i de separació en la columna Sephadex G-50 eren adequades per aquesta mostra, es va dur a terme de nou una hidròlisi amb àcid acètic en les mateixes condicions però a més gran escala. Concretament, es va partir de 200 mg de LPS de la mostra N28b4 i es van obtenir 88 mg (44%) de lípid A (sediment) i 88 mg (44%) de fracció polisacàridica, que representa una proporció molt similar de lípid A i fracció polisacàridica de la que s'obtingué a petita escala. Seguidament, el sobrenedant obtingut (88 mg) es dissolgué en 10 ml de tampó acetat de piridina i s'aplicà a la columna de Sephadex G-50 en dues parts per tal d'evitar la saturació de la columna. S'obtingué el mateix cromatograma amb tres pics (veure Figura 4.5) corresponents a les fraccions N28b4-A, N28b4-B i N28b4-C. Les fraccions positives corresponents a cadascun dels pics s'ajuntaren i es liofilitzaren per conèixer el pes de cada fracció. Les quantitats obtingudes per a cadascuna d'aquestes fraccions s'indiquen a la Taula 4.3.

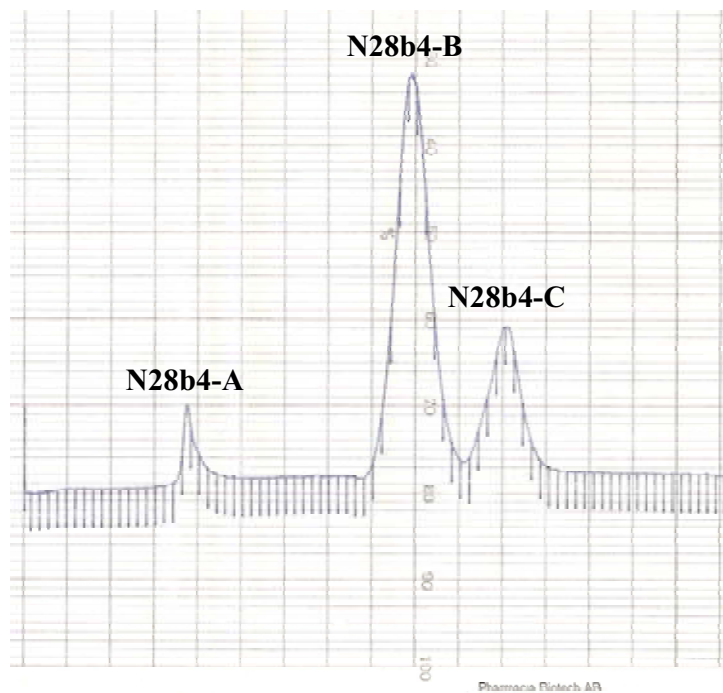


Figura 4.5. Cromatograma obtingut per cromatografia de gel-filtració en columna Sephadex G-50 després de la hidròlisi amb acètic del LPS del mutant N28b4

Taula 4.3. Quantitats obtingudes de cada fracció després de la hidròlisi amb àcid acètic i separació en la columna Sephadex G-50 de 200 mg de LPS del mutant N28b4

Fracció	Quantitat
Lípid A (<i>sediment</i>)	88 mg (44%)
Fracció polisacàridica (<i>sobrenedant</i>)	88 mg (44%)
N28b4-A	3 mg
N28b4-B	70 mg
N28b4-C	14 mg

4.1.2.1 Caracterització de les diferents fraccions

La tècnica de gel-filtració permet separar les molècules en solució en funció de la seva mida forçant el seu pas a través d'un gel dins d'una columna. Les molècules de mida més gran elueixen primer, ja que degut a la seva mida no poden entrar dins els porus del gel. En canvi, les molècules més petites triguen més a eluir ja que poden difondre cap a l'interior dels porus de la matriu i per tant, queden retingudes més temps.

Habitualment, en els LPSs de tipus S, la separació per cromatografia gel-filtració en la columna Sephadex G-50 dóna lloc a l'aparició de tres pics cromatogràfics: un primer pic conté la fracció polisacàridica de més alt pes molecular, que sol correspondre a la

regió del nucli unit a l'antigen O; una segona fracció conté l' oligosacàrid del nucli i; l'última fracció correspon a monosacàrids, disacàrids i altres productes de degradació procedents de la hidròlisi dels compostos sacarídics.

La mostra de LPS que vam analitzar (N28b4) provenia d'un mutant derivat de *S. marcescens* 28b que no té polisacàrid O, i per tant, es va pensar que el pic N28b4-B, que és d'altra banda el majoritari, havia de correspondre a la fracció de l'oligosacàrid del nucli del LPS, i era per tant la fracció que tenia interès per nosaltres. D'altra banda, la fracció N28b4-A era molt minoritària mentre que la fracció N28b4-C havia de correspondre a productes d'hidròlisi.

Per tal de descartar la fracció N28b4-C, es van injectar 50 µg d'aquesta fracció a una columna d'intercanvi iònic d'alta resolució HPAEC en condicions alcalines (veure secció 3.5.5.2 *Cromatografia d'intercanvi iònic d'alta resolució (HPAEC)*) aplicant el següent gradient de l'eluent 1M NaAc en 0,1M NaOH: 5% d'eluent durant 5 minuts, gradient de 5% a 60% fins al minut 60 i 100% d'eluent durant 5 min. Tal i com es pot observar en la Figura 4.6, en les condicions estàndard provades, només van aparèixer dos pics que van eluir molt ràpidament, la qual cosa indicava la presència en aquesta fracció de sucres hidrolitzats com monosacàrids o disacàrids i no pas d'oligosacàrids o polisacàrids, i per tant, aquesta fracció es va deixar d'estudiar. En contraposició, quan es van injectar 40 µg de la fracció N28b4-B en la mateixa columna en les mateixes condicions analítiques, van aparèixer més pics a temps de retenció molt més elevats (veure Figura 4.6), que és senyal de la presència d'oligosacàrids i no de sucres hidrolitzats.

Es va també determinar la composició en sucres de la fracció N28b4-B pels mètodes descrits a la secció 3. *Materials i mètodes*. Els resultats obtinguts, que es mostren a la Taula 4.4, van posar de manifest que aquesta fracció corresponia a la regió del nucli del LPS, ja que s'hi va detectar la presència de quantitats significatives de L,D-Hep, D,D-Hep i Kdo, que són monosacàrids característics de la regió del nucli. Com a comprovació, també es va dur a terme l'anàlisi de sucres neutres de la fracció N28b4-A (veure Taula 4.4). En aquest cas es va detectar una molt baixa proporció de L,D-Hep en comparació amb quantitats força elevades de glucosa i galactosa, que podien indicar una barreja de polisacàrids procedents de la càpsula o d'altres exopolisacàrids i per tant, aquesta fracció es va deixar d'estudiar.

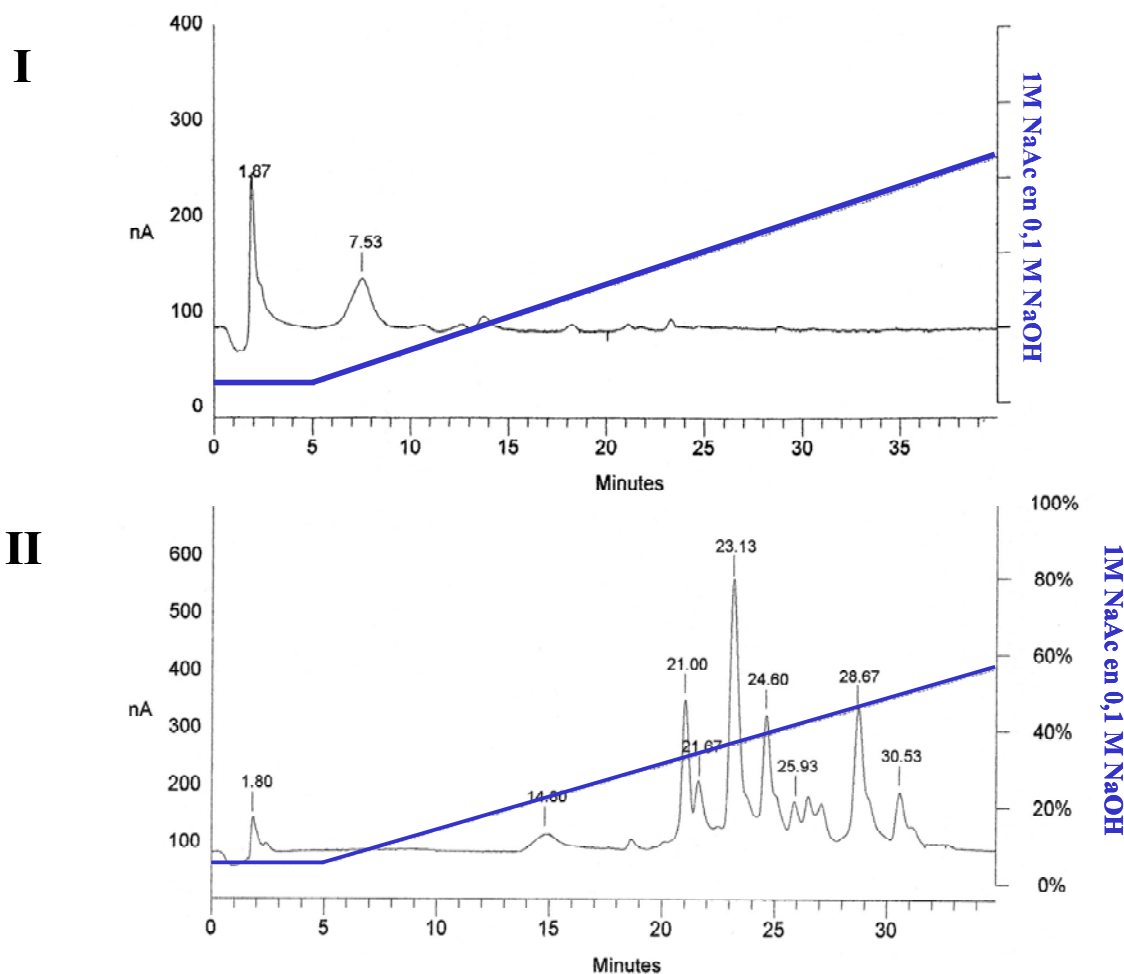


Figura 4.6. Cromatogrames obtinguts per cromatografia d'intercanvi iònic HPAEC realitzats sobre les fraccions N28b4-C (I) i N28b4-B (II) en condicions alcalines
 Gradient: 5% de 1M NaAc en 0,1M NaOH durant 5 min., de 5% fins a 60% fins el minut 60, seguit de 100% durant 5 min

Nota: en ambdós cromatogrames es mostra únicament la regió on van aparèixer els pics. Més enllà dels temps de retenció mostrats no hi va eluir cap analít

Taula 4.4. Composició en sucres de les fraccions N28b4-A i N28b4-B

	Concentració nmols / mg fracció					
	Glc	Gal	GalA	L,D-Hep	D,D-Hep	Kdo _{HCl}
N28b4-A	1129	1136	N.A.	130	33	N.A.
N28b4-B	400	N.D.	30	233	78	174

N.A.: no analitzat

N.D.: no detectat

4.1.3 AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ DELS DIFERENTS OLIGOSACÀRIDS DEL NUCLI DEL LPS

Com ja s'ha dit anteriorment a la secció 1.2.4 *El nucli del lipopolisacàrid*, la regió del nucli del LPS presenta cert grau d'heterogeneïtat com a conseqüència de la presència de substituents no-estequiòmètrics i d'altres modificacions estructurals de l'oligosacàrid predominant, que dificulten l'anàlisi estructural.

Per a comprovar el grau d'heterogeneïtat de la regió del nucli del LPS, la fracció N28b4-B es va analitzar per cromatografia d'intercanvi aniònic d'alta resolució (HPAEC) acoblada a un detector amperomètric de pulsació (PAD). Aquesta tècnica cromatogràfica està optimitzada per a la separació de monosacàrids i oligosacàrids amb diferències estructurals mínimes sense necessitat de derivatitzar prèviament i presenta una elevada sensibilitat (detecció a nivells de picomols). A la secció 3.5.5.2.2 *Cromatografia d'intercanvi iònic d'alta resolució (HPAEC)* s'inclou una descripció més detallada d'aquesta tècnica.

En primer lloc, es van injectar 15 - 40 µg de la fracció N28b4-B tant en condicions neutres com en condicions alcalines a la corresponent columna analítica (4 x 250 mm, Dionex Corp.) i es van provar diferents gradients dels eluents corresponents per tal d'optimitzar la separació dels pics. Finalment, es van elegir les condicions alcalines perquè foren les que van permetre obtenir millor separació dels pics i això s'aconseguí amb un gradient lineal de 15% a 40% de 1M NaAc en 0,1M NaOH durant 70 minuts i a un flux de 1 ml/min. Tot i que en condicions alcalines fortes hi ha cert risc de patir reaccions de degradació, es va valorar el risc com a baix ja que el procés cromatogràfic és curt i a més, aquest tipus de reaccions no es produeixen a temperatura ambient.

A la Figura 4.7 es mostra el cromatograma obtingut per a la separació de la mostra N28b4-B per cromatografia d'intercanvi iònic HPAEC en condicions analítiques. En el cromatograma es poden observar varis pics, que indica la presència d'una mescla complexa d'oligosacàrids que componen la regió del nucli del LPS.

Per tal d'aïllar i purificar cadascun dels oligosacàrids del cromatograma, es van aplicar 45 mg de la fracció N28b4-B en dos cops (30 + 15 mg) a una columna semipreparativa

(9 x 250 mm, Dionex Corp.) en les mateixes condicions analítiques anteriors (gradient lineal de 15% a 40% de 1M NaAc en 0,1M NaOH durant 70 minuts) a un flux de 4 ml/min. Per tal d'evitar interferències en la separació dels pics, prèviament a l'injecció de la mostra N28b4-B en la columna, es van fer tres cicles addicionals de liofilització a fi d'eliminar els residus d'acetat de piridina. Per a comprovar la bona separació dels pics, les fraccions obtingudes durant la separació en la columna preparativa es van reinjectar en la columna analítica en les mateixes condicions de gradient. Es va posar de manifest que únicament s'havien pogut aïllar els oligosacàrids **1** i **2** (veure Figura 4.7) mentre que els pics que tenien temps de retenció anteriors (inferiors als 50 minuts) no s'havien pogut separar en la columna semipreparativa.

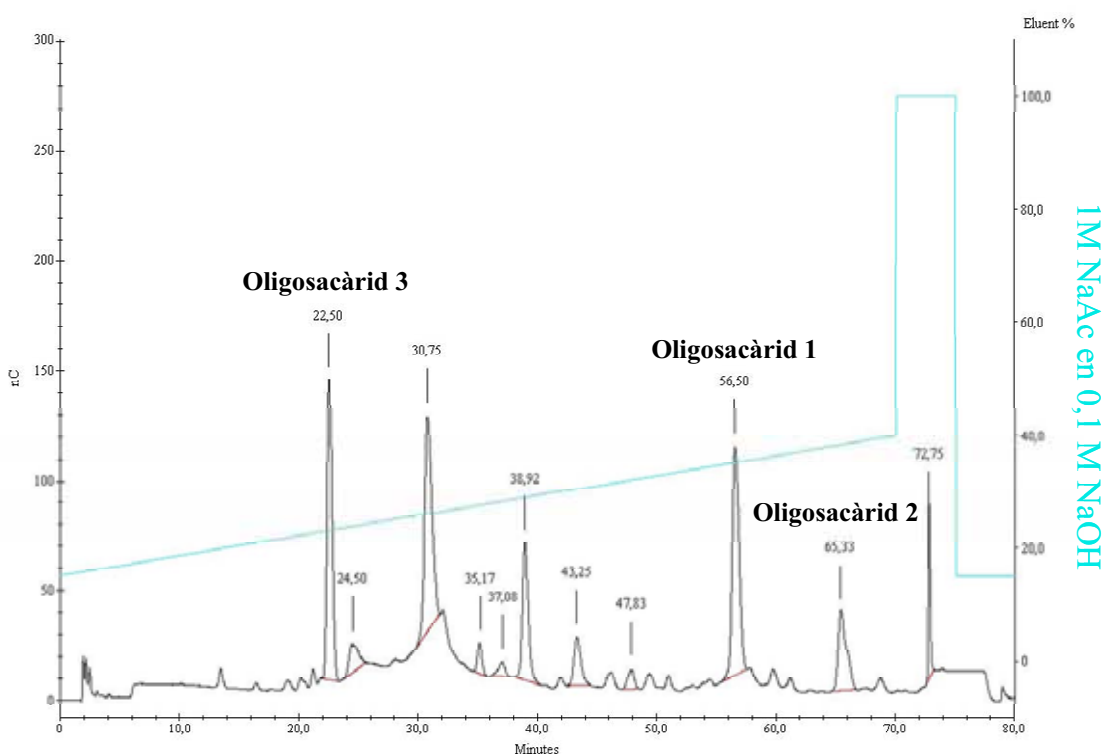


Figura 4.7. Cromatograma obtingut durant la separació de la mostra N28b4-B per HPAEC en una columna 4 x 250 mm en condicions alcalines amb un gradient de lineal de 15% a 40% de 1M NaAc en 0,1M NaOH durant 70 minuts i a un flux 1 ml/min

Una columna analítica té una capacitat superior de resolució i separació dels pics que l'equivalent columna semipreparativa. A fi d'intentar aïllar els pics de la primera regió que se separaven en condicions analítiques però que no vam ser capaços d'aïllar en la columna semipreparativa, es va reinjectar la primera fracció en la columna analítica. Per això, en primer lloc, es varen recollir les fraccions obtingudes en condicions

semipreparatives corresponents a la primera regió del cromatograma i es van purificar per gel-filtració en una columna Sephadex G-10 (veure secció 3.5.5.2.1 *Cromatografia per gel-filtració*) per tal d'eliminar el contingut en sals que es forma durant la cromatografia HPAEC. Un cop desalinitzades i liofilitzades, es van ajuntar totes les fraccions (9,36 mg), es preparà una solució de 10 mg/ml en aigua bidestil·lada i s'injectà tota la mostra manualment en la columna analítica amb el mateix gradient anterior a un flux de 1 ml/min. La mostra s'injectà en volums equivalents a 1 mg de mostra, que és el màxim que es pot analitzar a través de la columna analítica. Tot i que en el cromatograma s'aprecià la separació dels tres pics majoritaris de la primera regió (veure Figura 4.7), quan es recromatografiaren alíquotes de les fraccions corresponents a cadascun dels pics es va poder observar que únicament s'havia pogut separar el pic amb temps de retenció 22,50 min (oligosacàrid 3) mentre que la resta de pics apareixien en realitat com a mescles de compostos.

En resum, les diferents cromatografies HPAEC sobre la mostra N28b4-B van permetre separar i purificar tres oligosacàrids de la mescla complexa d'oligosacàrids del nucli del LPS que es posà de manifest en l'anàlisi inicial per cromatografia HPAEC en condicions analítiques (veure Figura 4.7). Cadascun dels tres oligosacàrids obtinguts es van purificar per gel-filtració en una columna Sephadex G-10 (veure secció 3.5.5.2.1 *Cromatografia per gel-filtració*) per tal d'eliminar el contingut en sals. Les quantitats obtingudes per cadascun d'aquests oligosacàrids es mostren a la Taula 4.5. Abans de realitzar els experiments de ressonància magnètica nuclear (RMN), es va comprovar la puresa de cadascun d'aquests pics recromatografiant per HPAEC en les mateixes condicions analítiques anteriors una petita alíquota de cadascun dels oligosacàrids. Per això, de cada oligosacàrid es preparà una solució de 5 mg/ml en aigua deuterada i a partir d'aquesta es preparà una solució de 1 mg/ml en aigua bidestil·lada per a injectar en HPAEC uns 5 µg.

Taula 4.5. Quantitats obtingudes pels oligosacàrids purificats de la regió del nucli del LPS

	Quantitat (mg)
Oligosacàrid 1	5,6
Oligosacàrid 2	2,2
Oligosacàrid 3	1,5

4.1.4 DETERMINACIÓ DE LA COMPOSICIÓ EN SUCRES DELS OLIGOSACÀRIDS DEL NUCLI DEL LPS

Es va determinar per cromatografia de gasos la composició en sucres neutres i àcids urònics dels oligosacàrids aïllats de la regió del nucli del LPS. També es va determinar la concentració de glucosamina per reacció colorimètrica mentre que la concentració de Kdo únicament es va poder estudiar en l'oligosacàrid **1** degut a la poca quantitat de mostra disponible dels altres oligosacàrids. Les concentracions obtingudes es mostren a la Taula 4.6.

Taula 4.6. Composició en sucres neutres, àcids urònics, glucosamina i Kdo dels oligosacàrids purificats de la regió del nucli del LPS de N28b4

	Concentració nmols / mg oligosacàrid						
	Glc	Gal	GalA	L,D-Hep	D,D-Hep	GlcN	Kdo _{HCl}
Oligosacàrid 1	607	29	46	585	175	338	N.D.
Oligosacàrid 2	231	19	86	110	12	250	N.A.
Oligosacàrid 3	1448	N.D.	153	1544	552	452	N.A.

N.D.: no detectat; N.A.: no analitzat

Tal i com es pot observar a la Taula 4.6, tots els oligosacàrids presenten residus de glucosa, glucosamina, àcid galacturònic, L,D-heptosa i D,D-heptosa, encara que en l'oligosacàrid **2** tan sols hi ha traces d'aquest últim. En els oligosacàrids **1** i **2** també hi ha traces de galactosa. Respecte a la concentració de galacturònic present a la mostra, cal tenir en compte que en les determinacions realitzades sobre el LPS sencer (veure secció 4.1.1 *Caracterització del LPS extret*) es va confirmar per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses la presència d'un disacàrid de glucosamina i àcid galacturònic. La baixa concentració d'àcid galacturònic en els tres oligosacàrids podria ser deguda a la presència d'aquest disacàrid que no s'hidrolitzaria en les condicions utilitzades per a l'anàlisi de sucres per cromatografia de gasos. Això conduiria a una determinació d'àcid galacturònic per sota del valor real.

4.1.5 ANÀLISI PER RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR (RMN)

Per tal d'elucidar l'estructura química dels oligosacàrids purs derivats de la regió del nucli del LPS del mutant deficient en antigen O de *S. marcescens* N28b (N28b4) es van realitzar experiments de ressonància magnètica nuclear de protó (^1H -RMN) i de carboni 13 (^{13}C -RMN).

En primer lloc, es van dur a terme els experiments de ^1H -RMN d'una sola dimensió amb els tres oligosacàrids purs. Aquests van permetre establir el número de residus monosacàridics que contenia cada oligosacàrid analitzat a partir de la identificació dels desplaçaments químics dels hidrogens dels carbonis anomèrics. Aquests donen senyals característics a la zona de l'espectre compresa entre 4,3 i 5,9 ppm a diferència de la resta de protons que majoritàriament ressonen en la regió compresa entre 3,0 i 4,2 ppm, donant lloc a la superposició de senyals. Els espectres de ^1H -RMN també van donar informació sobre la presència de residus β -glicosídics, ja que els protons β -anomèrics apareixen com a dobles a la regió entre 4,4 i 4,8 ppm amb constants d'acoblament ($J_{2,3}$) entre 7 i 9 Hz en el cas de la β -glucosa, degut a una disposició trans diaxial. En contraposició, els protons α -anomèrics apareixen com a dobles a la regió compresa entre 4,8 i 5,9 ppm amb constants d'acoblament ($J_{2,3}$) entre 1 i 4 Hz, que corresponen a una disposició axial-equatorial o bé equatorial-equatorial. D'altra banda, les constants d'acoblament també proporcionen informació sobre la configuració estereoquímica dels diferents sucres. Així, la configuració *manno* es caracteritza per constants d'acoblament ($J_{2,3}$) molt baixes (al voltant de 1-2 Hz) mentre que la configuració *gluco* presenta constants d'acoblements més altes (>2 Hz). La informació que es pot extraure dels espectres de ^1H -RMN també és important per decidir quines són les fraccions més interessants d'estudiar amb més profunditat, que en el nostre cas, va ser l'oligosacàrid **3**, ja que era el més complert.

Els oligosacàrids **1** i **3** es van també analitzar per ^{13}C -RMN i els espectres obtinguts van permetre identificar els C anomèrics, que ressonen en la regió compresa entre 90 i 110 ppm. Per tant, la informació provinent dels desplaçaments químics en protó i ^{13}C es complementa alhora de determinar el nombre de monosacàrids que constitueixen un oligosacàrid.

També es van realitzar diversos experiments de RMN en dues dimensions tant homonuclears com COSY (COrrelated SpectroscopY), TOCSY (TOtal Correlated SpectroscopY), DQF-COSY (DOuble-Quantum Filtered COSY), NOESY (NOuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY) i ROESY (ROtating-frame Overhauser Enhancement SpectroscopY) com experiments heteronuclears ^1H , ^{13}C com HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) o HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) i la versió optimitzada HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence). Així, els experiments de COSY complementats amb els de TOCSY van permetre identificar els diferents protons que pertanyen a una mateixa unitat spin (un mateix residu) i el seu ordre dins cada residu i per tant, conduïren a la identificació dels monosacàrids presents. Els experiments de NOESY i ROESY van permetre determinar la seqüència dels diferents residus i juntament amb els desplaçaments químics de ^{13}C i els resultats dels experiments de HMBC / HMQC / HSQC es va poder determinar els punts i posicions d'unió entre els diferents residus.

A continuació, es resumeixen els estudis de RMN conduïts amb cada fracció i que van permetre l'elucidació de l'estructura del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b.

4.1.5.1 Anàlisi de l'oligosacàrid 1

L'estructura de l'oligosacàrid **1** pur es va caracteritzar per espectroscòpia de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN. L'espectre de ^1H -RMN realitzat a 600 MHz va posar de manifest l'existència de nou senyals en la regió anomèrica (Figura 4.8), que es van identificar com els següents residus: 4 heptoses, 3 hexoses, 1 hexosamina i 1 àcid hexosurònic (veure Taula 4.7). La identificació de cada residu va ser possible gràcies als experiments de ^1H -RMN en dues dimensions ^1H -COSY i TOCSY i als experiments heteronuclears de ^1H - ^{13}C HMQC (veure Taula 4.7). Els residus d'hexosa I i J (veure Figura 4.8) presentaven desplaçaments químics de 4,52 i 4,48 ppm, respectivament, que són característics de protons β -anomèrics i això va permetre determinar la configuració β -*gluco* per aquests dos residus d'hexosa. A més, la constant d'acoblament $J_{2,3}$ de 8 Hz per al residu J corroborà la identificació d'aquest residu com una β -glucosa. En contraposició, el tercer residu d'hexosa (residu A, veure Figura 4.8) i el residu d'hexosamina (residu F, veure Figura 4.8) es van identificar com α -*gluco* residus. La configuració de l'àcid hexosurònic (residu B) es va establir com α -

galacto mentre que pels quatre residus d'heptosa (residus C, D, E i G) es va determinar la configuració α -manno en funció de les baixes constants d'acoblament $J_{2,3}$ pròximes a 1 Hz que presentaven. D'altra banda, en aquest oligosacàrid **1** no es van observar cap dels senyals característics de l'hidrogen axial i equatorial del carboni 3 del residu de Kdo, que apareixen aproximadament a la regió de 2 ppm. Suposant que hi estigués present un residu de Kdo, l'oligosacàrid **1** correspondria a un deca-sacàrid, on tots els residus serien piranosos.

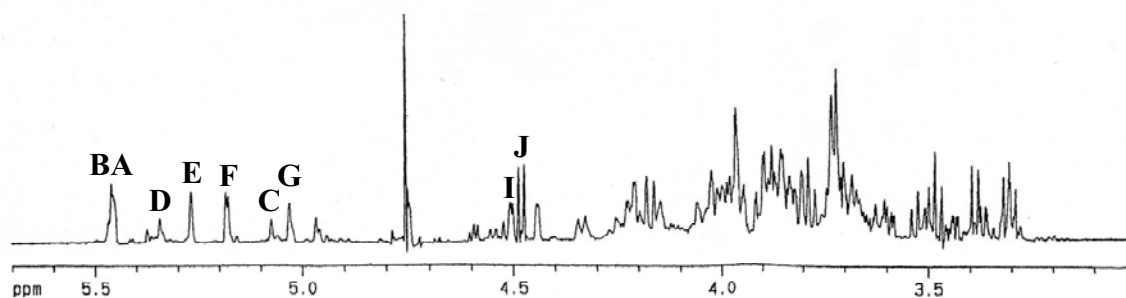


Figura 4.8. Espectre de ^1H -RMN de l'oligosacàrid **1** derivat del LPS del mutant deficient en antigen O de *S. marcescens* N28b (N28b4)

Les lletres es corresponen als residus monosacàridics indicats a la Figura 4.9 i indiquen el protó anomèric de cada residu

Els desplaçaments químics de ^{13}C -RMN es van assignar a través dels experiments de HMQC basant-se en l'espectre de protó interpretat. Aquests experiments permeten correlacionar els hidrogens amb els carbonis d'un mateix residu monosacàridic. Mitjançant aquest anàlisi es va poder identificar nou senyals anomèriques (veure Taula 4.7) en l'espectre de ^{13}C -RMN, amb concordança amb el nombre de residus identificats per ^1H -RMN. En canvi, no es va poder identificar cap senyal que pogués correspondre al carboni anomèric o al carboni en posició 3 d'un residu de Kdo. D'altra banda, es va observar la presència de senyals de ^{13}C -RMN amb desplaçaments químics a camps més baixos dels valors estàndards, que van indicar la presència de substitucions en les següents posicions (veure Taula 4.7): O-6 (del residu A), O-4 (del residu F), O-3 (del residu D), O-2 (del residu E), O-3 i O-4 (del residu C) i O-2 i O-4 (del residu B). Per als residus G, I i J no es van observar senyals amb desplaçaments químics a camps més baixos respecte als valors estàndard, i per tant, es va assumir que aquests residus eren sucres terminals.

Per a establir la seqüència de monosacàrids es va realitzar l'experiment de NOESY, on es van poder observar correlacions NOEs inter i/o intra residuals per als nou residus monosacàridics (veure Taula 4.8). Es detectaren les següents correlacions NOEs inter-residuals:

- entre el protó H-1 del residu de galacturònic (residu B) i els protons H-3 (intens) i H-2 de l'heptosa D i el protó H-1 de l'heptosa E;
- entre el protó H-1 de la glucosa A i el protó H-4 (intens) del residu de glucosamina F;
- entre el protó H-1 de l'heptosa E i els protons H-1 i H-2 (ambdós intensos) del residu de galacturònic (residu B) i amb el H-1 (dèbil) de l'heptosa G;
- entre el protó H-1 de la glucosamina (residu F) i el protó H-4 (intens) del residu de galacturònic (residu B);
- entre el protó H-1 de l'heptosa G i el protó H-2 (intens) de l'heptosa E,
- entre el protó H-1 de la glucosa I i els protons H-2 i H-3 de l'heptosa C;
- entre el protó H-1 de la glucosa J i el protó H-6a,b (intens) del residu de glucosa A.

No es va poder identificar cap correlació NOE entre el protó anomèric H-1 dels residus d'heptosa D i C, probablement degut, en el cas del residu C, a que no es va trobar cap senyal de protó que es pogués assignar al residu de Kdo. No obstant, d'acord amb els valors de desplaçaments químics obtinguts en ^{13}C -RMN, el residu D podria substituir la posició O-3 del residu C. D'altra banda, considerant que les estructures de nucli intern del LPS estan força conservades entre els enterobacteris, es va creure que el residu C podria estar unit a un residu de Kdo, probablement a la posició O-5, que en l'oligosacàrid **1** no ha pogut ser identificat.

Les dades obtingudes van permetre proposar una estructura temptativa per l'oligosacàrid **1**, que es mostra a la Figura 4.9. Les ambigüitats que presentava aquesta estructura van poder ser en bona part superades gràcies a l'elucidació estructural de l'oligosacàrid **3**, que presentava la mateixa estructura però amb dos residus addicionals (veure secció 4.1.5.3 *Anàlisi de l'oligosacàrid 3*).

Taula 4.7. Dades de desplaçaments químics de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN obtingudes per l'oligosacàrid **1** derivat del LPS del mutant deficient en antigen O de *S. marcescens* N28b (N28b4) (*)

Residus	Desplaçaments químics							
	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6a C-6	H-7a/H-6b C-7	H-7b
B, α-GalA	5,47	4,05	4,22	4,44	4,51			
	99,3	73,7	62,6	80,1	72,6	176,5		
A, α-Glc	5,45	3,6	3,72	3,53	3,88	3,98	4,16	
	100,6	72,9	74,0	70,6	72,9	69		
C, α-Hep	5,08	3,97	4,20	4,22				
	97,64	69,6	76,2	73,5				
D, α-Hep	5,35	4,15	3,97	3,84	3,67	4,07	3,74	3,67
	102	71,2	81,2					
E, α-Hep	5,27	3,98	3,93	3,81				
	96,8	81,7	72	70				
F, α-GlcN	5,18	3,32	4,19	3,80	4,34	3,86	3,80	
	97,3	55,5	71,7	76,8	72,2	61,3		
G, α-Hep	5,04	4,03	3,84	3,81	3,68	4,03	3,69	3,62
	103,5	71,1	73,9	70,7	73,8			
I, β-Glc	4,52	3,29	3,49	3,39	3,42	3,75	3,88	
	103,9	74,7	76,9	71,1	77,3	63,6		
J, β-Glc	4,48	3,32	3,49	3,39	3,45	3,72	3,91	
	104,0	74,7	76,9	71,2	77,2	62,3		

(*) Els residus monosacàridics fan referència als que es mostren a la Figura 4.9. Els valors en negreta indiquen carbonis amb desplaçaments químics a camps més baixos dels valors estàndards, indicant la presència de substitucions o punts d'unió

Taula 4.8. Senyals NOE de l'oligosacàrid **1** observades a l'espectre NOESY*

Residus	Senyal	
	NOE de H1	Intra NOE
B, α-GalA	D3(i),D2,E1	B3
A, α-Glc	F4(i)	
D, α-Hep		D2,D3
E, α-Hep	B1(i),B2(i),G1(d)	
F, α-GlcN	B4(i)	F2
G, α-Hep	E2(i)	G2
I, β-Glc	C2,C3	I3
J, β-Glc	A6(i)	
C, α-Hep	Kdo 5(4,22),7 (3,96)?	

*) S'indiquen únicament els senyals més importants per la determinació de l'estructura. Els residus de monosacàrids corresponen als indicats a la Figura 4.9
i: intens; d:dèbil

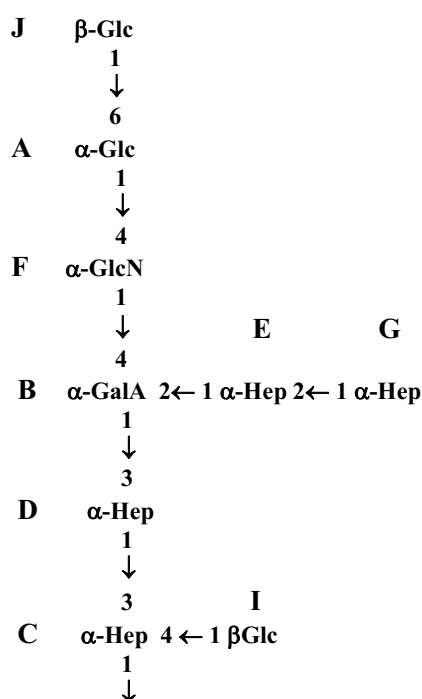


Figura 4.9. Estructura temptativa proposada per l'oligosacàrid **1** aïllat del LPS del mutant deficient en antigen O de *S. marcescens* N28b (N28b4)

Algunes ambigüitats van poder ser resoltes per comparació amb els resultats obtinguts per als experiments de RMN realitzats amb l'oligosacàrid **3** i que van permetre elucidar la seva estructura química

4.1.5.2 Anàlisi de l'oligosacàrid 2

L'oligosacàrid 2 es va analitzar per espectroscòpia de ^1H -RMN. L'espectre de ^1H -RMN realitzat a 600 MHz (veure Figura 4.10) va posar de manifest que aquest oligosacàrid era en realitat una mescla de compostos i això dificultava enormement la identificació dels diferents residus. Tot i així, en l'espectre de protó es van poder observar dos senyals que corresponien a protons β -anomèrics amb desplaçaments químics de 4,48 i 4,58 ppm, similars als dels protons anomèrics dels residus de β -glucosa I i J, respectivament, de l'oligosacàrid 1. A la regió α -anomèrica es van poder observar altres senyals, dues de les quals es van poder identificar com un residu d'hexosamina i un residu d'hexosurònic gràcies als experiments de ^1H -COSY. No obstant, les dades de l'espectre de ^1H -RMN suggerien que era una variant més petita de l'oligosacàrid 1, i de fet, els resultats de cromatografia de gasos van posar de manifest la presència de D,D-Hep únicament en quantitats residuals, a diferència dels altres dos oligosacàrids 1 i 3, on aquest residu es trobava en majors quantitats (veure secció 4.1.4 *Determinació de la composició en sucres dels oligosacàrids del nucli del LPS*). En conseqüència, com que l'oligosacàrid 2 no era un compost suficientment pur i d'altra banda, representava una variant més petita de l'oligosacàrid 1, l'estructura de l'oligosacàrid 2 no es va seguir estudiant.

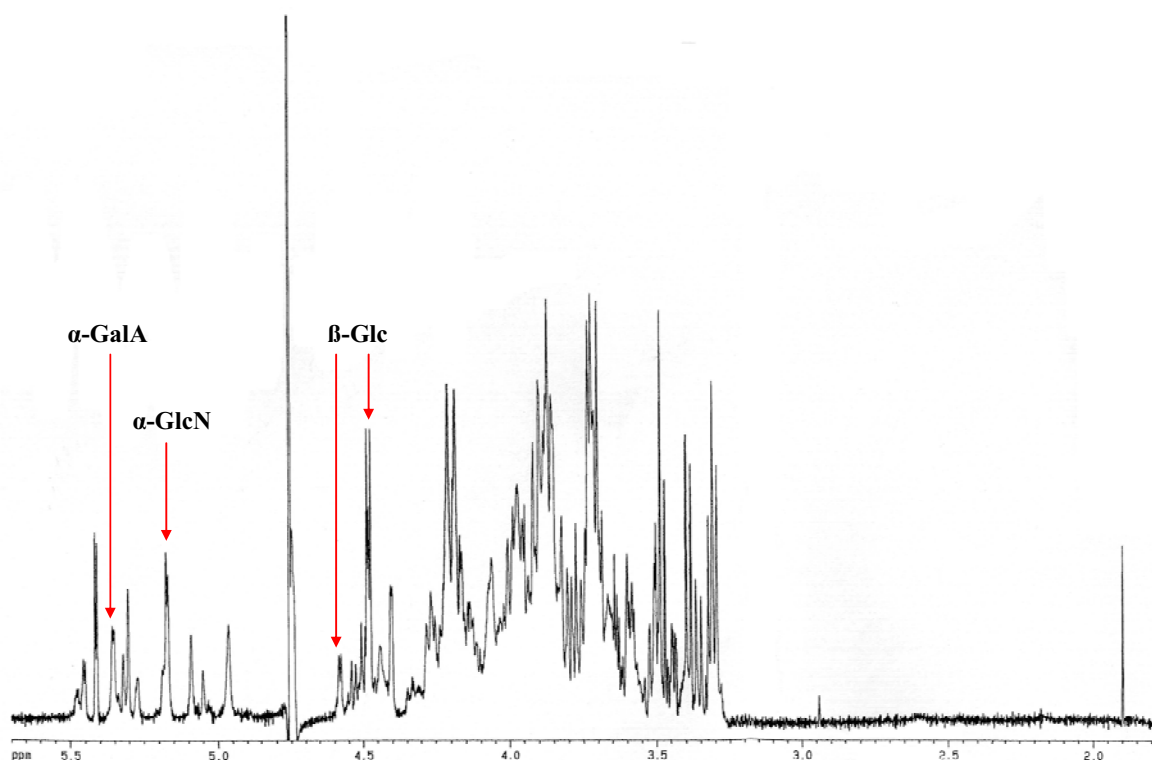


Figura 4.10. Espectre de ^1H -RMN de l'oligosacàrid 2 derivat del LPS del mutant deficient en antigen O de *S. marcescens* N28b (N28b4)

4.1.5.3 Anàlisi de l'oligosacàrid 3

L'estructura de l'oligosacàrid 3 pur es va caracteritzar en detall per espectroscòpia de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN, tal i com es descriu a continuació.

A la regió anomèrica de l'espectre de ^1H -RMN de l'oligosacàrid 3 s'hi van detectar 10 senyals amb proporcions comparables (veure Figura 4.11 i Taula 4.9). A més, s'hi van identificar senyals a la regió compresa entre 2,34 i 3,96 ppm, que corresponien a un residu deoxi i que es va designar com residu K. A part d'aquest residu K, tots els deu residus restants van poder ser perfectament identificats tant pels desplaçaments químics de protó i ^{13}C com pels sistemes d'acoblament que presentaven mitjançant l'aplicació d'experiments homonuclears de ^1H de correlació en dues dimensions (^1H -COSY, TOCSY, DQFCOSY, NOESY/ ROESY) i als experiments heteronuclears ^1H - ^{13}C de correlació bidimensional amb detecció de protó (HSQC/HMQC, HMBC). Al final d'aquesta subsecció, de la Figura 4.13 a la Figura 4.16 es mostren exemples dels experiments bidimensionals de correlació homonuclear i heteronuclear que es van realitzar sobre l'oligosacàrid 3 i que conduïren a la seva elucidació estructural.

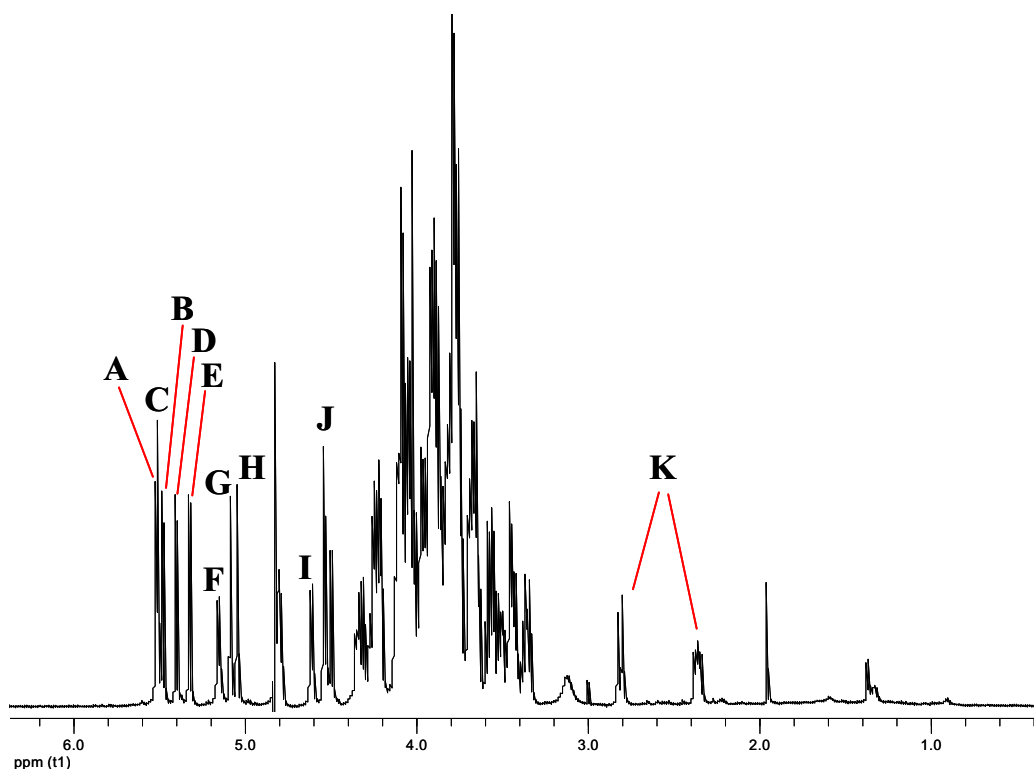


Figura 4.11. Espectre de ^1H -RMN de l'oligosacàrid 3 derivat del LPS del mutant deficient en antigen O de *S. marcescens* N28b (N28b4)

Les lletres es corresponen als residus monosacàridics indicats a la Figura 4.12 i indiquen el protó anomèric de cada residu

Taula 4.9. Dades dels desplaçaments químics de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN obtingudes per l'oligosacàrid **3** derivat del LPS del mutant deficient en antigen O de *S. marcescens* N28b (N28b4)^(*)

Residus	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6a C-6	H-7a/H-6b C-7	H-7b
B, α-GalA	5,45	4,08	4,25	4,49	4,53			
	100,1	74,0	68,8	80,3	71,96	175,7		
A, α-Glc	5,49	3,64	3,76	3,57	3,96	3,93	4,23	
	100,1	72,5	73,1	69,6	72,6	69,5		
C, α-L,D-Hep	5,47	4,08	4,11	4,3	3,82	4,11		
	101,6	70,7	73,0	75,2	72,5	69,6		
D, α-L,D-Hep	5,39	4,2	4,03	3,81	3,67	4,24	3,85	3,76
	101,8	70,8	80,0	66,2	73,9	68,7	69,9	
E, α-D,D-Hep	5,32	4,02	4,01	3,95	3,86	4,05		
	96,6	81,2	71,2	70,9	71,5	73,0		
F, α-GlcN	5,14	2,90	4,09	3,78	4,34	3,86	3,98	
	98,3	52,0	70,6	77,0	71,4	61,2		
G, α-Hep	5,08	4,07	3,89	3,88	3,73	4,07	3,78	3,75
	103,0	71,0	72,0	67,0	74,0	73,4	64,0	
H, α-L,D-Hep	5,04	4,06	3,91	3,94	3,67	4,1	3,82	3,74
	101,0	70,5	72,2	67,2	72,2	71,0	64,0	
I, β-Glc	4,61	3,34	3,56	3,4	3,44	3,77	3,93	
	103,9	73,6	76,2	70,9	77,2	62,5		
J, β-Glc	4,52	3,36	3,54	3,45	3,5	3,76	3,96	
	103,8	74,4	76,2	70,7	76,5	62,0		
K			2,34 _{ax} 2,81 _{eq}	3,96	3,88	3,65		
	180,4		42,0	74,6	75,6	78/76,8		

(*) Els residus monosacàridics fan referència als que es mostren a la Figura 4.12. Els valors en negreta indiquen carbonis amb desplaçaments químics a camps més baixos dels valors estàndards, indicant la presència de substitucions o punts d'unió

Els 11 senyals de l'oligosacàrid **3** van ser identificats com els següents residus: 5 heptoses (L,D o D,D), 3 hexoses, 1 hexosamina, 1 àcid hexosurònic i suposadament, un residu de Kdo amb alguna modificació (veure Taula 4.9). Així, respecte a l'oligosacàrid **1**, aquest oligosacàrid conté una heptosa addicional (residu H) i el residu K. Similar a l'oligosacàrid **1**, dos residus d'hexosa (J i I, veure Figura 4.11) presentaven la configuració β -*gluco*, tal com ens van indicar les dades dels desplaçaments químics dels protons anomèrics (veure Taula 4.9) i de les constants d'acoblament $J_{2,3}$ (veure Taula 4.10) mentre que la tercera hexosa (residu A) i el residu d'hexosamina (residu F) tenien la configuració α -*gluco*. Cal remarcar que els protons anomèrics de la α -glucosa (residu A) i de la α -glucosamina (residu F) presentaren desplaçaments químics molt similars que pràcticament foren indistingibles en l'espectre realitzat a 600 MHz però que gràcies a l'espectre de 800 MHz es van poder diferenciar. Igual que a l'oligosacàrid **1**, l'àcid hexosurònic es va identificar en configuració α -*galacto* mentre que a totes les heptoses, inclosa l'heptosa H, se'ls hi va assignar la configuració α -*manno*, atès a les baixes constants d'acoblament $J_{2,3}$ al voltant de 1 Hz. A la Taula 4.10 es mostren les constants d'acoblament $J_{2,3}$ obtingudes per a cada residu monosacàridic, que es van poder determinar gràcies a l'espectre de ^1H -RMN de 800 MHz. Tanmateix, l'espectre de 800MHz va permetre distingir algunes senyals fortament superposades, en particular, les del protó anomèric del residu J i el protó H-4 del residu B.

Convé destacar que malgrat l'elevat grau de superposició de senyals en la regió compresa entre 3,5 i 5,5 ppm, es van poder assignar la majoria de protons dels onze residus (veure Taula 4.9) i això fou possible gràcies a l'aplicació de predicció lineal i a l'adquisició d'espectres amb els equips de 600 MHz i 800 MHz. Així, els experiments de TOCSY amb diferents temps de mescla realitzats amb l'equip de 600 MHz van ajudar a clarificar l'ordre dels protons en cada residu. D'altra banda, l'experiment de DQFCOSY amb elevada resolució en F1 juntament amb l'efecte de l'increment del camp dut a terme amb l'equip de 800 MHz va facilitar la diferenciació dels protons dubtosos, particularment els de les posicions 5, 6 i 7. De la mateixa manera l'experiment de TOCSY realitzat amb l'equip de 800 MHz va ser de gran ajuda per superar les ambigüitats.

Taula 4.10. Valors obtinguts per a les constants d'acoblament $J_{2,3}$

Residus (*)	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
$J_{2,3}$ (Hz)	≈4	3,7	1,9	≈1	≈1	N.D.	1,8	1,6	7,8	8,1

(*) Les lletres es corresponen als residus monosacàridics indicats a la Figura 4.12

N.D: no determinat

Quant als residus d'heptosa, es van classificar en tres grups atenent als desplaçaments químics dels protons anomèrics i a les constants d'acoblament dels protons H-1, H-2, H-3 i H-4. Així, les heptoses G i H eren molt similars i tenien els protons anomèrics situats a camps alts. El protó anomèric de l'heptosa C és el que es trobà a camps més baixos mentre que els desplaçaments químics dels protons anomèrics de les heptoses D i E es situaren a posicions intermèdies, però més pròximes a les de l'heptosa C (veure Taula 4.9). Considerant que les heptoses que es troben a les posicions terminals (menys substituïdes) tenen els protons situats a camps relativament més alts que les que tenen major grau de substitució, es va proposar el següent grau de substitució per les heptoses: residu C > D,E > G,H, essent l'heptosa C candidata a ser un residu trisubstituit.

Respecte al residu K, les senyals que es van detectar a la regió compresa entre 2,34 i 3,96 ppm van permetre assignar-lo com un residu deoxi. Probablement, aquest residu K correspongui a un Kdo amb alguna modificació no identificada, ja que els desplaçaments químics dels protons de camp alt a 2,34 ppm i 2,81 ppm (suposadament dels protons H-3_{axial} i H-3_{equatorial}, respectivament) no són coincidents amb els publicats per als residus de Kdo piranosídics, que solen ser al voltant de 1,8-1,9 ppm pels H-3_{axial} i de 2,1-2,2 ppm pels H-3_{equatorial} (Bock *et al.*, 1992). No obstant, en l'espectre de ¹³C-RMN es va identificar un desplaçament químic d'un grup carbonil a 180,35 ppm que correlacionava amb el protó situat al desplaçament químic de 2,81. D'altra banda, les senyals d'aquest residu K amb desplaçaments químics de 2,34 ppm i 2,81 ppm són d'intensitat comparable amb les dels protons anomèrics dels altres residus i per consegüent, es considerà vàlida la suposició que aquest residu K formés part de l'oligosacàrid 3. A part d'aquestes senyals, es van detectar desplaçaments químics a 3,64, 3,87 i 3,96 ppm provinents d'altres protons d'aquest residu K. El fet que en l'experiment de HMBC s'observés correlació amb

protons d'altres residus, principalment del residu C, i que es detectessin NOEs, reforçà la suposició de que aquest residu K formés part de l'oligosacàrid **3**. Probablement, aquest residu K podia representar algun artefacte format a partir del residu de Kdo com a conseqüència de les condicions alcalines emprades per a la separació i aïllament de l'oligosacàrid **3** mitjançant HPAEC.

Els desplaçaments químics de ^{13}C -RMN s'assignaren a través dels experiments de HSQC/ HMQC basant-se en l'espectre de RMN de protó interpretat (veure Figura 4.16). En l'espectre de ^{13}C -RMN de l'oligosacàrid **3**, s'hi identificaren nou senyals anomèriques. No s'hi detectà cap senyal anomèrica, però sí un desplaçament químic probablement del C-3 d'un residu de Kdo modificat. També, es va observar la presència de senyals de ^{13}C -RMN amb desplaçaments químics a camps més baixos dels valors estàndards, que van indicar la presència de substitucions (punts d'unió) en les següents posicions: O-2 (del residu E), O-4 (del residu F), O-6 (del residu A), O-2 i O4 (del residu B), O-3 i O-4 (del residu C) i O-3 i O-7 (del residu D). Per als residus J, G, I i H no es van observar senyals amb desplaçaments químics a camps més baixos respecte als valors estàndard, i per tant, havien de correspondre a sucres terminals.

La determinació de la seqüència dels diferents residus es va realitzar en base als resultats de l'experiment de ROESY / NOESY, que es mostren a la Taula 4.11.

Taula 4.11. Senyals de NOEs/ROEs de l'oligosacàrid **3** observades a l'espectre NOESY / ROESY ^{a)}

Residu	Protó	Senyal	
		Interunitat	Intraunitat
B, α-GalA	B1	D3(i), D2(d), E1 (i)	B5(m)
	B5	D2	
A, α-Glc	A1	F4(i)	A3(i), A2(m)
	A6	J2(d)	
D, α-L,D-Hep	D1	C3/C6(i), C2(m), C4(m), B5(d)	D3(m), D2 (d), D7(d)
E, α-D,D-Hep	E1	B1(i), B2(i), B3 (m), G1(d), G5(i)	E1(i), E2(m)
F, α-GlcN	F1	B5(i), B4(d)	
G, α-Hep	G1	E2(i), E3(i)	G2(i), G3(d)
H, α-L,D-Hep	H1	D7(i), D6	H3(i), H2(i), H5(d)
I, β-Glc	I1	C6/C3(i), C2(d)	I5(i), I4(m), I3(m)
J, β-Glc	J1	A6(i), A5	J5(i), J4(m), J3(m)
C, α-L,D-Hep	C1	K 3,65 ppm(i), K 3,88 ppm(m)	
Kdo ^{b)}	2,811	C2, C4	

a) S'indiquen únicament els senyals que van ser importants per la determinació de l'estructura. Els residus de monosacàrids corresponen als indicats a la Figura 4.12. i: intens; m: mitjà; d: dèbil

b) Kdo amb alguna modificació desconeguda

Es varen identificar les següents correlacions NOEs / ROEs inter-residuals que foren importants per la determinació de la seqüència monosacàridica:

- entre el protó H-1 del residu de galacturònic (residu B) i els protons H-3 (intens) i H-2 de l'heptosa D i el protó H-1 de l'heptosa E;
- entre el protó H-1 de la glucosa A i el protó H-4 (intens) del residu de glucosamina F;
- entre el protó H-1 del residu d'heptosa D i els protons H-3 (intens), H-2 i H-4 del residu d'heptosa C;
- entre el protó H-1 de l'heptosa E i els protons H-1 i H-2 (ambdós intensos) del residu de galacturònic (residu B) i amb el H-1 (dèbil) de l'heptosa G;
- entre el protó H-1 de la glucosamina (residu F) i els protons H-4 (dèbil) i H-5 (intens) del residu de galacturònic (residu B);
- entre el protó H-1 de l'heptosa G i els protons H-2 i H-3 (ambdós intensos) de l'heptosa E,
- entre el protó H-1 de l'heptosa H i els protons H-7 (intens) i H-6 de l'heptosa D;

- entre el protó H-1 de la glucosa I i els protons H-2 (dèbil) i H-6 (intens) de l'heptosa C;
- entre el protó H-1 de la glucosa J i el protó H-6 (intens) del residu de glucosa A;
- entre el protó H-1 de l'heptosa C i els protons del putatiu residu deoxi (residu K)

Respecte al residu de β -glucosa I, no es va observar cap correlació NOE entre el seu protó anomèric i el protó H-4 del residu d'heptosa C, tot i que les dades dels desplaçaments químics de ^{13}C dels carbonis en posició C3 i C4 (73,0 i 75,2 ppm, respectivament) indicaven substitucions a les posicions O-3 i O-4 de l'heptosa C. No obstant, tenint en compte les dades genètiques i en homologia amb d'altres estructures de nucli de LPS d'altres enterobacteris com *Klebsiella pneumoniae* (Vinogradov i Perry, 2001; Regué *et al.*, 2005), *Yersinia pestis* (Vinogradov *et al.*, 2002a) o *Proteus penneri* (Vinogradov *et al.*, 2002b), es considerarà com a molt probable que el residu C estigués substituït a les posicions O-3 i O-4 pels residus D i I, respectivament. De la mateixa manera, per analogia amb d'altres estructures de nucli conegudes, el residu C molt probablement estaria unit al Kdo per la posició O-5.

En resum, les dades conjuntes dels experiments de ROESY/NOESY, dels desplaçaments químics de ^{13}C i dels resultats dels experiments de HMQC/HMBC van permetre determinar la seqüència i els punts o posicions d'enllaç entre els diferents residus i proposar així una estructura per l'oligosacàrid **3**, que s'indica a la Figura 4.12. Aquesta estructura concorda amb la proposada a partir de les dades de RMN per l'oligosacàrid **1**, amb la particularitat que l'oligosacàrid **3** és més complert ja que tindria dos residus més (residus K i H) que l'oligosacàrid **1**. L'estructura proposada per l'oligosacàrid **3** es considera perfectament assignada, a excepció de la part inferior corresponent a l'estructura parcial D-(I)-C, on l'assignació s'ha basat amb dades genètiques i amb l'homologia amb d'altres estructures conegudes. D'altra banda, cal remarcar que l'estructura del nucli intern és força conservada entre la majoria d'enterobacteris i que per tant, no caldria esperar variacions importants a l'estructura parcial D-(I)-C proposada.

En aquest treball no es va determinar la configuració absoluta dels monosacàrids però aquesta es va predir a partir de dades genètiques i per tant, s'ha de considerar temptativa. Tanmateix, la configuració D per als residus F, B, I es va deduir a partir de les complementacions satisfactòries dels mutants N28b Δ waaE i N28b Δ orf9-orf10 amb el gen

waaE i els *orf8* i *orf9* de *K. pneumoniae*, respectivament, i el coneixement de l'estructura del nucli del LPS de *K. pneumoniae* (veure secció 4.2.2.2 *ORF13(waaE)* i secció 4.2.2.3 *ORF9 i ORF10*, respectivament). D'altra banda, la configuració L,D per als tres residus d'heptosa del nucli intern (residus C, D i H) es va deduir a partir dels resultats dels anàlisis de composició del nucli intern del LPS del mutant N28bΔorf9- orf10 (veure secció 4.2.2.3 *ORF9 i ORF10*) juntament amb els resultats de complementació del mutant NC19 amb el gen *waaQ* de *S. marcescens* (veure secció 4.2.2.1 *ORF8 (waaQ)*). Els resultats obtinguts confirmaren la configuració L,D per aquests residus inicialment predita a partir de la comparació amb estructures conegudes de nucli intern d'altres enterobacteris. Finalment, la configuració D,D per al residu d'heptosa E es va proposar en base als resultats de composició obtinguts per al mutant N28bΔorf7 (veure secció 4.2.2.4 *ORF7 i ORF11*).

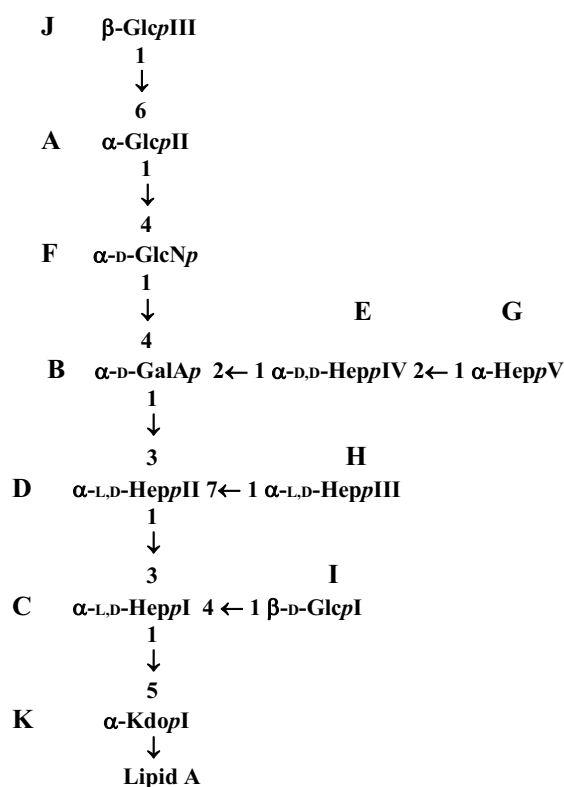


Figura 4.12. Estructura proposada per l'oligosacàrid 3 aïllat del LPS del mutant deficient en antigen O de *S. marcescens* N28b (N28b4)

La configuració D dels residus B, F i I va ser deduïda a partir de dades genètiques i per tant, s'ha de considerar temptativa. De la mateixa manera, l'estructura parcial D-(I)-C també s'ha de considerar temptativa. La configuració L,D per als residus C, D i H es va deduir a partir dels resultats de composició del LPS del mutant N28bΔorf9- orf10 juntament amb els resultats de complementació del mutant NC19 amb el gen *waaQ_{Sm}* i per tant, també és temptativa. Per al residu d'heptosa E, la configuració D,D es va predir a partir dels resultats de composició del mutant N28bΔorf7. La *p* indica que el residu és una piranosa

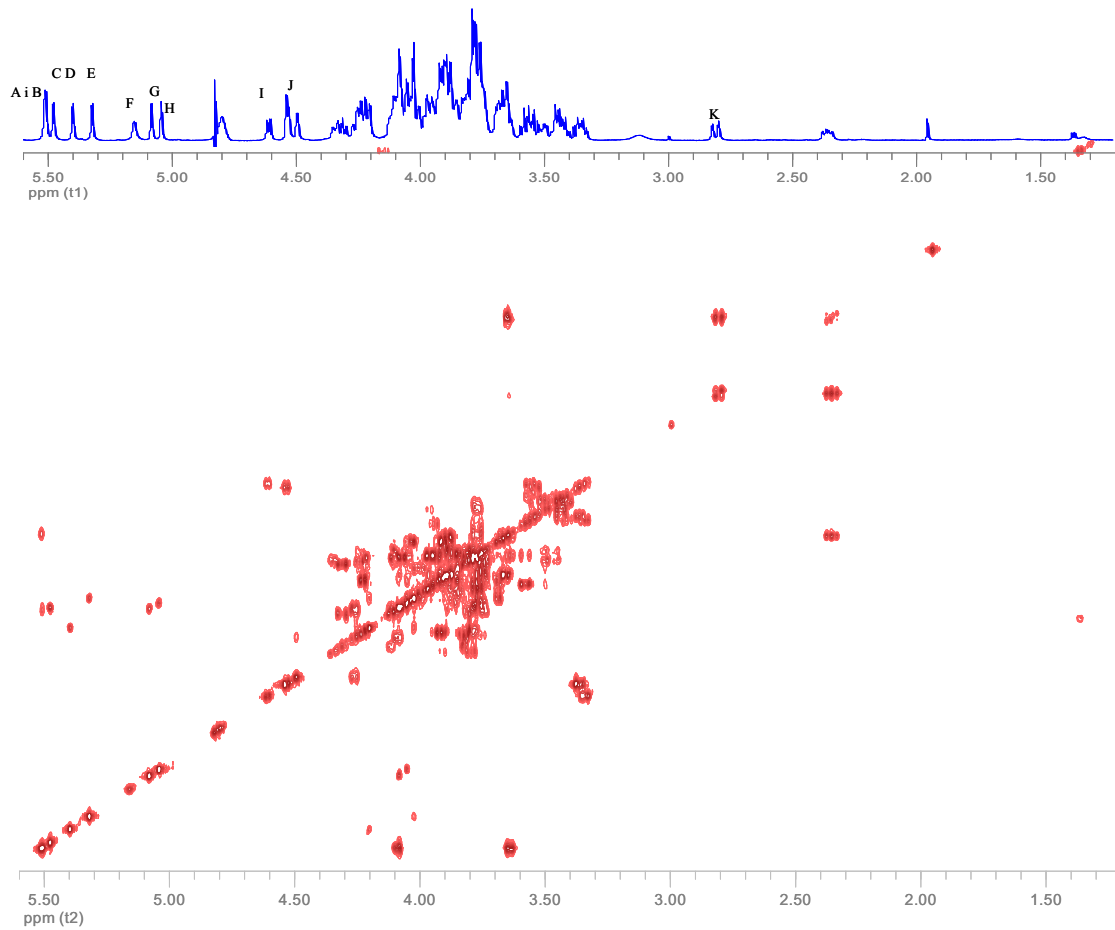


Figura 4.13. Experiment de 2D-COSY de l'oligosacàrid **3**

L'espectre de COSY proporciona informació sobre els acoblaments escalars, és a dir, els acoblaments J a través de l'enllaç $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (no de la seva magnitud). Així, cada pic de creuament (fora de la diagonal) en l'espectre de 2D-COSY indica una parella d'espins acoblats. Els pics de la diagonal corresponen a l'espectre de ^1H -NMR d'una dimensió

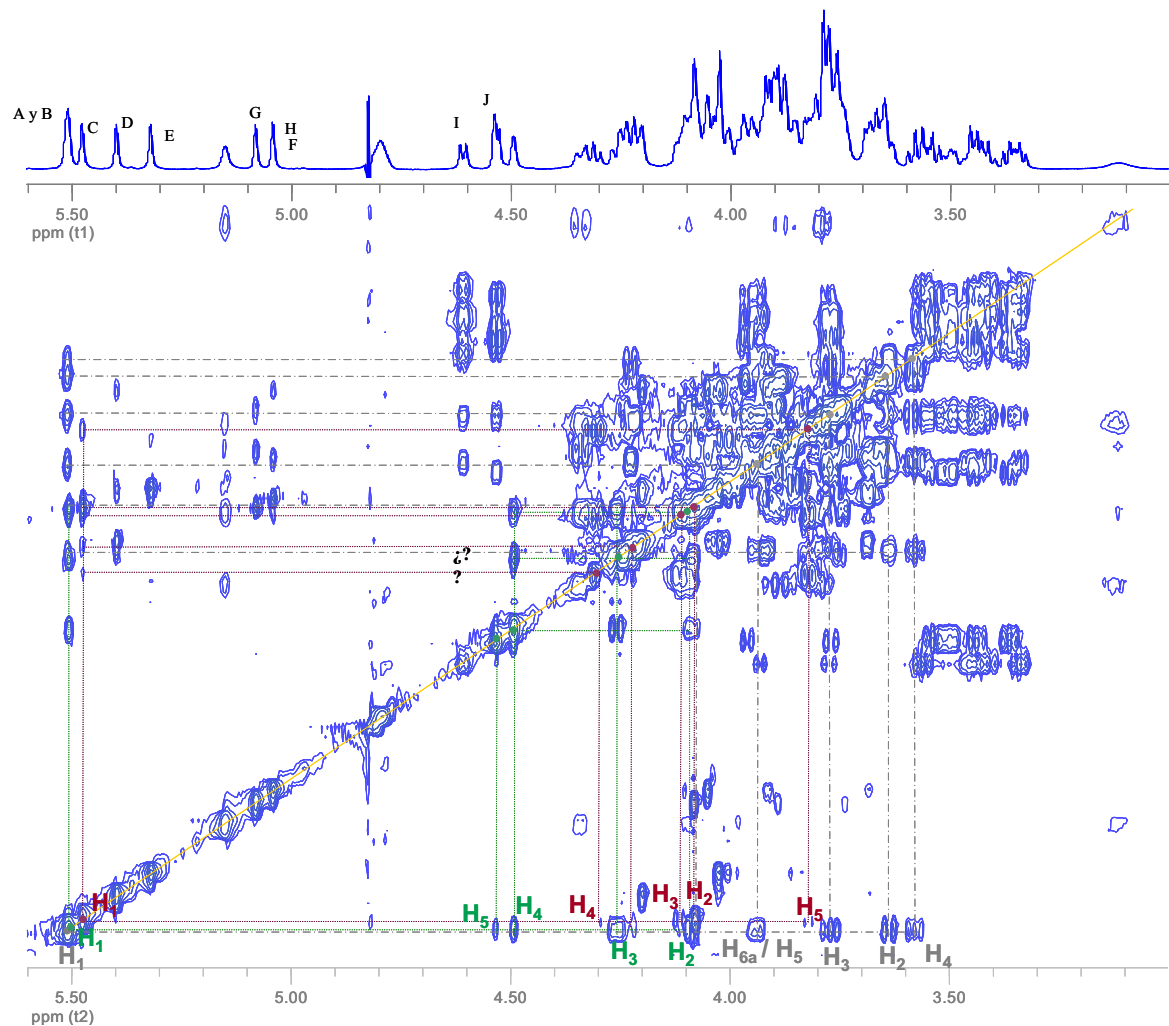


Figura 4.14. Experiment de TOCSY de l'oligosacàrid 3

L'experiment de TOCSY correlaciona tots els espins d'un mateix sistema d'acoblament, de manera que cada monosacàrid produeix el seu conjunt de pics TOCSY característic del seu propi sistema d'acoblament. En la figura es mostren en gris, el sistema d'acoblament del residu A (α -Glc); en verd, el sistema d'acoblament del residu B (α -GalA); i en granat, el sistema d'acoblament del residu C (α -L,D-Hep). A mode d'exemple, es mostren els pics de correlació entre cada protó anomèric dels residus indicats amb els diferents protons que formen part del mateix sistema d'acoblament (H2, H3, H4, H5 i H6)

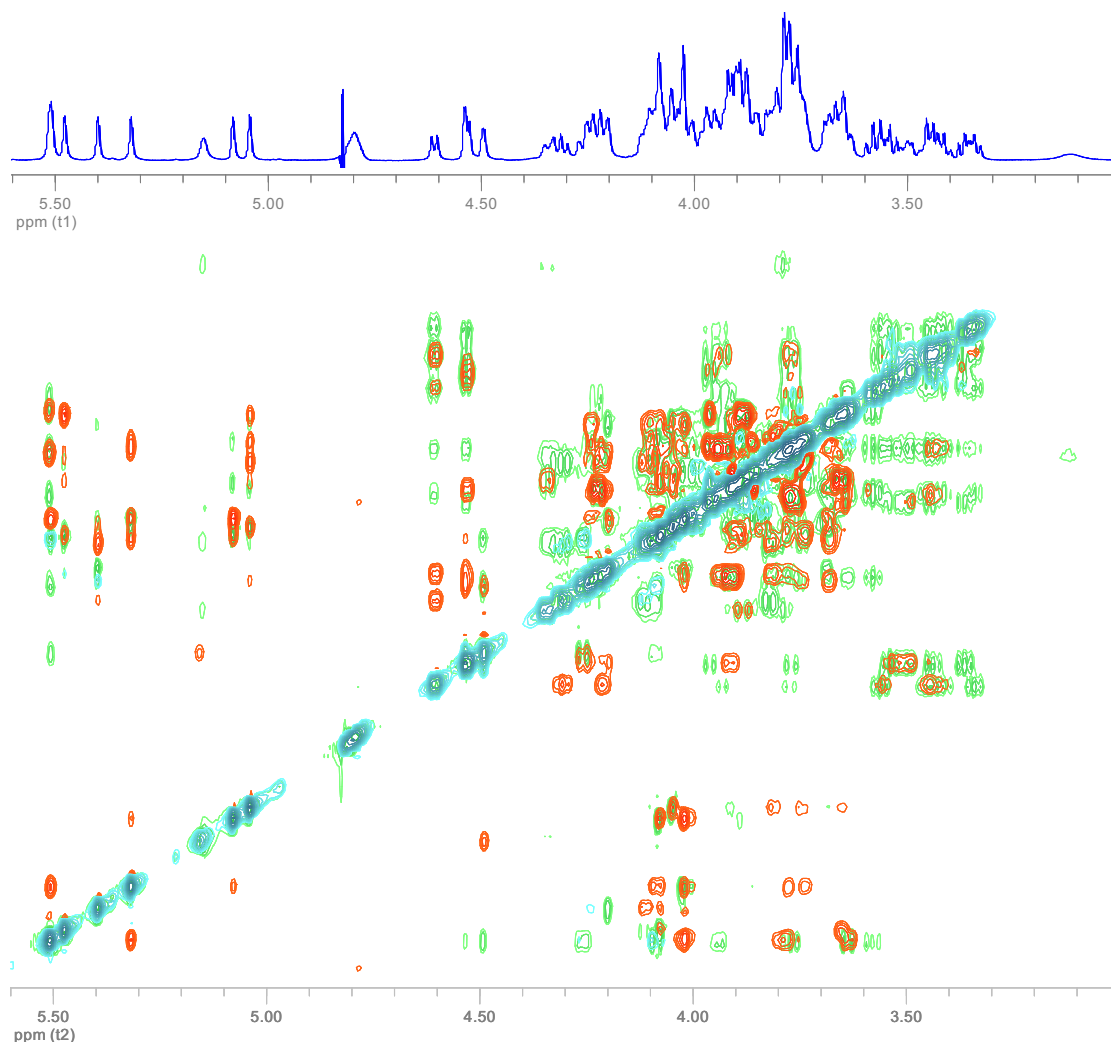


Figura 4.15. Experiment de 2D-ROESY / TOCSY de l'oligosacàrid **3**

En vermell i blau, es mostren els resultats de l'experiment de ROESY. En verd, es mostra l'experiment de TOCSY. En els experiments de NOESY, cada pic de creuament (fora la diagonal) correspon a una parella de protons, que ressonen a aquelles freqüències i que estan allunyats en l'espai a una distància inferior a 5 Å, mentre que els pics de la diagonal corresponen a l'espectre de $^1\text{H-NMR}$ d'una dimensió. L'experiment de 2D-ROESY realitzat sobre el TOCSY, com el que es mostra la figura, és particularment útil per obtenir informació de les distàncies entre protons en molècules amb pesos moleculars entre 1000 i 2000 Daltons ja que en aquests casos l'efecte NOE és molt petit o inclús nul. Pot passar que amb l'experiment ROESY els components d'una parella d'espins acoblats escalarment (a través de l'enllaç $^1\text{H-}^1\text{H}$) sentin un camp similar i donin lloc a l'aparició de pics TOCSY en els espectres ROESY. En aquest cas, la combinació ROESY / TOCSY permet diferenciar els pics ROE (correlacions a través de l'espai) dels TOCSY (correlacions a través d'enllaços)

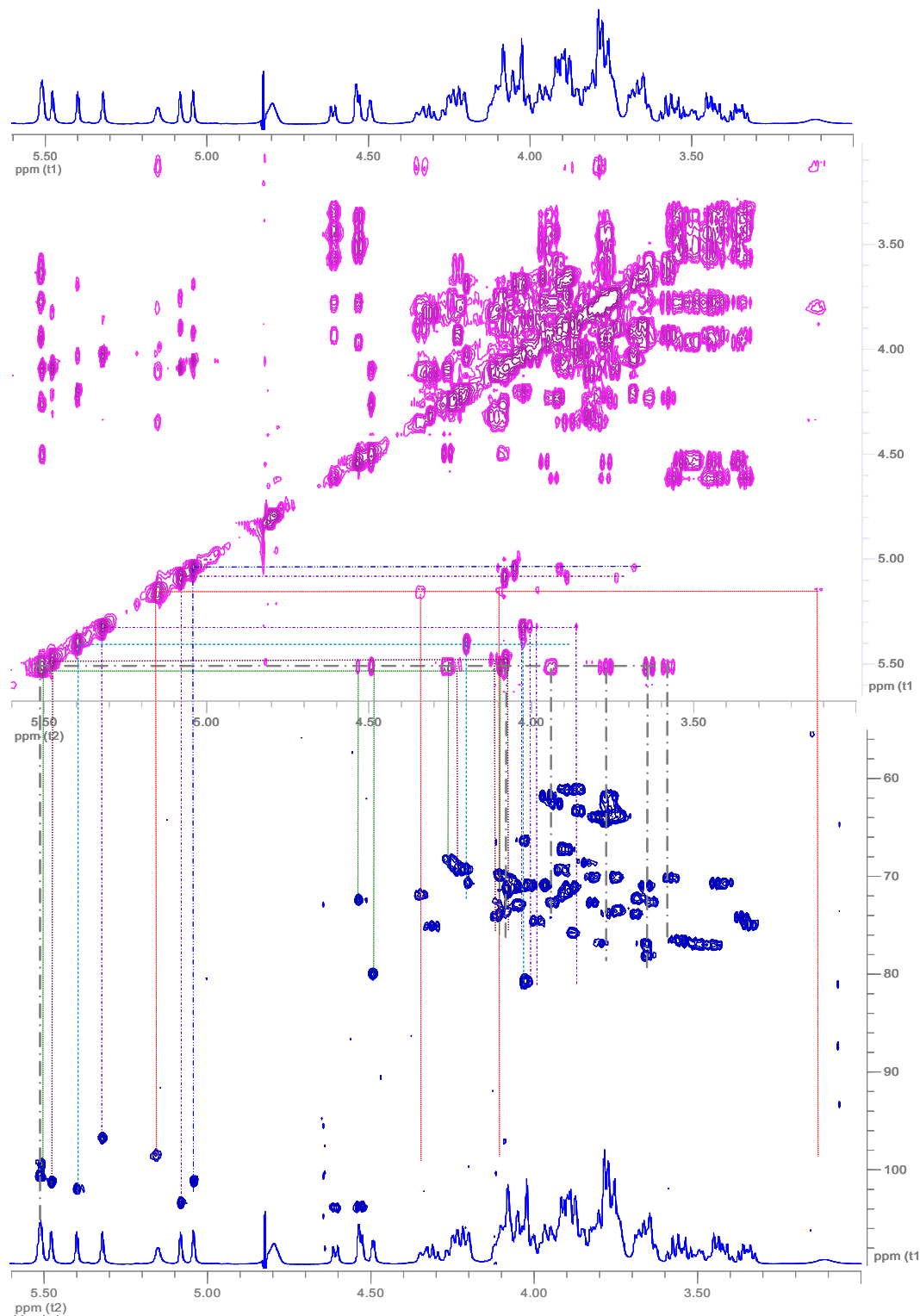


Figura 4.16. Experiment de HSQC / TOCSY de l'oligosacàrid 3

En rosa, es mostra l'espectre obtingut en l'experiment de TOCSY mentre que el blau correspon als resultats del HSQC. L'experiment de HSQC (igual que el HMQC) permet correlacionar els protons directament units al carboni, seleccionant les senyals de ^1H - ^{13}C (1%) i suprimint les de l'isotòpomer ^1H - ^{12}C (99%). A la figura es mostra la identificació de cadascun dels carbonis dels diferents residus a partir dels pics de correlació amb els protons als quals estan directament units i que han estat prèviament assignats gràcies a l'experiment de TOCSY

4.1.6 ANÀLISI PER ESPECTROMETRIA DE MASSES

Amb els resultats dels experiments de RMN i cromatografia de gasos es va poder proposar una estructura per l'oligosacàrid **3**, aïllat juntament amb l'oligosacàrid **1** i **2**, de la regió del nucli del LPS d'un mutant deficient en antigen O de *S. marcescens* N28b (N28b4). Aquests però no eren els únics oligosacàrids constituents de la regió del nucli del LPS d'aquesta soca, atès als resultats obtinguts durant la separació analítica de la fracció N28b4-B per cromatografia HPAEC, on es va observar la presència de varis pics que indicaven una mescla complexa d'oligosacàrids (veure secció 4.1.3 *Aïllament i purificació dels diferents oligosacàrids del nucli del LPS*).

Amb l'objectiu de comprovar que l'estructura química determinada per l'oligosacàrid **3** aïllat fos representatiu de la regió del nucli del LPS del mutant N28b4, la fracció N28b4-B corresponent a la regió del nucli del LPS d'aquest mutant (veure secció 4.1.2 *Separació i aïllament de les diferents fraccions del LPS extret*) es va estudiar per espectrometria de masses de ressonància d'ió ciclotró per transformada de Fourier i ionització per electrospai (ESI FT-ICR-MS), segons el mètode descrit a la secció 3.5.7 *Espectrometria de Masses*. A la Figura 4.17 es mostra l'espectre de masses obtingut després d'haver aplicat deconvolució de la càrrega, on es pot observar un patró complex de pics de diferents masses.

Així mateix, a la Taula 4.12 es mostra per a cadascun dels pics identificats a l'espectre de masses ESI FT-ICR, la massa molecular determinada així com la calculada (teòrica) a més de la composició química proposada per a cada pic.

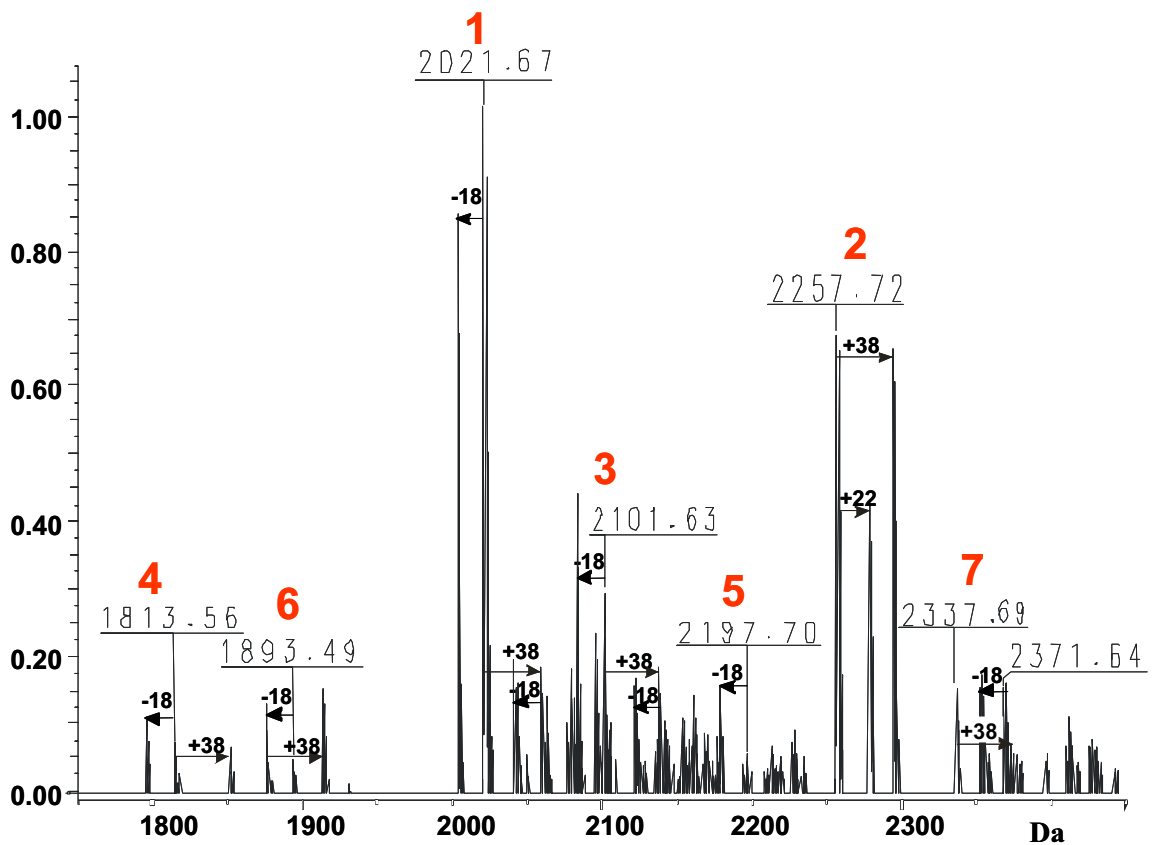


Figura 4.17. Espectre de masses ESI FT-ICR amb deconvolució de la càrrega obtingut per a la fracció N28b4-B

Aquesta fracció correspon a l'oligosacàrid del nucli aïllat a partir del LPS del mutant N28b4 després de la hidròlisi amb àcid acètic i la separació per cromatografia gel-filtració en columna Sephadex G-50. Els números de masses es refereixen a les masses moleculars monoisotòpiques de la molècula neutra. +22 Da i + 38 Da indiquen els adductes de sodi i potassi, respectivament. El -18 indica la forma anhidre

Taula 4.12. Masses moleculars identificades en l'espectre de masses ESI FT-ICR de la mostra N28b4-B, que correspon a la fracció del nucli del LPS del mutant N28b4 ^(a)

Nº pic	Massa molecular (Da)		Composició química proposada
	Identificada	Calculada ^(b)	
1	2.021,67	2.021,65	KdoHep ₅ Hex ₃ HexAHexN (oligosacàrid 3) Forma anhidra
	2.003,66	2.003,63	
2	2.257,72	2.257,71	KdoKoHep ₅ Hex ₃ HexAHexN (oligosacàrid 3 + un Ko)
3	2.101,63	2.101,61	KdoHep ₃ Hex ₃ HexAHexNP (oligosacàrid 3 + un P) Forma anhidra
	2.083,69	2.083,60	
4	1.813,56	1.813,55	KdoHep ₃ HexA ₂ Hex ₃ HexN Forma anhidra
	1.795,55	1.795,54	
5	2.197,70	2.197,68	KdoHep ₅ HexA ₂ Hex ₃ HexN (oligosacàrid 3 + un HexA) Forma anhidra
	2.179,68	2.179,67	
6	1.893,43	1.893,52	KdoHep ₃ HexA ₂ Hex ₃ HexNP Forma anhidra
	1.875,51	1.875,51	
7	2.337,69	2.337,68	KdoKoHep ₅ Hex ₃ HexAHexNP (oligosacàrid 3 + un residu de Ko i un residu P)

Kdo: àcid 3-deoxi-D-manno-oct-2-ulopiranosònic; Ko: àcid D-glicero-D-talo-oct-2-ulosònic; Hep: heptosa; Hex: hexosa; HexA; àcid hexosurònic; HexN: hexosamina; P: fosfat

- a) Es llisten únicament les masses moleculars monoisotòpiques de la molècula neutra. Els pics s'enumeren en ordre decreixent d'intensitat i els números que tenen assignats corresponen als que es mostren a la Figura 4.17. No es llisten els adductes de sodi i potassi (+22 Da i + 38 Da, respectivament) que s'observen a l'espectre de masses
- b) Pel càlcul teòric del pes molecular de cada oligosacàrid s'ha considerat les masses moleculars de cadascun dels monosacàrids individuals més una molècula d'aigua. Masses moleculars dels monosacàrids: HexN: 161,06 Da; Hex: 162,05 Da; HexA: 176,03 Da; Hep: 192,06 Da; Kdo: 220,05 Da; Ko: 236,06 Da

Tal i com s'observa a la Figura 4.17, el pic d'intensitat més elevada fou el de massa molecular 2.021,67 Da, que quadrava perfectament amb la massa molecular calculada per a una molècula com l'oligosacàrid 3 constituïda per un residu de Kdo, cinc residus d'heptosa, tres residus d'hexosa, un residu d'hexosurònic i un residu d'hexosamina (massa calculada de 2.021,65 Da). S'hi observà la presència d'un senyal intens a -18 amb massa molecular de 2.003,66 Da (massa calculada de 2.003,63 Da) que es va atribuir a la forma anhidra del Kdo de l'extrem reductor, ja que estava perfectament descrita la presència d'aquests senyals en mostres de LPS hidrolitzades en presència d'àcid acètic (Oltshoorn *et al.*, 1999). Per consegüent, es va poder afirmar que l'oligosacàrid 3 representava el compost més abundant dins la mescla heterogènia d'oligosacàrids que conformen la regió del nucli del LPS del mutant N28b4.

A banda d'aquests dos pics descrits, s'obtingueren altres, que es van assignar a espècies moleculars variants de l'oligosacàrid **3** que presentaven les següents modificacions:

- substitució per un residu addicional d'àcid *D-glicero-D-talo*-oct-2-ulosònic (Ko), en el cas del pic 2 de la Figura 4.17 (massa de 2.2257,72 Da),
- substitució per un residu addicional d'àcid hexosurònic, en el cas del pic 5 de la Figura 4.17 (massa de 2.197,70 Da),
- pèrdua de dos residus d'heptosa però amb la substitució d'un residu addicional d'àcid hexosurònic, en el cas del pic 4 de la Figura 4.17 (massa de 1.813,56 Da).

A més, dels pics 1, 2 i 4 es van identificar espècies amb una massa molecular de +80 Da, que corresponien als pics 3, 7 i 6, respectivament, que podrien representar derivats monofosforilats. No obstant, no es va aïllar cap d'aquestes espècies moleculars que representen variants de l'oligosacàrid **3**.

En general, les dades obtingudes per espectrometria de masses suggereixen que la regió del nucli del LPS del mutant deficient en antígen O de *S. marcescens* N28b estaria formada majoritàriament per l'oligosacàrid **3**, l'estructura del qual s'ha caracteritzat en aquest treball (veure Figura 4.12), el qual podria presentar algunes substitucions no-estequiomètriques amb un segon residu d'àcid hexosurònic o un residu de Ko. En aquest sentit, cal destacar que en els anàlisis de GC-MS realitzats sobre les mostres de LPS sencer tant del mutant deficient en antígen O (N28b4) com de la soca salvatge *S. marcescens* N28b es van detectar quantitats molt baixes de Ko i a més, en la mostra de N28b4 es va identificar la presència en molt baixes quantitats d'una estructura del tipus Ko-O-Kdo (veure secció 4.1.1 *Caracterització del LPS extret*). Aquests resultats estarien en concordança amb els resultats d'espectrometria de masses. D'altra banda, el fet que s'identifiqués una espècie molecular amb dos residus d'heptosa menys que l'oligosacàrid **3** podria també indicar que aquests dos residus corresponen a substitucions no-estequiomètriques.

4.1.7 COMPARACIÓ DE L'ESTRUCTURA DEL NUCLI DEL LPS DEL MUTANT N28b4 AMB EL DE LA SOCA SALVATGE

Com s'ha vist a les anteriors seccions, l'elucidació de l'estructura del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b O4 es va realitzar a partir d'un mutant d'aquesta soca deficient en antigen O (mutant N28b4), obtingut prèviament en el nostre grup d'investigació (Saigi *et al.*, 1999). La utilització d'aquest mutant facilità l'aïllament de la regió del nucli en quantitat suficient per als estudis estructurals.

A fi de corroborar que l'estructura de nucli proposada en aquest treball a partir dels resultats obtinguts en l'anàlisi estructural del LPS del mutant deficient en antigen O (N28b4) era extrapolable a la soca salvatge *S. marcescens* N28b, es va aïllar la regió del nucli de la soca salvatge per a estudiar la seva composició, el seu perfil cromatogràfic en HPAEC i el patró de pics per espectrometria de masses ESI FT-ICR.

En primer lloc, es va extraure LPS de la soca salvatge *S. marcescens* N28b i es va analitzar la seva composició, tal i com s'ha descrit prèviament a la secció 4.1.1 *Caracterització del LPS sencer*. Aquests estudis van posar de manifest que el LPS de la soca salvatge tenia la mateixa composició qualitativa que el LPS del mutant N28b4, amb l'excepció que aquest últim no presentava residus de ramnosa. Aquest resultat era totalment lògic si es té en compte que la ramnosa, juntament amb la glucosa, són els dos constituents de les subunitats de repetició de l'antigen O del LPS d'aquest bacteri.

Per a separar la regió polisacàridica del lípid A, s'agafaren 150 mg de LPS extret de la soca salvatge i s'hidrolitzaren amb àcid acètic al 1% a 100°C durant 90 minuts seguint el procediment descrit a la secció 3.5.5.1 *Hidròlisi amb àcid acètic*. Prèviament, però, s'havia realitzat una hidròlisi a petita escala per a comprovar que les condicions eren adequades per aquesta mostra. Com a resultat de la hidròlisi, s'obtingueren 76,5 mg de sobrenedant (51% del total), que corresponia a la fracció polisacàridica. Seguidament, per a aïllar la fracció del nucli de la resta de fraccions, es van aplicar els 76,5 mg de sobrenedant (en dos parts) a una columna Sephadex G-50 segons el procediment descrit a la secció 3.5.5.2.1 *Cromatografia per gel-filtració*. S'obtingué el cromatograma que es mostra a la Figura 4.18, on es poden observar tres pics, que s'anomenaren N28b-A, N28b-B i N28b-C, dels quals s'obtingueren les següents quantitats: 29,8 mg, 28,3 mg i

18,3 mg, respectivament. Les tres fraccions donaren resultats positius en capa fina. Considerant el perfil cromatogràfic que se sol obtenir per un LPS de tipus S, la primera fracció N28b-A, que era la dels oligosacàrids de major pes molecular, havia de correspondre a l'oligosacàrid del nucli unit a l'antigen O; la fracció N28b-B havia d'incloure l'oligosacàrid del nucli i finalment, la fracció N28b-C havia de correspondre a monosacàrids o disacàrids generats durant la reacció d'hidròlisi. Tanmateix, si es comparen els perfils cromatogràfics obtinguts en Sephadex G-50 per a les mostres de LPS del mutant N28b4 (veure Figura 4.5) amb el de la soca salvatge (veure Figura 4.18) després de la hidròlisi suau amb àcid acètic, es pot observar que en la soca salvatge el pic corresponent a la primera fracció, que correspon a l'oligosacàrid del nucli unit a l'antigen O, és similar a la resta de fraccions mentre que en el mutant N28b4, com no presenta antigen O, el pic corresponent a la primera fracció és molt minoritari.

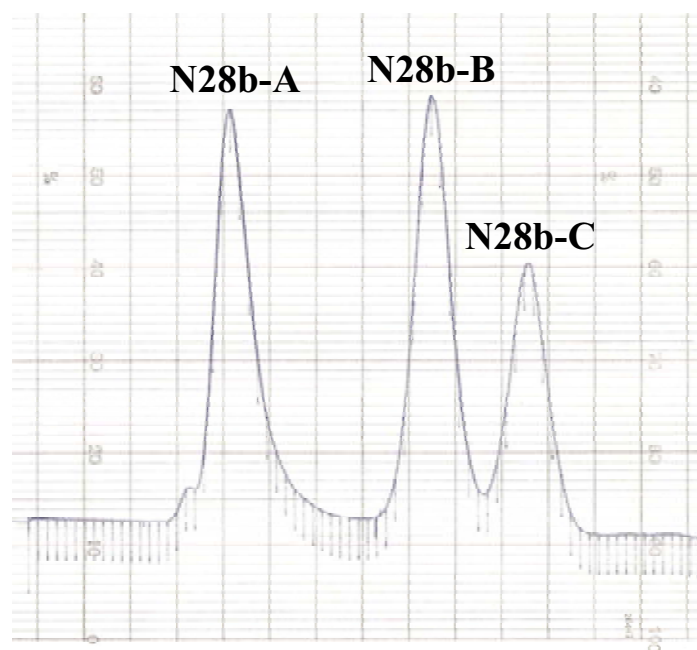


Figura 4.18. Cromatograma obtingut per cromatografia de gel-filtració en columna Sephadex G-50 després de la hidròlisi amb àcid acètic del LPS de la soca salvatge *S. marcescens* N28b

Seguidament, es va analitzar per cromatografia de gasos i colorimetria la composició de la fracció N28b-B, corresponent a la regió del nucli del LPS de la soca salvatge, seguint els mètodes descrits anteriorment (veure secció 3. *Materials i mètodes*). Com era d'esperar, els resultats obtinguts van evidenciar que la regió del nucli de la soca salvatge presentava la mateixa composició qualitativa que la del mutant N28b4, detectant-s'hi la

presència de glucosa, àcid galacturònic, D,D-heptosa, L,D-heptosa i Kdo (el contingut en glucosamina i fosfat no es va determinar). En termes quantitius, la proporció dels diferents residus monosacàridics fou similar en ambdues mostres, tot i que en general, la concentració per a cadascun dels residus fou més elevada en la mostra procedent de la soca salvatge. En la Taula 4.13 es mostren els resultats obtinguts per ambdues mostres.

Taula 4.13. Composició en sucres de les fraccions N28b4-B i N28b-B corresponents a la regió del nucli del LPS del mutant deficient en antigen O i de la soca salvatge, respectivament

	Concentració nmols / mg fracció						
	Rha	Glc	Gal	GalA	L,D-Hep	D,D-Hep	Kdo _{HCl}
N28b4-B	N.D.	400	N.D.	30	233	78	174
N28b-B	20	497	>0	71	352	107	215

N.D.: no detectat

A continuació, es va analitzar la regió del nucli del LPS de la soca salvatge per cromatografia d'intercanvi iònic d'alta resolució (HPAEC), segons el descrit a la secció 3.5.5.2.2 *Cromatografia d'intercanvi iònic d'alta resolució (HPAEC)* i es va comparar el seu perfil cromatogràfic amb el de la mostra N28b4-B derivada del mutant deficient en antigen O. Per això, s'injectaren 60 µg de la fracció N28b-B en una columna CarboPacTM PA-100 (4 x 250 mm, Dionex Corp.) en les mateixes condicions analítiques que les emprades anteriorment per a la mostra N28b4-B (gradient lineal de 15% a 40% de 1M NaAc en 0,1M NaOH durant 70 minuts i a un flux de 1 ml/min) (veure secció 4.1.3 *Aïllament i purificació dels diferents oligosacàrids del nucli del LPS*). A la Figura 4.19 es mostra el cromatograma obtingut per a la separació de la mostra N28b-B per cromatografia HPAEC així com també el cromatograma obtingut en les mateixes condicions analítiques per a la mostra N28b4-B, amb l'objectiu de facilitar la comparació d'ambdós perfils cromatogràfics. Tal i com es pot observar, el perfil cromatogràfic de la mostra corresponent a la regió del nucli del LPS de la soca salvatge és superposable amb el de la regió del nucli del mutant deficient en antigen O, demostrant així que la regió del nucli del LPS de la soca salvatge presenta la mateixa heterogeneïtat que la del mutant deficient en antigen O.

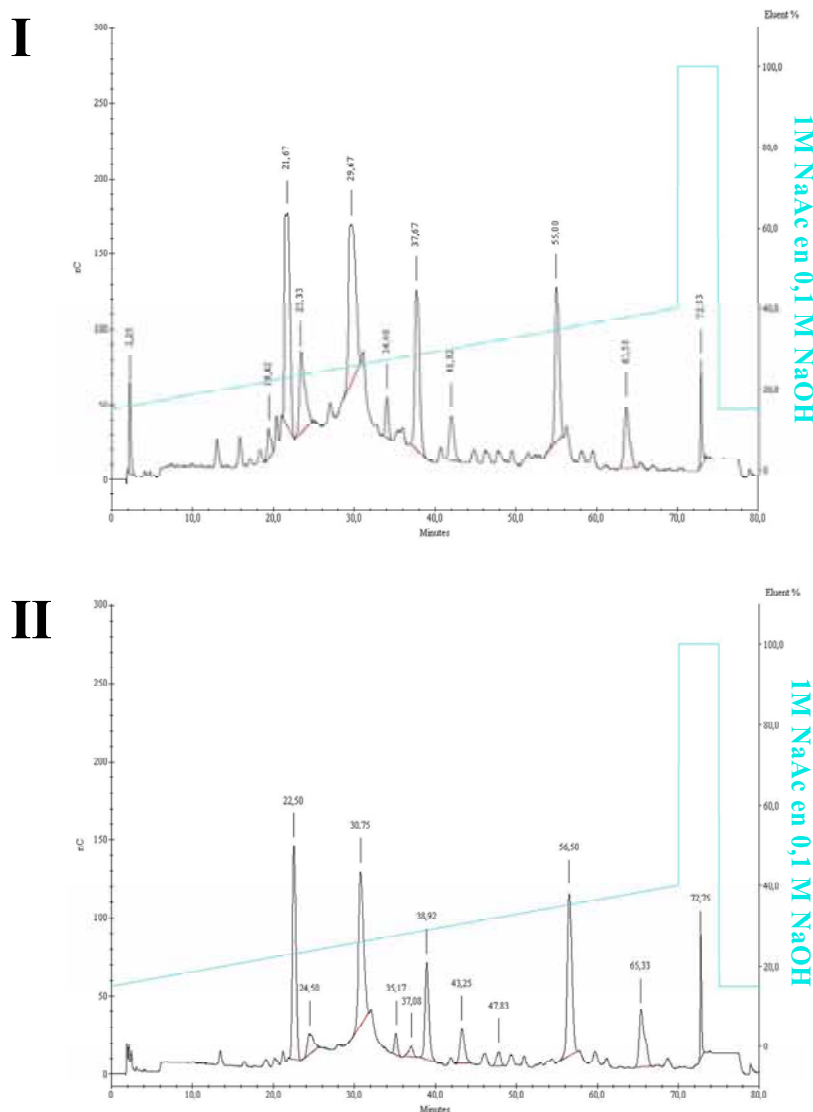


Figura 4.19. Cromatogrames obtinguts per a la separació de les mostres N28b-B (I) i N28b4-B (II) per cromatografia HPAEC en una columna CarboPac™ PA-100 (4 x 250 mm, Dionex Corp.) amb un gradient de lineal de 15% a 40% de 1M NaAc en 0,1M NaOH durant 70 minuts a un flux 1 ml/min

Finalment, la fracció N28b-B corresponent a la regió del nucli del LPS de la soca salvatge *S. marcescens* N28b es va analitzar per espectrometria de masses de resonància d'ió ciclotró per transformada de Fourier i ionització per electrospai (ESI FT-ICR-MS), segons el mètode descrit a la secció 3.5.7 *Espectrometria de Masses*. L'espectre de masses amb deconvulació de la càrrega obtingut per a la mostra N28b-B (veure Figura 4.20) mostrarà el mateix patró de pics que l'obtingut prèviament per a la mostra N28b4-B (veure secció 4.1.6 *Anàlisi per espectrometria de masses*), però a més hi aparegueren dos pics addicionals de baixa intensitat amb masses moleculars de 1.637,53 i 1619,52 Da, que quadraven perfectament amb la massa molecular calculada

per a una molècula com l'oligosacàrid **3** menys dos residus d'heptosa, i la seva forma anhidra, respectivament (masses calculades de 1.637,53 i 1.619,51 Da, respectivament). En conseqüència, es va poder afirmar que tant el LPS de la soca salvatge com el del mutant deficient en antigen O (N28b4) comparteixen la mateixa estructura de nucli.

En definitiva, el conjunt d'anàlisis (composicionals, HPAEC, ESI FT-ICR-MS) realitzats sobre la regió del nucli del LPS de la soca salvatge *S. marcescens* N28b van permetre afirmar que l'estructura d'aquesta regió és compartida amb la del mutant N28b4, que fou l'utilitzat per als estudis estructurals. Per tant, l'estructura proposada per al nucli del LPS del mutant N28b4 és perfectament vàlida com a estructura de nucli del LPS de la soca salvatge *S. marcescens* N28b.

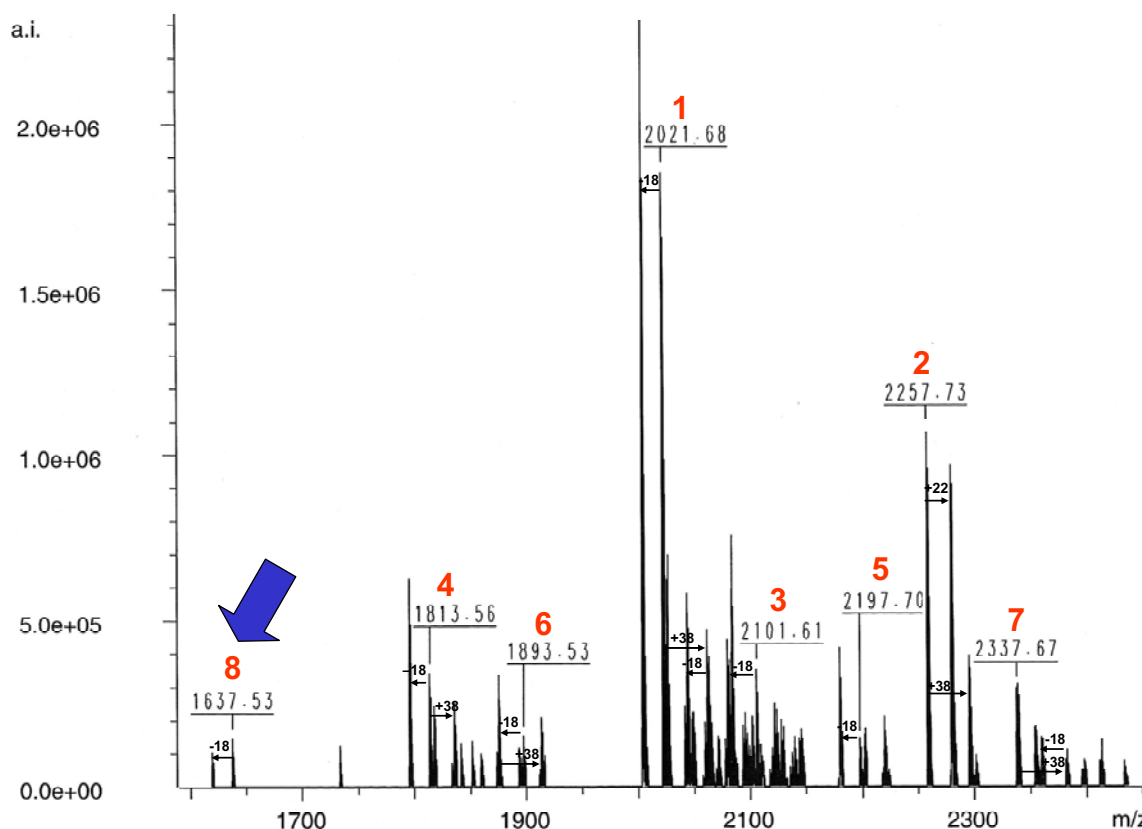


Figura 4.20. Espectre de masses ESI FT-ICR amb deconvolució de la càrrega obtingut per a la fracció N28b-B

Aquesta fracció correspon a l'oligosacàrid del nucli aïllat a partir del LPS de la soca salvatge *S. marcescens* N28b després de la hidròlisi suau amb àcid acètic i la separació per cromatografia gel-filtració en columna Sephadex G-50. Els números corresponen als mateixos pics identificats per a la mostra N28b4-B (veure Figura 4.17 i Taula 4.12). Amb la fletxa blava s'assenyalen els dos pics addicionals que no van aparèixer a l'espectre de masses ESI FT-ICR de la mostra N28b4-B. Els números de masses es refereixen a les masses moleculars monoisotòpiques de la molècula neutra. Amb +22 Da i +38 Da s'indiquen els adductes de sodi i potassi, respectivament. Amb -18 s'indica la forma anhidre

4.2 CARACTERITZACIÓ DELS GENS IMPLICATS EN LA BIOSÍNTESI DEL NUCLI DEL LPS DE *S. marcescens* N28b O4

Treballs previs realitzats en el nostre grup de recerca havien permès assignar una funció als gens de l'agrupació *waa* de *S. marcescens* N28b que eren compartits amb d'altres enterobacteris (veure secció 2.1 *Antecedents: Bases per a l'establiment dels objectius*). Per a assignar una funció a la resta de gens de l'agrupació *waa* pels quals no s'havia pogut establir una funció definitiva a través de l'estudi d'homologia de seqüències es va optar per emprar una aproximació força habitual que consisteix en la generació de mutants per deleció d'aquests gens i observar els canvis fenotípics que es produeixen. Així, la comparació de l'estructura o composició química dels mutants respecte a la soca salvatge hauria de permetre establir la funció per cadascun d'aquests gens.

4.2.1 CONSTRUCCIÓ DE MUTANTS EN DIVERSOS GENS DE L'AGRUPACIÓ *waa* DE *S. marcescens* N28b

Per mitjà d'una tècnica de mutagènesi dirigida descrita per Link *et al.*, 1997 es van construir mutants per delecions en sis gens de l'agrupació gènica *waa* de *S. marcescens* N28b, concretament en els *orf4*, *orf7*, *orf8* (putatiu *waaQ*), *orf9-orf10* i *orf13* (putatiu *waaE*) i que es varen anomenar N28b Δ orf4, N28b Δ orf7, N28b Δ waaQ, N28b Δ orf9-orf10 i N28b Δ waaE. En tots els casos, es va comprovar la deleció per seqüenciació.

La tècnica que es va utilitzar (explicada a la secció 3.4.12 *Tècniques de Mutagènesi*) permet crear delecions cromosòmiques dirigides en el gen a mutar mantenint la seva pauta de lectura, per la qual cosa s'eviten els possibles efectes polars que la mutació pot provocar sobre l'expressió dels gens distals dins d'un mateix operó. Breument, el sistema de mutagènesi emprat es basa en la síntesi *in vitro* d'una còpia delecionada del gen a mutar que respecti la seva pauta de lectura mitjançant PCRs entrecruades i posteriorment aquesta còpia delecionada és introduïda en el cromosoma per doble recombinació mitjançant el plasmidi pKO3. La capacitat de replicació del vector pKO3 és sensible a la temperatura, de manera que a temperatures no permissives (42°C), les cèl·lules no poden mantenir el plasmidi a no ser que l'integrin en el cromosoma per recombinació homòloga entre el fragment clonat i el cromosoma bacterià. L'efecte de la temperatura en els nostres experiments de mutagènesi fou important i es manifestà per

una freqüència d'integració, definida com el quocient del nombre de colònies a 42°C i el nombre de colònies a 30°C, al voltant de 10^{-5} - 10^{-6} UFCs. Quan les cèl·lules es fan créixer a 30°C, el plasmidi es pot escindir del cromosoma i depenent del punt d'entrecruament, el cromosoma pot retenir la seqüència salvatge del gen o bé la seqüència delecionada. Gràcies al gen *sacB* que porta com a marcador de contraselecció el vector pKO3, es pot seleccionar la pèrdua del plasmidi, ja que aquest gen és letal quan s'expressa en bacteris gramnegatius que creixen en presència de sacarosa.

Abans d'iniciar els experiments de mutagènesi amb *S. marcescens* N28b, es van fer una sèrie d'experiments per tal de posar a punt la tècnica, assegurant el correcte funcionament del vector pKO3 (Link *et al.*, 1997) en aquesta soca. Aquests experiments van consistir en determinar la idoneïtat de l'antibiòtic cloramfenicol per assegurar la integració cromosòmica del plasmidi, determinar si 42°C és una temperatura d'incubació adequada per impedir la replicació del plasmidi però al mateix temps permet el correcte creixement de *S. marcescens* i comprovar que la concentració de sacarosa 5%, proposada per Link *et al.*, 1997, és adequada en el cas de *S. marcescens* N28b.

Com a resultat d'aquests experiments, es va comprovar que *S. marcescens* N28b era resistent al cloramfenicol inclús a concentracions molt elevades (220 µg/ml). Per evitar problemes i tenir un bon marcador per seguir el manteniment del plasmidi es va decidir buscar un altre marcador de resistència. Es va comprovar que *S. marcescens* N28b és sensible a kanamicina, a una concentració de 50 µg/ml, i conseqüentment, es va fixar aquesta concentració de kanamicina per als experiments de mutagènesi. Això va comportar la necessitat d'introduir un casset de kanamicina en el plasmidi pKO3 (Link *et al.*, 1997) i generar el plasmidi pKO3Km (veure secció 4.2.1.1 *Construcció del plasmidi pKO3Km*). Pel que fa a la temperatura d'incubació per impedir la replicació del plasmidi pKO3Km, es va establir en 41-42°C, ja que permet el creixement correcte de *S. marcescens* N28b. Respecte a la concentració de sacarosa per a la contraselecció, es va elegir una concentració de 10%, més elevada que la proposada per Link *et al.*, 1997, ja que en els experiments preliminars va donar millors resultats.

4.2.1.1 Construcció del plasmidi pKO3Km

El plasmidi pKO3Km es va generar a partir de la introducció del casset de resistència a l'antibiòtic kanamicina al vector pKO3 (Link *et al.*, 1997), respectant els elements claus de funcionalitat del vector pKO3 per a la substitució gènica en els experiments de mutagènesi, com són:

- el marcador de contraselecció, *sacB* de *Bacillus subtilis*
- l'origen de replicació sensible a la temperatura Rep A (del vector pSC101)

El vector pKO3 conté una zona amb múltiples dianes de restricció o “polilinker”, que conté dianes per als enzims de restricció *SmaI*, *NotI*, *BamHI* i *Sall*. La diana *Sall* va ser l'escollida per a la introducció del gen *Kan*, que confereix resistència a la kanamicina.

L'obtenció del gen *Kan*, de 1,24 kb, s'aconseguí per digestió del plasmidi pUC4K, de 3.966 pb (GE Healthcare, anteriorment Amersham Biosciences) amb *Sall*. Un cop digerit, el gen *Kan* es va lligar amb el vector pKO3, prèviament digerit amb *Sall* i desfosforilat per tractament amb fosfatasa alcalina. Posteriorment, la lligació es va electroporar a *E. coli* DH5 α per a obtenir el plasmidi pKO3Km i es comprovà que contingués l'insert (casset de resistència a la kanamicina) i seguís mantenint les propietats del plasmidi pKO3 requerides per als experiments de mutagènesi.

A la Figura 4.21 es presenta un esquema del plasmidi pKO3Km, construït en aquest treball, i que va ser utilitzat per als experiments de mutagènesi.

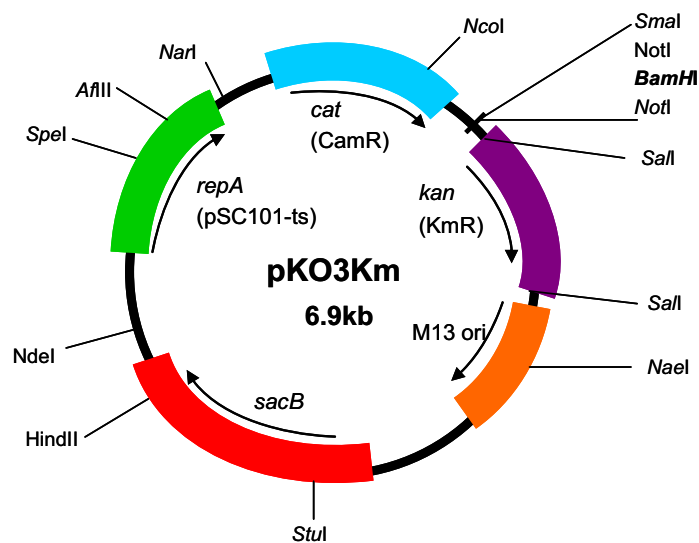


Figura 4.21. Esquema del plasmidi pKO3Km construït en aquest treball

4.2.1.2 Justificació de l'elecció del mètode de mutagènesi

Existeixen diferents mètodes per a poder induir mutacions en el cromosoma bacterià entre els quals s'hi inclouen l'ús de radiacions ultraviolades, el tractament amb certs agents químics i algunes manipulacions genètiques. Tant els tractaments amb radiació com amb agents químics (agents alquilants, intercalants,...) poden generar en funció de la classe de mutagen diferents tipus de mutacions al llarg del cromosoma que van des de mutacions puntuals o substitucions d'un parell de bases del gen a insercions i delecions d'un o més parell de bases. Els efectes que provoquen aquestes mutacions poden ser molt diversos, des de les que passen inadvertides perquè no tenen transcendència fenotípica com són les mutacions silencioses (aparició d'un triplet que codifica per al mateix aminoàcid) o neutres (aparició de triplets que codifiquin per aminoàcids diferents però equivalents) a les que provoquen canvis evidents en les proteïnes perquè provoquen:

- l'aparició d'un codó de terminació (mutació sense sentit), que normalment genera un producte gènic no funcional;
- l'aparició d'un nou triplet que codifiqui per un aminoàcid de diferent tipus (mutació de canvi de sentit). Aquest tipus de mutació pot afectar en més o menys grau l'estructura i la funció de la proteïna;
- l'addició (inserció) o eliminació (deleció) d'un parell o més de nucleòtids que no siguin múltiples de tres (mutacions de canvi de fase o pauta de lectura). Aquest tipus de mutacions alteren radicalment l'estructura i la funció del producte gènic (Eisenstadt *et al.*, 1994).

Tots aquests mètodes generen mutacions no dirigides que poden ocórrer en qualsevol lloc del genoma i no en un gen específic. Hi ha altres mètodes que impliquen manipulacions genètiques que també poden generar mutacions no dirigides entre els quals s'inclouen mètodes per PCR, que es basen en la freqüència intrínseca de la Taq polimerasa d'introduir errors durant la replicació o bé mètodes de mutagènesi insercional que provoquen mutacions per mitjà de la introducció en el cromosoma bacterià de cassets de kanamicina o de segments mòbils d'ADN que s'anomenen transposons, els quals incorporen sovint determinants de resistència a antibiòtics com a marcadors de selecció. Altrament, la mutagènesi insercional també pot ser dirigida a mutar un gen específic, que és el que es desitja quan es vol estudiar la funció d'un gen

determinat. El problema principal és que qualsevol inserció en un operó separa els gens situats cap a l'extrem 3' (*downstream*) del seu promotor i això pot conduir a l'anul·lació de l'expressió d'aquests gens a més de la del gen mutat. A més cal tenir en compte que la inserció de qualsevol seqüència pot alterar la pauta de lectura del gen per la introducció d'un codó de parada i això també evita l'expressió dels gens *downstream*. Aquests efectes polars podrien dificultar l'assignació d'un determinat fenotip al gen mutat ja que seria problemàtic distingir si el fenotip aparegut correspon únicament al gen mutat o és degut als efectes sobre els gens adjacents. Tenint en compte que els gens *waa* de *S. marcescens* N28b es troben agrupats en operons dins l'agrupació gènica *waa*, aquest mètode de mutagènesi no és el més adequat per a assignar les funcions d'aquests. Per això, es va optar per utilitzar un mètode de mutagènesi (veure secció 3.4.12 *Tècniques de mutagènesi*) basat en el desenvolupat per Link *et al.*, 1997, que permet generar delecions precises en un determinat ORF mantenint la pauta de lectura i per tant evitant els efectes polars que la mutació pot provocar sobre l'expressió dels gens adjacents d'un mateix operó. Això s'aconsegueix aplicant les següents regles en la construcció de la delecio per PCR:

- els oligonucleòtids s'han de dissenyar respectant la pauta de lectura original
- la delecio ha de mantenir els codons en direcció 3' de l'inici del lloc de traducció i uns codons en direcció 5' del codó de parada per a mantenir els llocs d'unió als ribosomes
- les cues de 21 nucleòtids complementaris dissenyades per Link *et al.*, 1997 no introdueixen cap codó de parada i són suficientment llargues per a permetre la hibridació dels dos fragments de PCR asimètrics i la posterior amplificació en un únic fragment

A més per tal d'assegurar suficient homologia per a poder-se produir la recombinació durant la substitucio gènica amb el vector pKO3, els dos fragments que flanquegen la delecio han de tenir al voltant d'uns 500 pb (Link *et al.*, 1997).

4.2.1.3 Característiques genètiques dels mutants

Els diferents mutants que es van construir són derivats de *S. marcescens* N28b generats a partir de delecions en diferents gens de l'agrupació gènica *waa*. Per a construir aquestes delecions es van realitzar primerament dos PCRs asimètriques per a generar fragments a l'esquerra (fragment AB) i a la dreta (fragment CD) del gen a deleccionar, els quals posteriorment van ser units a través de les "cues" amb 21 nucleòtids complementaris i amplificats com a un únic fragment en una última reacció d'amplificació amb els encebadors externs. El procediment usat per a generar aquestes delecions està descrit a la secció 3.4.12 *Tècniques de Mutagènesi*. En la Taula 4.14 es resumeix la construcció gènica de cadascun dels mutants generats en el present treball. En la Taula 4.15 s'indiquen els encebadors usats per a la construcció, la temperatura d'hibridació i el temps d'extensió emprat, l'ADN motlle a partir del qual s'ha realitzat l'amplificació i la mida de la regió amplificada.

Taula 4.14. Resum de les construccions gèniques dels mutants del nucli del lipopolisacàrid de *S. marcescens* N28b

Mutant	Descripció	Deleció construïda
N28b Δ orf4	Mutant derivat de N28b que conté una deleció en el gen <i>orf4</i>	10 primers codons del gen <i>orf4</i> + cua de 7 codons + 15 últims codons de <i>orf4</i> (flanquejada per una regió de 479 pb cap a 3' i per una regió de 514 pb cap a 5')
N28b Δ orf7	Mutant derivat de N28b que conté una deleció en el gen <i>orf7</i>	13 primers codons del gen <i>orf7</i> + cua de 7 codons + 18 últims codons de <i>orf7</i> (flanquejada per una regió de 489pb cap a 3' i per una regió de 563 pb cap a 5')
N28b Δ waaQ	Mutant derivat de N28b que conté una deleció en el gen putatiu <i>waaQ</i> (<i>orf8</i>)	18 primers codons del gen <i>waaQ</i> + cua de 7 codons + 19 últims codons de <i>waaQ</i> (flanquejada per una regió de 532 pb cap a 3' i per una regió de 379 pb cap a 5')
N28b Δ orf9- orf10	Doble mutant derivat de N28b que conté una deleció en els gens <i>orf9</i> i <i>orf10</i>	7 primers codons del gen <i>orf9</i> + cua de 7 codons + 29 últims codons de <i>orf10</i> (flanquejada per una regió de 700 pb cap a 3' i per una regió de 450 pb cap a 5')
N28b Δ waaE	Mutant derivat de N28b que conté una deleció en el gen putatiu <i>waaE</i> (<i>orf13</i>)	6 primers codons del gen <i>waaE</i> + cua de 7 codons + 24 últims codons de <i>waaE</i> (flanquejada per una regió de 524 pb cap a 5' i per una regió de 403 pb cap a 3')

Taula 4.15. Resum dels encebadors usats, regió amplificada i condicions de PCR (T^a i temps d'extensió) per a construir les diferents delecions per a generar els mutants

Mutant	Reaccions de PCR	Encebadors	DNA motlle	Regió amplificada	T° hibridació	Temps extensió
N28bΔorf4	Fragment AB	ORF4.A ORF4.B	CosFGR16	547 pb	57°C	45 seg
	Fragment CD	ORF4.C ORF4.D	CosFGR16	525 pb	57°C	45 seg
	Fragment AD	ORF4.A ORF4.D	Fragments AB i CD	1093 pb	57°C	1min 30seg
N28bΔorf7	Fragment AB	ORF7.A ORF7.B	CosFGR16	602 pb	58°C	1 min
	Fragment CD	ORF7.C ORF7.D	CosFGR16	546 pb	58°C	1 min
	Fragment AD	ORF7.A ORF7.D	Fragments AB i CD	1169 pb	58°C	1min 30seg
N28bΔwaaQ	Fragment AB	waaQ.A waaQ.B	CosFGR16	432 pb	61°C	1 min
	Fragment CD	waaQ.C waaQ.D	CosFGR16	592 pb	63°C	1 min
	Fragment AD	waaQ.A waaQ.D	Fragments AB i CD	1045 pb	62 °C	1min 30seg
N28bΔorf9- orf10	Fragment AB	ORF9-10.A ORF9-10.B	CosR11	471 pb	55°C	1 min
	Fragment CD	ORF9-10.C ORF9-10.D	CosR11	787 pb	55°C	1 min
	Fragment AD	ORF9-10.A ORF9-10.D	Fragments AB i CD	1279 pb	55°C	2 min
N28bΔwaaE	Fragment AB	waaE.A waaE.B	psKF41	542 pb	52°C	1 min
	Fragment CD	waaE.C waaE.D	psKF41	475 pb	54°C	1 min
	Fragment AD	waaE.A waaE.D	Fragments AB i CD	1038 pb	52°C	1min 30seg

En tots els mutants obtinguts, la delecio fou comprovada a partir de l'amplificació i posterior seqüenciació de la regió que flanquejava la mutació, comprovant que es mantingués la pauta de lectura. S'utilitzaren les següents parelles d'encebadors:

- RSC.3 i COMGT per al mutant N28bΔorf4
- COMF1 i COMF2 per al mutant N28bΔorf7
- SB9 i FUN12 per al mutant N28bΔwaaQ
- SB11 i VAG2 per al mutant N28bΔorf9- orf10
- NIH3 i NIH4 per al mutant N28bΔwaaE

En la secció 3.4.10.3 *Encebadors usats en aquest treball*, es proporciona informació sobre la seqüència nucleotídica i la localització cromosòmica de tots els encebadors utilitzats.

4.2.1.4 Determinació del perfil electroforètic del LPS dels mutants

De tots els mutants obtinguts es van obtenir mostres per determinar el seu perfil electroforètic en gels de SDS-PAGE i/o Tricina-SDS-PAGE. Aquests últims tenen més resolució de les fraccions de baix pes molecular, i per tant, són els més adequats per a visualitzar les possibles alteracions del nucli del LPS provocades per les mutacions, que a vegades poden ser canvis molt petits difícils d'apreciar en els gels de SDS-PAGE. No obstant, les mutacions que afecten de manera important la mobilitat electroforètica poden ser fàcilment observables en gels de SDS-PAGE, que alhora permeten visualitzar millor la presència del patró d'escala característic dels LPSs que presenten antigen O.

Els perfils electroforètics obtinguts per a cada mutant en gels de Tricina-SDS-PAGE es mostren a la Figura 4.22, on es pot apreciar que la majoria de mutacions provocaren canvis en el patró electroforètic del nucli del LPS, indicant alteracions en aquest oligosacàrid. De fet, la major part de nuclis del LPS dels mutants migraven més ràpid que el de la soca salvatge, i això indicava la pèrdua en els primers de com a mínim un o dos monosacàrids. No obstant, cal tenir en compte que el patró de migració no només depèn del pes molecular de l'oligosacàrid sinó també de la càrrega dels seus residus i per això, el fet que un nucli del LPS migri més ràpid que un altre no pot relacionar-se només amb la pèrdua de residus sacarídics.

Un altre factor a tenir en compte és que sovint les mutacions comportaren una pèrdua substancial d'antigen O unit al nucli, i això, podia anar relacionat amb l'afectació de la mutació a un enzim implicat en la transferència d'un residu de la cadena principal.

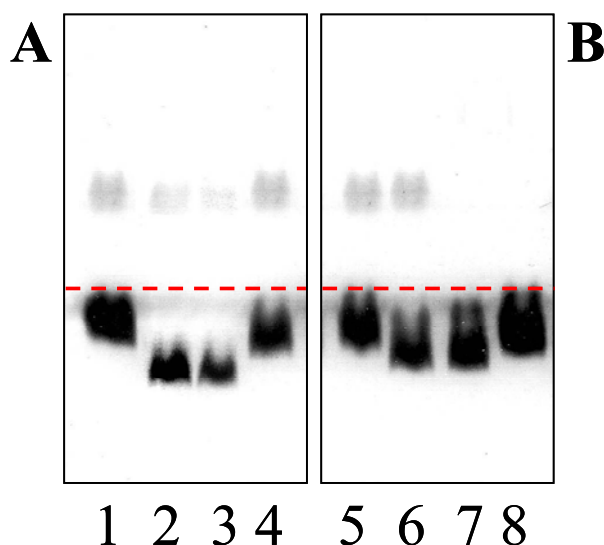


Figura 4.22. Gels de Tricina-SDS-PAGE tenyits amb nitrat de plata de mostres de LPS de diversos mutants de *S. marcescens* N28b

Carrils: **(A)** 1, *S. marcescens* N28b O4; 2, Mutant N28b Δ waaE; 3, Mutant N28b Δ orf9- orf10; 4, Mutant N28b Δ orf7; **(B)** 5, *S. marcescens* N28b O4; 6, Mutant N28b Δ waaQ; 7, Mutant N28b Δ orf4; 8, Mutant N28b4. Les mostres s'obtingueren segons el mètode de Hitchcock i Brown, 1983. La línia vermella indica la migració del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b (control) per tal de facilitar la comparació dels perfils electroforètics dels mutants amb el de la soca salvatge

4.2.2 ASSIGNACIÓ DE FUNCIONS PER ALS GENS DE L'AGRUPACIÓ *waa* DE *S. marcescens* N28b

L'elucidació de l'estructura química del nucli de *S. marcescens* N28b ens va permetre proposar i corroborar funcions per a la resta de gens de l'agrupació *waa* en base als anàlisis d'homologia de les seqüències d'aminoàcids deduïdes de les ORFs i a estudis de composició química i/o estructural o de complementació gènica amb els diversos mutants generats.

En els casos en què es van realitzar complementacions amb plasmidis recombinants, sempre s'utilitzà com a control el plasmidi sense cap fragment clonat, que en cap cas, va complementar els mutants. Per a les complementacions, s'utilitzaren plasmidis recombinants generats a partir del vector pGEMT, ja que permet el subclonatge d'inserts directament a partir de fragments amplificats per PCR. A més, aquest vector té l'avantatge de que permet la selecció dels potencials recombinants transformats en la soca X11-Blue pel criatge de colònies blanques (contenen l'insert) o blaves. En els experiments de complementació realitzats sobre mutants de *S. marcescens*, la selecció

dels transformants es va fer en un medi TSA suplementat amb una concentració d'ampicil·lina (2 mg/ml) superior a l'emprada en *E. coli*. A més, en tots els experiments de complementació, es comprovà abans de transformar el mutant la correcta orientació de l'insert respecte al promotor del vector. En la Figura 4.23 es mostren els plasmidis recombinants utilitzats en els experiments de complementació amb gens de *S. marcescens* N28b.

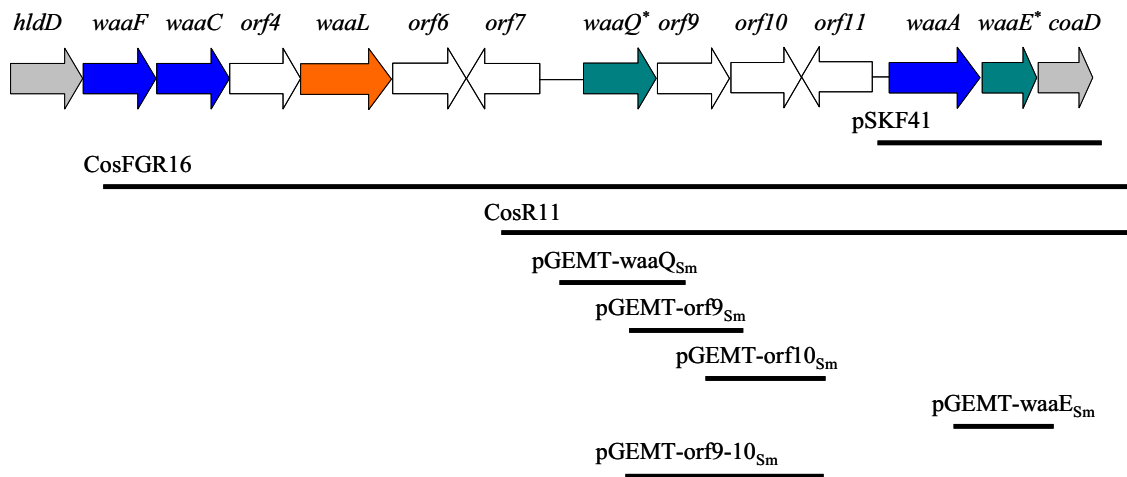


Figura 4.23. Esquema de l'agrupació *waa* de *S. marcescens* N28b on s'indiquen els mapes físics dels plasmidis* utilitzats en aquest treball per als experiments de complementació

(*) Només s'indica l'insert

4.2.2.1 ORF8 (*waaQ*)

La proteïna codificada per la *orf8* estava formada per 360 aminoàcids i presentava nivells significatius de similitud (61-64%) i d'identitat (42-49%) amb la proteïna ADP-heptosa-LPS heptosiltransferasa III (WaaQ) de varis enterobacteris (Heinrichs *et al.*, 1998) on és l'encarregada de transferir un residu de L,D-heptosa a la L,D-heptosa II del nucli intern a través d'un enllaç $\alpha(1\rightarrow7)$. Aquesta proteïna codificada per la *orf8* de *S. marcescens* N28b també presentava nivells elevats de similitud (78%) i d'identitat (64%) amb la heptosiltransferasa III de *K. pneumoniae* 52145 (Regué *et al.*, 2001). D'acord amb aquestes dades prèvies, s'havia proposat que l'*orf8* podria codificar per una proteïna amb funció heptosiltransferasa III i conseqüentment, se l'havia anomenat temptativament *waaQ* (Abitiu, 2000).

La primera aproximació que es va dur a terme per a identificar i corroborar la funció heptosiltransferasa III proposada per a l'*orf8* consistí en la realització d'estudis de complementació gènica amb la soca NC19, que corresponia a un mutant derivat de *K. pneumoniae* 52145 que presentava una mutació en el gen *waaQ* (Regué *et al.*, 2001). L'anàlisi del perfil electroforètic d'aquest mutant en gels de Tricina-SDS-PAGE havia posat prèviament de manifest que aquest mutant tenia antígen O i migrava lleugerament més ràpid que la soca parental 52145 (veure Figura 4.24-A). A més, el LPS d'aquest mutant mostrava una reducció del contingut en L,D-Hep en comparació amb la soca parental (Regué *et al.*, 2001).

Així, per a l'estudi de complementació, es va transformar el mutant NC19 amb el plasmidi pGEMT-WaaQ_{sm}, que contenia el *orf8* de *S. marcescens* N28b. L'anàlisi per Tricina-SDS-PAGE va mostrar que el perfil electroforètic de la soca transformada era idèntic al de la soca salvatge *K. pneumoniae* 52145 (veure Figura 4.24-A). Tanmateix, l'anàlisi composicional per cromatografia de gasos va revelar que la soca transformada tenia una composició en L,D-Hep similar a la de la soca salvatge, recuperant la reducció observada en el mutant NC19 (veure Taula 4.16). Aquests resultats indicaven que el *orf8* de *S. marcescens* N28b era capaç de complementar la mutació en el gen *waaQ* de *K. pneumoniae* 52145 i per tant, suggerien que l'*orf8* codificava per la ADP-heptosa-LPS heptosiltransferasa III.

Com a última comprovació, es va analitzar per Tricina-SDS-PAGE el LPS del mutant N28bΔwaaQ, obtingut pel mètode descrit en la secció 3.4.12 *Tècniques de mutagènesi*, que contenia una deleció en el gen *waaQ* sense provocar efectes polars (veure secció 4.2.1.3 *Característiques genètiques dels mutants*). L'anàlisi per Tricina-SDS-PAGE va revelar que el LPS del mutant mantenia l'antígen O i que el seu nucli migrava lleugerament més ràpid que el de la soca salvatge *S. marcescens* N28b, suggerint la pèrdua d'un residu (veure Figura 4.24-B). Aquests efectes observats com a conseqüència d'una mutació en el *orf8* de *S. marcescens* N28b eren similars als provocats per una mutació del gen *waaQ* de *K. pneumoniae* 52145.

Tots els resultats obtinguts confirmaven la funció ADP-heptosa-LPS heptosiltransferasa III per al producte gènic codificat per la *orf8* i consegüentment, es va designar definitivament com a *waaQ*. D'altra banda, la complementació satisfactòria del mutant

NC19 de *K. pneumoniae* amb el gen *waaQ* de *S. marcescens* N28b va permetre deduir que l'HepIII del nucli intern del LPS de *S. marcescens* N28b, es trobava, com a la majoria d'enterobacteris, en configuració L,D.

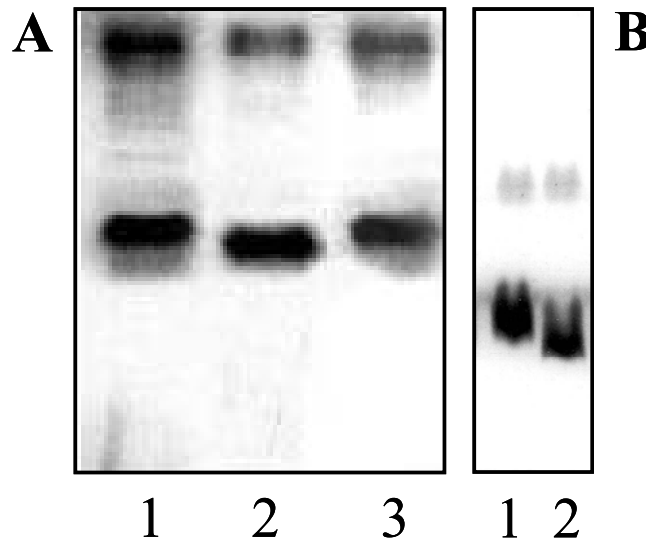


Figura 4.24. Anàlisi per electroforesi en gels de Tricina-SDS-PAGE amb tinció de nitrat plata de les següents mostres de LPS:

Carrils: (A) 1, *K. pneumoniae* 52145 (soca salvatge); 2, Mutant NC19 (*K. pneumoniae* 52145Δ*waaQ*); 3, NC19 + pGEMT-*WaaQ*_{Sm} (B) 1, *S. marcescens* N28b; 2, N28bΔ*waaQ*

Taula 4.16. Composició química del LPS de *K. pneumoniae* 52145, del mutant NC19 i de la soca complementada NC19 + pGEMT-*WaaQ*_{Sm}

	Concentració nmols / mg LPS			
	Gal	GalA	Glc	L,D-Hep
52145 (soca salvatge)	919	83	387	228
NC19 (52145Δ <i>waaQ</i>)	959	84	344	100
NC19 + pGEMT- <i>WaaQ</i> _{Sm}	948	N.A	422	236

N.A: no analitzat

4.2.2.2 ORF13 (*waaE*)

Estudis previs realitzats pel nostre grup de recerca havien localitzat a l'extrem 3' del gen *waaA* un gen similar (*waaE*) a *S. marcescens* N28b i *K. pneumoniae* que no estava present en les agrupacions *waa* de *E. coli* K12 i *S. enterica* (Guasch *et al.*, 1996; Regué *et al.*, 2001). El gen *waaE* de *S. marcescens* N28b codificava per una proteïna de 257 aminoàcids que compartia alts nivells de similitud (80%) i d'identitat (70%) amb la

proteïna WaaE de *K. pneumoniae* (Regué *et al.*, 2001) així com nivells significatius de similitud amb la proteïna LgtF de *Haemophilus ducreyi* (66% de similitud; 48% d'identitat) (Filiatrault *et al.*, 2000) i amb d'altres glicosiltransferases. Atès que la proteïna LgtF de *Haemophilus ducreyi* transferia un residu de D-glucosa a l'HepI del nucli intern del seu LOS per enllaç $\beta(1\rightarrow4)$, es va suggerir que la proteïna WaaE podria realitzar la mateixa funció a *S. marcescens* (Piqué, 2000). A més, l'estructura coneguda del nucli intern de *K. pneumoniae*, on s'havia identificat una proteïna homòloga a la WaaE, presentava una D-glucosa unida en posició $\beta(1\rightarrow4)$ a l'heptosa I.

Per intentar comprovar la hipòtesi, vam generar el mutant N28b Δ waaE per doble recombinació, segons el mètode descrit a la secció 3.4.12 *Tècniques de mutagènesi*, que contenia una deleció en el gen *waaE* sense provocar efectes polars (veure secció 4.2.1.3 *Característiques genètiques dels mutants*).

L'anàlisi del LPS (en mostres preparades segons el mètode de Hitchcock i Brown, 1983) per Tricina-SDS-PAGE va revelar que el nucli del LPS del mutant N28b Δ waaE migrava notablement més ràpid que el de la soca salvatge (veure Figura 4.25, carrils 1 i 2). A més, semblava que contenia antigen O, encara que en menor quantitat que en el LPS de la soca salvatge. La presència d'antigen O era coherent amb la funció proposada pel producte del gen *waaE*, ja que si estava implicat en la transferència d'un residu lateral, al no afectar la mutació a la cadena principal del nucli del LPS, no hauria d'interferir en la unió de l'antigen O a nivell de nucli extern. No obstant, el LPS d'aquest mutant contenia menor quantitat d'antigen O que la soca salvatge N28b, i això probablement es podria explicar pels canvis estructurals que provocaria la mutació en el gen *waaE*. Aquesta modificació de l'estructura química en el substrat on actuaria l'enzim WaaF, podria comportar una lleugera disminució de l'eficiència del reconeixement del substrat per part d'aquest enzim que veuria així dificultada la incorporació de l'HepII, i consegüentment, algunes molècules del LPS podrien quedar truncades a nivell de cadena principal impedit la lligació de l'antigen O. Aquesta hipòtesi estava reforçada pel fet que quan es compararen els perfils electroforètics en gels de SDS-PAGE del mutant N28b Δ waaE extret per PCP o per fenol-aigua (veure secció 3.5 *Estudi del lipopolisacàrid*) s'observaren en els dos casos molècules de LPS en què el nucli presentava una major mobilitat electroforètica que el de la soca salvatge

però on s'apreciaven diferències a nivell d'antigen O. Així, mentre que en el LPS extret pel mètode de PCP no s'hi observava molècules amb antigen O, en el LPS del mutant extret per fenol-aigua s'hi detectaven molècules amb el patró d'escala característic de l'antigen O, la qual cosa suggeria la presència en el mutant d'una mescla de molècules de LPS amb i sense antigen O (veure Figura 4.26).

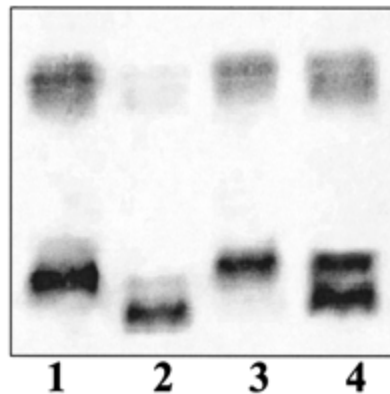


Figura 4.25. Anàlisi per electroforesi en gels de Tricina-SDS-PAGE amb tinció de nitrat de plata de les següents mostres de LPS, preparades segons el mètode de Hitchcock i Brown, 1983:

Carrils: **1**, *S. marcescens* N28b (soca salvatge); **2**, N28b Δ waaE; **3**, N28b Δ waaE + pGEMT-WaaE_{KP}; **4**: N28b Δ waaE + pGLU (plasmidi amb el gen *lgtF* de *Haemophilus ducreyi*)



Figura 4.26. Anàlisi per electroforesi en gel de SDS-PAGE amb tinció de nitrat de plata de les següents mostres de LPS:

Carrils: **1**, *S. marcescens* N28b (soca salvatge); **2**, N28b Δ waaE, extret per fenol-aigua; **3**, N28b Δ waaE, extret per PCP

Es va caracteritzar químicament el LPS extret per fenol-aigua en comparació amb el de la soca salvatge a través de cromatografia de gasos i colorimetria (veure secció 3.5 *Estudi del lipopolisacàrid*). Tot i que els resultats obtinguts expressats en valors absoluts no aportaren informació significativa, quan es calcularen les relacions molars (referides a un Kdo) es va poder apreciar una reducció d'un 32% del contingut en D-glucosa i una desaparició pràcticament total del contingut en galacturònic en el LPS del mutant (veure Taula 4.17). Aquests resultats podien ajustar-se a un possible defecte en la glicosiltransferasa implicada en la transferència d'un residu de glucosa ramificat a la HepI del nucli intern, ja que tot i haver-hi una reducció del contingut en glucosa, com era d'esperar, no era total. Aquest fet podia ser atribuït a que l'antigen O del LPS d'aquesta soca estava format per subunitats de repetició constituïdes per ramnosa i glucosa, i a més hi havia dos altres residus de glucosa en el nucli. D'altra banda, la disminució de la quantitat de galacturònic podria ser deguda a la pèrdua d'algun GalA no estequiòmetric unit al residu de Glc, que comportaria una pèrdua de càrrega negativa i per tant, això podria explicar la gran alteració de la mobilitat electroforètica del mutant N28b Δ waaE.

Taula 4.17. Composició química del LPS de *S. marcescens* N28b i del mutant N28b Δ waaE

	Rha		Glc		GlcN _{total}		GalA		L,D-Hep		Kdo	
	C	R	C	R	C	R	C	R	C	R	C	R
N28b	494	2,63	676	3,60	417	2,22	82	0,44	218	1,16	188	1
N28bΔwaaE	666	2,32	700	2,43	627	2,18	12	0,04	380	1,32	287	1

C: Concentració de monosacàrids a la mostra expressada en nmols/mg LPS; **R:** relació molars referides al Kdo (ombrejat)

L'elucidació de l'estructura del nucli de *S. marcescens* N28b va posar de manifest la presència d'un residu de β -Glc unit per enllaç $\beta(1\rightarrow4)$ a l'HepI del nucli intern, com havien apuntat les dades genètiques. Aquest tret estructural era compartit amb *K. pneumoniae* o *Haemophilus ducreyi*. Altrament, resultats obtinguts en paral·lel pel nostre grup d'investigació van demostrar que el gen *waaE* de *K. pneumoniae* estava implicat en l'addició del residu de D-Glc ramificada a la L,D-HepI del nucli intern per enllaç $\beta(1\rightarrow4)$ (Izquierdo *et al.*, 2002).

Els elevats nivells de similitud de la proteïna WaaE de *S. marcescens* N28b amb la WaaE de *K. pneumoniae*, suggerien que ambdues proteïnes tenien la mateixa funció, més encara si es tenia en compte que els LPSs d'ambdós bacteris compartien el mateix tret estructural. A fi de comprovar aquesta hipòtesi, es van dur a terme experiments de complementació transformant els mutants N28b Δ waaE i NC16 (mutant de *K. pneumoniae* en el gen *waaE*) (Izquierdo *et al.*, 2002) amb plasmidis que contenien el gen *waaE* de *S. marcescens* (pGEMT-WaaE_{Sm}) o del seu homòleg *waaE* de *K. pneumoniae* (pGEMT-WaaE_{Kp}) (Regué *et al.*, 2001). L'anàlisi del LPS per electroforesi en gels de Tricina-SDS-PAGE va evidenciar que ambdós *waaE* homòlegs van ser capaços de complementar la mutació en el gen *waaE* de les dues soques (veure Figura 4.25, carril 3 – només mostrats els resultats de la complementació del mutant N28b Δ waaE + pGEMT-WaaE_{Kp}). A més, el gen *lgtF* de *Haemophilus ducreyi* (plasmidi pGLU) va ser capaç de complementar parcialment el mutant N28b Δ waaE, ja que van aparèixer dues bandes, una que migrava al mateix nivell que la soca salvatge i l'altra més semblant al mutant (veure Figura 4.25, carril 4). La falta de complementació total es va atribuir a diferències estructurals en l'entorn químic de l'HepI sobre la que actuaria la proteïna WaaE o bé a una possible baixa eficiència en el reconeixement del promotor del gen *lgtF* per part de la maquinària d'expressió de *S. marcescens*.

En conjunt, els resultats obtinguts provaven que ambdós homòlegs WaaE (de *K. pneumoniae* i de *S. marcescens*) realitzaven la mateixa funció i per tant, es reafirmava la hipòtesi inicial proposada per la proteïna codificada pel gen *waaE* de *S. marcescens* N28b segons la qual seria l'encarregada de transferir per enllaç $\beta(1\rightarrow4)$ un residu de D-Glc a l'HepI del nucli intern del seu LPS. A més, els resultats satisfactoris de complementació del mutant N28b Δ waaE amb el gen *waaE*_{Kp} (i viceversa) ens suggeriren que el residu de β -Glc unit a l'HepI del nucli intern del LPS de *S. marcescens* N28b es trobava en configuració D.

4.2.2.3 ORF9 i ORF10

La proteïna de 375 aminoàcids codificada per la *orf9* presentava alts nivells de similitud (80%) i d'identitat (69%) amb la proteïna del mateix nombre d'aminoàcids codificada per la *orf8* de l'agrupació *waa* de *K. pneumoniae* C3 (Regué *et al.*, 2001). A més, ambdues proteïnes compartien cert grau de similitud amb les proteïnes WaaG de *Pseudomonas aeruginosa* (Walsh *et al.*, 2000), de *S. enterica* (Heinrichs *et al.*, 1998) i de *E. coli* K12 (Sofia *et al.*, 1994), R2, R3 i R4 (Heinrichs *et al.*, 1998, 1998b) (43-45% de similitud; 24-27% d'identitat). L'enzim WaaG en *E. coli* i *S. enterica* correspon a una glicosiltransferasa encarregada de transferir la D-GlcI a la L,D-HepII per enllaç $\alpha(1\rightarrow3)$. No obstant, en base a l'estructura proposada en aquest treball, el residu de L,D-HepII del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b estaria substituït en la posició O-3 per un residu de α -galacturònic, i no per un residu de D-glucosa, com passa en els nuclis de *Salmonella* i *E. coli*. De la mateixa manera, el residu de L,D-HepII dels nuclis interns de *K. pneumoniae* coneguts fins al moment (Vinogradov i Perry, 2001) estava substituït a la posició O-3 per un residu de α -D-galacturònic. Aquestes dades ens van portar a pensar que la proteïna codificada per la *orf9* tindria una funció diferent a la de les proteïnes WaaG.

Pel que fa a la proteïna de 366 aminoàcids codificada per la *orf10*, presentava nivells significatius de similitud (68%) i identitat (58%) amb una presumpta glicosiltransferasa codificada per la *orf9* de l'agrupació *waa* de *K. pneumoniae* (Regué *et al.*, 2001) i tenia certs nivells de similitud (però significativament més baixos) amb altres glicosiltransferases suposadament implicades en la biosíntesi del LPS de bacteris molt allunyats de *S. marcescens* N28b. Tant les proteïnes codificades per la *orf8* i *orf9* de l'agrupació *waa* de *K. pneumoniae* com per la *orf9* i *orf10* de *S. marcescens* N28b pertanyen a la família 4 de glicosiltransferases (d'acord amb la classificació de les glicosiltransferases CAZY (*Carbohydrate Active enZymes*)), les quals actuen retenint la configuració del carboni anòmeric.

Aquests resultats preliminars ens van fer pensar en la possibilitat que les *orf9* i *orf10* de *S. marcescens* N28b estiguessin implicades en la biosíntesi de la regió del nucli del LPS. Per provar aquesta hipòtesi, vam generar el mutant N28b Δ orf9-orf10 per doble recombinació, segons el mètode descrit a la secció 3.4.12 *Tècniques de mutagènesi*, que

contenia una doble deleció en les *orf9* i *orf10* sense provocar efectes polars (veure secció 4.2.1.3 *Característiques genètiques dels mutants*).

L'anàlisi del LPS per Tricina-SDS-PAGE va revelar que el nucli del LPS del mutant N28b Δ *orf9-orf10* migrava notablement més ràpid que el de la soca salvatge (veure Figura 4.27, carrils 2 i 1, respectivament). A més, pràcticament desapareixia l'antigen O. Atès que el mutant doble N28b Δ *orf9-orf10* presentava presumiblement una doble mutació a nivell de cadena principal esperàvem que aquest mutant doble no presentés gens d'antigen O, suposant que aquest s'unís al residu terminal de β -Glc del nucli extern. No obstant, en els gels de Tricina-SDS-PAGE s'observaven quantitats molt residuals d'antigen O, gairebé no apreciables. Per aquest fet, vam trobar dues explicacions plausibles: 1) L'antigen O podria lligar-se de forma preferent a la cadena principal però parcialment a algun residu ramificat. Per exemple, podria unir-se a la β -Glc lligada per enllaç $\beta(1\rightarrow4)$ a l'HepI, on en el cas de *Haemophilus* o *Neisseria* constitueix el residu a partir del qual s'estén la cadena α (Michon *et al.*, 1990); 2) La mostra de LPS analitzada podria tenir contaminants procedents de la càpsula o de polisacàrids extracel·lulars que podrien estar units a les envoltures bacterianes. No obstant, tenint en compte que la càpsula del serovar de *S. marcescens* N28b utilitzat en aquest treball estaria constituïda bàsicament per manosa i galactosa (Aucken *et al.*, 1998) i considerant el fet que en els anàlisis realitzats en mostres de LPS sencer d'aquest mutant es detectaren quantitats significatives de ramnosa però no de galactosa i manosa, vam considerar que, en el cas que fossin contaminants, el més probable és que procedissin de polisacàrids no capsulars.

El mutant N28b Δ *orf9-orf10* es va transformar amb els plasmidis pGEMT-*Orf9-10*_{Sm}, pGEMT-*Orf9*_{Sm} i pGEMT-*Orf10*_{Sm} per tal d'observar si eren capaços de complementar el mutant. La selecció dels transformants es feu per resistència a l'antibiòtic ampicil·lina (2mg/ml) i comprovant la correcta orientació de l'insert respecte al promotor del vector. Com era d'esperar, la introducció del plasmidi pGEMT-*Orf9-10*_{Sm} que contenia els dos *orf9* i *orf10* de *S. marcescens* N28b va ser capaç de recuperar el perfil electroforètic de la soca salvatge N28b (veure Figura 4.27, carril 3) mentre que cap dels *orf9* o *orf10* per separat van poder complementar la doble mutació (resultats no mostrats).

D'altra banda, la similitud entre els *orf9* i *orf10* de *S. marcescens* N28b i els *orf8* i *orf9* de *K. pneumoniae* indicaven que aquestes ORFs podrien realitzar funcions similars en la biosíntesi del nucli intern d'ambdues espècies. Reforçaren aquesta hipòtesi els resultats obtinguts pel nostre grup d'investigació en un anàlisi per electroforesi en gels de Tricina-SDS-PAGE on es va poder observar que la introducció del plasmidi pGEMT-Orf8-9_{Kp} en el mutant N28bΔorf9-orf10 era capaç de complementar quasi totalment el doble mutant de *S. marcescens* N28b (veure Figura 4.27, carril 4) (Izquierdo, 2003). La falta d'una complementació total podia ser deguda a diferències estructurals en els residus reconeguts per les proteïnes d'una espècie i altra.

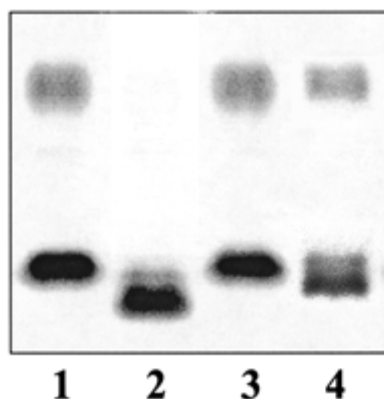


Figura 4.27. Anàlisi per Tricina-SDS-PAGE amb tinció de plata de les següents mostres de LPS:

A) 1: *S. marcescens* N28b (soca salvatge); **2:** Mutant N28bΔorf9-orf10; **3:** Mutant N28bΔorf9-orf10 + pGEMT-Orf9-10_{Sm}; **4:** Mutant N28bΔorf9-orf10 + pGEMT-Orf8-9_{Kp}

Per tal d'identificar la funció dels gens *orf9* i *orf10* de l'agrupació *waa* de *S. marcescens* N28b, es va decidir caracteritzar químicament la regió del nucli del LPS del mutant N28bΔorf9-orf10, seguint una metodologia similar a la emprada per a l'aïllament de la regió del nucli del LPS de la mostra N28b4.

Per aïllar la regió del nucli, en primer lloc es va extraure LPS del mutant. S'agafaren 60 mg de LPS extret i es va dur a terme una hidròlisi suau amb àcid acètic 1% per alliberar la regió polisacàridica del lípid A, seguint el procediment descrit a la secció 3.5.5.1 *Hidròlisi amb àcid acètic*. Com a resultat d'aquesta hidròlisi, s'obtingueren 15 mg (25%) de fracció polisacàridica, els quals s'aplicaren a una columna Sephadex G-50 (veure secció 3.5.5.2.1 *Cromatografia per gel-filtració*). El cromatograma obtingut (veure Figura 4.28) posà de manifest la presència de dos pics (A i B) i era

notablement diferent del cromatograma prèviament obtingut pel LPS hidrolitzat de la soca salvatge (veure Figura 4.18). Això podia indicar la presència de canvis importants en el nucli. D'aquests dos pics, la fracció B havia de correspondre a l'oligosacàrid del nucli, que altrament, era la majoritària. Com ja s'ha comentat anteriorment per les mostres N28b i N28b4, el primer pic correspon als polisacàrids de més alt pes molecular i per tant, si s'havia expressat antigen O en alguna proporció o bé hi havia una mescla de polímers capsulars o d'altres exopolisacàrids calia esperar que es localitzessin en la primera fracció.

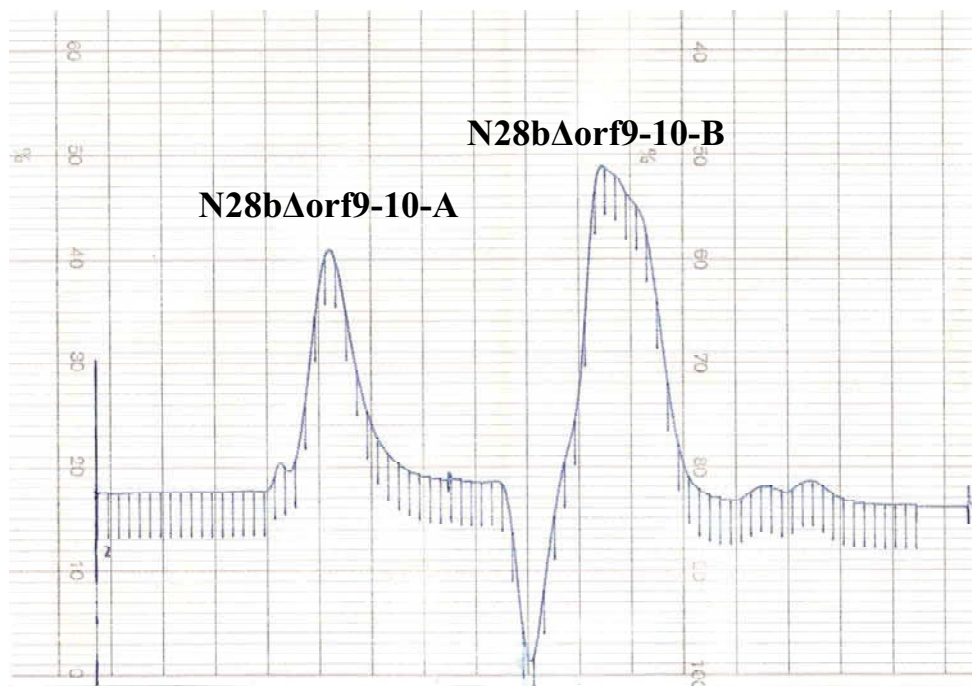


Figura 4.28. Cromatograma obtingut per cromatografia de gel-filtració en columna Sephadex G-50 després de la hidròlisi amb àcid acètic del LPS del mutant N28bΔorf9-orf10

Els resultats dels anàlisis de composició realitzats sobre la fracció N28bΔorf9-10-B corresponent a la regió del nucli del LPS del mutant van revelar una davallada important en el contingut de glucosa i la presència únicament de traces de glucosamina, d'àcid galacturònic i de D,D-heptosa (veure Taula 4.18), que van ser considerats contaminants de la mostra. A part de Kdo i L,D-Hep, per GC-MS es va poder identificar la presència de quantitats molt baixes de Ko.

Taula 4.18. Composició en sucres de les fraccions N28b Δ orf9-10-B i N28b-B corresponents a la regió del nucli del LPS del mutant i de la soca salvatge, respectivament

	Concentració nmols / mg fracció							
	Rha	Glc	Gal	GalA	GlcN	L,D-Hep	D,D-Hep	Kdo _{HCl}
N28bΔorf9-10-B	>0	48	>0	>0	>0	334	>0	231
N28b-B	20	497	>0	71	N.A.	352	107	215

N.A.: no analitzat

La fracció N28b Δ orf9-10-B també es va analitzar per cromatografia d'intercanvi iònic d'alta resolució (HPAEC) (veure secció 3.5.5.2.2 *Cromatografia d'intercanvi iònic d'alta resolució (HPAEC)*) i es va comparar el seu perfil cromatogràfic amb l'obtingut per la mostra N28b-B corresponent a la regió del nucli de la soca salvatge. Les dues mostres van ser analitzades en una columna CarboPacTM PA-100 (4 x 250 mm, Dionex Corp.) aplicant un gradient lineal de 1% \rightarrow 100% de 1M NaAc en 0,1M NaOH durant 60 minuts i a un flux de 1 ml/min. Els cromatogrames obtinguts per a les dues mostres (veure Figura 4.29) van posar de manifest diferències estructurals importants entre els dos nuclis, ja que s'obtingueren perfils cromatogràfics força diferents. El més destacable però fou que la majoria de pics corresponents a la regió del nucli del mutant eluïren entre els 2 i els 15 minuts mentre que els de la soca salvatge ho feren a temps de retenció superiors (majoritàriament entre 16 i 29 minuts). Aquestes dades feien pensar que la regió del nucli del mutant N28b Δ orf9-orf10 era una estructura notablement més petita que la de la soca salvatge i això explicaria la important reducció en la concentració de residus sacarídics observada en aquesta mostra.

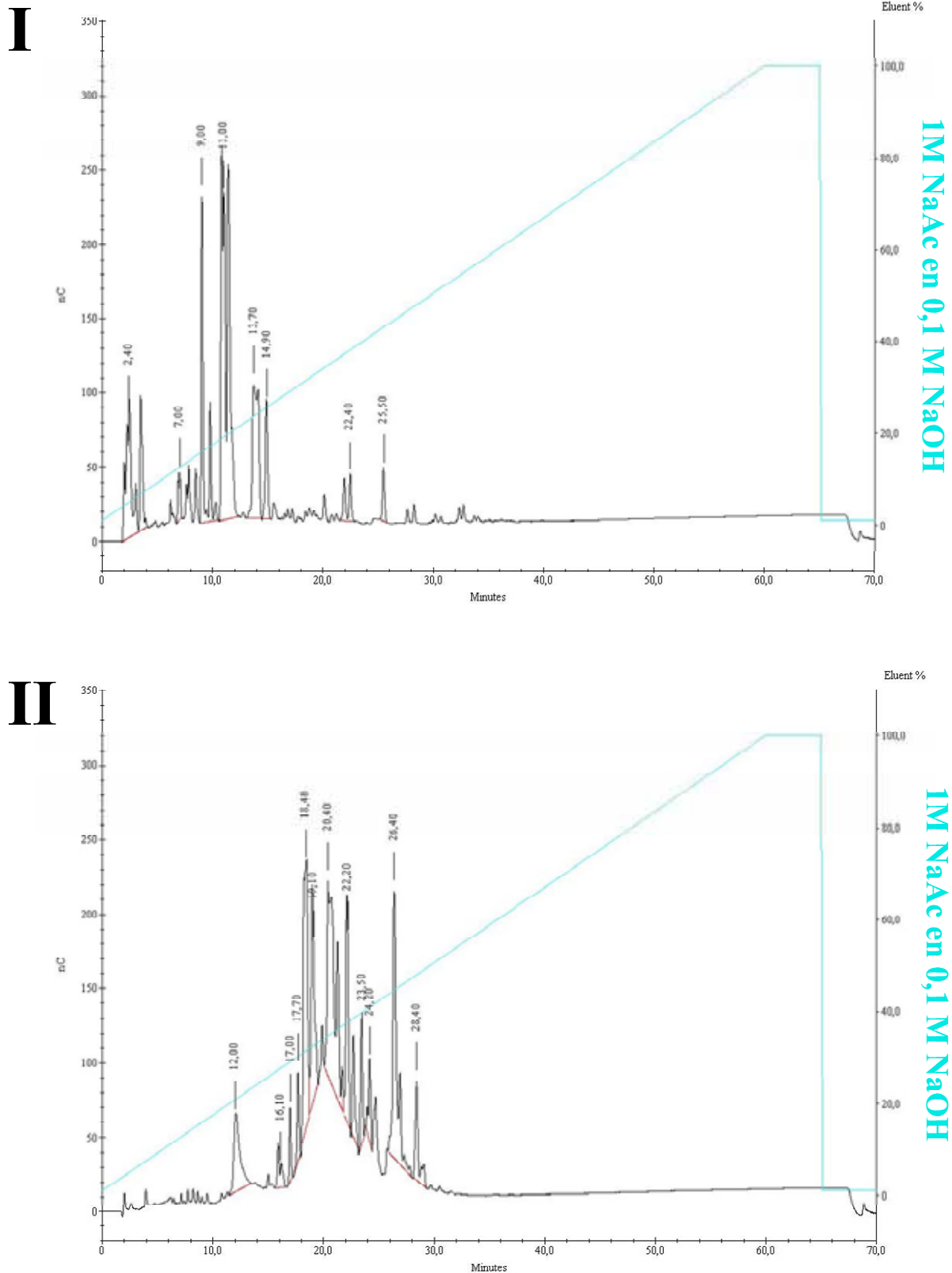


Figura 4.29. Cromatogrames obtinguts per a la separació per HPAEC de les mostres N28b Δ orf9-10-B (**I**) i N28b-B (**II**) corresponents a les fraccions del nucli del LPS del mutant N28b Δ orf9-orf10 i de la soca salvatge N28b, respectivament
 Columna: CarboPacTM PA-100 (4 x 250 mm, Dionex Corp.); gradient: 1% \rightarrow 100% de 1M NaAc / 0,1M NaOH durant 60 minuts a un flux 1 ml/min

Finalment, la fracció del nucli del LPS del mutant N28bΔorf9-orf10 es va analitzar per espectrometria de masses de ressonància d'ió ciclotró per transformada de Fourier i ionització per electrospai (ESI FT-ICR-MS), segons el mètode descrit a la secció 3.5.7 *Espectrometria de Masses*. L'espectre de masses amb deconvolució de la càrrega obtingut (veure Figura 4.30) mostrarà dos pics de més intensitat a 622,19 Da i 604,17 Da que corresponien a la massa molecular calculada per a un oligosacàrid constituït per dos residus d'heptosa i un Kdo (massa calculada de 622,20 Da) i el seu producte anhidre (massa calculada de 604,19 Da). Es va identificar un altre pic a 858,25 Da que corresponia a l'oligosacàrid anterior més una molècula de Ko (Hep₂KdoKo) (massa calculada de 858,26 Da), del qual es van poder identificar els adductes Na-H i K-H (pics a 880,24 i 896,20 Da, respectivament). La resta de pics, de més baixa intensitat, que aparegueren a l'espectre no els vam poder assignar.

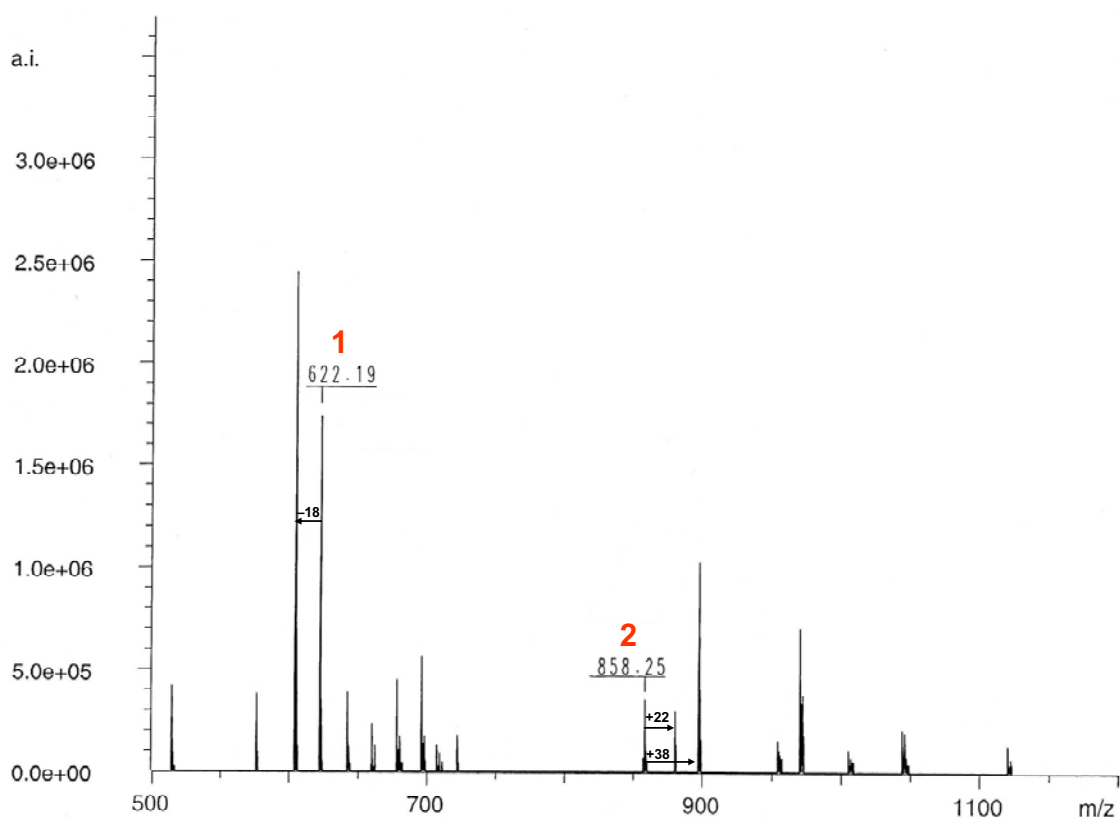


Figura 4.30. Espectre de masses ESI FT-ICR amb deconvolució de la càrrega obtingut per a la fracció N28bΔorf9-10-B

Aquesta fracció correspon a l'oligosacàrid del nucli aïllat a partir del LPS del mutant N28bΔorf9-orf10 després de la hidròlisi suau amb àcid acètic i la separació per cromatografia gel-filtració en columna Sephadex G-50. Els números de masses es refereixen a les masses moleculars monoisotòpiques de la molècula neutra. Amb +22 Da i +38 Da s'indiquen els adductes de sodi i potassi, respectivament. Amb -18 s'indica la forma anhidre

Considerant l'estructura proposada per a la regió del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b i les dades obtingudes per masses, el nucli del LPS del mutant N28b Δ orf9-orf10 tindria una estructura truncada a partir de l'HepII de la cadena principal en la que també hi estarien absents l'HepIII ramificada i la GlcI unida a l'HepI (veure Figura 4.31). Atès que les activitats enzimàtiques responsables de la transferència de l'heptosa III i de la GlcI ja havien estat prèviament assignades als productes dels gens *waaQ* i *waaE*, respectivament, els gens *orf9* i *orf10* de l'agrupació *waa* de *S. marcescens* N28b havien de codificar pels enzims implicats en la transferència dels residus de D-GlcN i D-GalA. Aquestes dades estan d'acord amb els resultats dels anàlisis de composició realitzats sobre la regió del nucli del LPS d'aquest mutant, on pràcticament no s'hi va detectar ni glucosamina ni àcid galacturònic i a més, s'observà una forta reducció de glucosa.

La identificació de les predites activitats D-GlcN i D-GalA transferasa a cadascuna de les *orf9* o *orf10* de *S. marcescens* N28b va ser possible gràcies als coneixements adquirits en *K. pneumoniae* durant la realització del present treball. La comparació de l'estructura proposada pel nucli del LPS de *S. marcescens* amb la coneguda pels diferents serovars de *K. pneumoniae*, va posar de manifest que en ambdues estructures l'HepII estava substituïda en la posició O-3 per un disacàrid de α -GlcN-(1 \rightarrow 4)- α -GalA, on en el cas de *K. pneumoniae* els monosacàrids estaven en la configuració absoluta D. Resultats obtinguts en paral·lel pel nostre grup d'investigació atribuïren a la proteïna codificada per la *orf8* de *K. pneumoniae* (WabG) la transferència del residu de α -D-GalA a l'HepII (Izquierdo, 2003). Considerant que ambdós bacteris compartien el mateix tret estructural i que la proteïna codificada per la *orf9* de *S. marcescens* presentava alts nivells de similitud (80%) i d'identitat (69%) amb la proteïna WabG de *K. pneumoniae*, vam proposar l'*orf9* de *S. marcescens* com la responsable de la transferència del residu d'àcid galacturònic i per tant, vam decidir denominar l'*orf9* com *wabG*. La complementació satisfactòria d'un mutant de *K. pneumoniae* 52145 en el gen *wabG* amb el plasmidi pGEMT-Orf9_{Sm} va corroborar la nostra suposició (Izquierdo *et al.*, 2003). Per eliminació, la transferència del residu de α -GlcN al α -GalA es va atribuir a la proteïna codificada per la *orf10* de *S. marcescens* N28b. Aquesta presentava nivells significatius de similitud (68%) i d'identitat (58%) amb la proteïna codificada per la *orf9* de l'agrupació *waa* de *K. pneumoniae*. Resultats obtinguts en paral·lel pel nostre grup d'investigació van permetre proposar la mateixa funció GlcN transferasa per a la proteïna codificada per a la *orf9* (*wabB*, posteriorment

wabH) de *K. pneumoniae* (Izquierdo, 2003) i per tant, per homologia vam anomenar la *orf10* de *S. marcescens* com a *wabH* (veure secció 5. Discussió).

Els resultats obtinguts per al mutant N28b Δ orf9-orf10 van ser útils per a proposar la configuració absoluta d'alguns dels residus del nucli intern del LPS de *S. marcescens* N28b, que no va ser determinada en aquest treball. D'una banda, com no es van detectar residus de D,D-Hep però sí residus de L,D-Hep en els anàlisis de composició realitzats sobre la regió del nucli del mutant, es va assumir que els primers dos residus d'heptosa (HepI i HepII; C i D en la Figura 4.31) del nucli intern del LPS de *S. marcescens* N28b, es trobaven en configuració L,D, com a la resta d'enterobacteris. A més, suposant que hi hagués un tercer residu d'heptosa (HepIII; H en la Figura 4.31), no identificat per masses, aquest també havia de ser L,D-Hep atès als resultats de composició del mutant. Aquestes dades alhora recolzaven la configuració L,D per a la HepIII proposada anteriorment a partir dels estudis de complementació del mutant NC19 amb el gen *waaQ* de *S. marcescens* (veure secció 4.2.2.1 ORF8). D'altra banda, els resultats satisfactoris de la complementació del mutant N28b Δ orf9-orf10 amb el plasmidi pGEMT-Orf8-9_{Kp} mencionats anteriorment, ens van permetre proposar la configuració D per als residus de α -GlcN i α -GalA (residus F i B, respectivament, en la Figura 4.31), ja que aquests dos residus a *K. pneumoniae* tenien aquesta configuració.

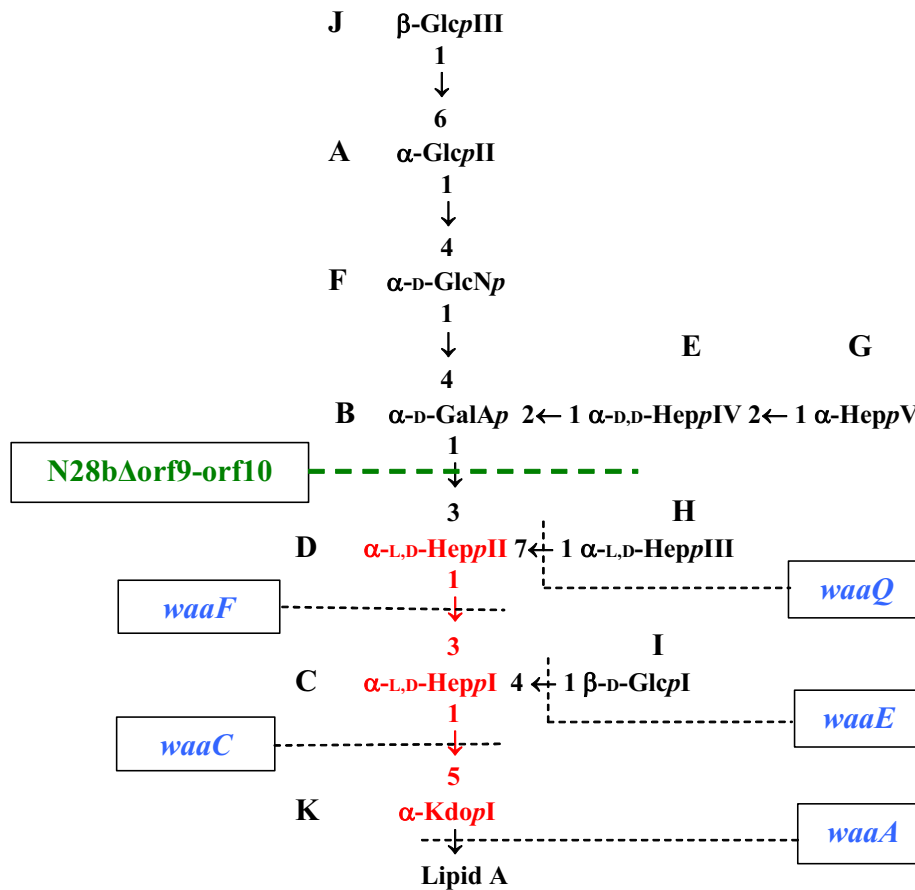


Figura 4.31. Estructura proposada per a la regió del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b. En verd, es mostra l'efecte provocat per les mutacions en els *orf9* i *orf10* de l'agrupació *waa* d'aquest enterobacteri. En blau s'indiquen les funcions proposades en aquest punt del treball per al gens de l'agrupació *waa*. En vermell, es ressalta l'estructura del mutant identificada per masses

4.2.2.4 ORF7 i ORF11

A través de diferents cerques amb el programa BLAST, es va determinar que la *orf7* codificava per una proteïna de 364 aminoàcids que presentava similitud amb proteïnes amb funció ADP-heptosa-LPS heptosiltransferasa d'altres enterobacteris i fins i tot de bacteris llunyanament relacionats. Semblantment, una altra proteïna de 337 aminoàcids codificada per la *orf11* també compartia similitud amb proteïnes amb funció ADP-heptosa-LPS heptosiltransferasa (Abitiu, 2000). A més, ambdues proteïnes presentaven dominis característics de glicosiltransferases de la família 9 (PFAM) que agrupa les heptosiltransferases que transfereixen residus d'heptosa en el nucli del LPS. Concretament, la proteïna codificada per la *orf7* presentava certs nivells de similitud (41 – 50%) i d'identitat (23 – 30%) amb les proteïnes WaaF d'altres membres de la família *Enterobacteriaceae*, implicades en la transferència de la L,D-HepII del nucli

intern. La proteïna codificada per la *orf11* compartia cert grau de similitud (41 – 45%) i identitat (23 – 26%) amb les proteïnes WaaQ d'altres enterobacteris, implicades en la transferència de la L,D-HepIII ramificada.

L'existència d'aquestes dues heptosiltransferases era compatible amb l'estructura proposada per al nucli del LPS de *S. marcescens* N28b, on s'hi localitzaven cinc residus d'heptosa. Tenint en compte que ja havien estat assignats els gens implicats en la transferència dels tres residus de L,D-Hep del nucli intern, era d'esperar que les proteïnes codificades per les *orf7* i *orf11* fossin responsables de la transferència del disacàrid α -Hep-(1 \rightarrow 2)- α -Hep del nucli extern de *S. marcescens* N28b.

Per tal de comprovar aquesta hipòtesi i identificar quina proteïna transferia cada monosacàrid en particular, es va construir el mutant N28b Δ orf7 per doble recombinació, segons el mètode descrit a la secció 3.4.12 *Tècniques de mutagènesi*, que contenia una deleció en el gen *orf7* sense provocar efectes polars (veure secció 4.2.1.3 *Característiques genètiques dels mutants*).

L'anàlisi del LPS per Tricina-SDS-PAGE va revelar que el nucli del LPS del mutant presentava antigen O i migrava lleugerament més ràpid que el de la soca salvatge (veure Figura 4.22-A, carril 4), la qual cosa ens suggeria la pèrdua d'un o màxim dos residus neutres. Aquests resultats eren coherents amb la possible pèrdua del disacàrid α -Hep-(1 \rightarrow 2)- α -Hep, ja que al tractar-se d'una ramificació lateral no era d'esperar que afectés la presència d'antigen O.

Per a caracteritzar químicament el mutant es va extraure el seu LPS pel mètode de fenol i aigua i es va analitzar la seva composició química comparant-la amb la de la soca salvatge. Els resultats d'aquest anàlisi (veure Taula 4.19) ens indicaren que el mutant tenia la mateixa composició qualitativa que la soca salvatge i en particular, la presència de ramnosa en el mutant en quantitats similars a les de la soca salvatge era coherent amb la presència d'antigen O. Pel que fa al contingut en L,D-heptosa no es veia disminuït mentre que la D,D-heptosa estava reduïda a la meitat. En ambdues mostres s'hi va detectar per GC-MS petites quantitats de Ko.

Taula 4.19. Composició qualitativa i quantitativa en sucres (neutres, àcids urònics, glucosamina, Kdo) i fosfats del LPS sencer del mutant N28b Δ orf7 en comparació amb els de la soca salvatge *S. marcescens* N28b

	Concentració nmols / mg LPS									
	Rha	Man	Glc	Gal	GalA	L,D-Hep	D,D-Hep	GlcN unida	Fosfat orgànic	Kdo _{HCl}
N28bΔorf7	492	28	874	17	85	296	23	364	304	243
N28b	494	24	676	>0	82	218	65	417 ^{a)}	376	188

a) Aquest valor correspon a GlcN total enloc de GlcN unida (GlcN total – lliure) perquè la GlcN lliure no es va poder determinar per excessiu error analític

A fi d'aïllar la regió del nucli i poder apreciar més fàcilment els efectes provocats per la mutació, en primer lloc es va dur a terme una hidròlisi suau amb àcid acètic 1% amb 60 mg del LPS extret del mutant seguint el procediment descrit a la secció 3.5.5.1 *Hidròlisi amb àcid acètic*. S'obtingueren 26 mg (43%) de fracció polisacàridica que s'aplicaren a una columna Sephadex G-50 (veure secció 3.5.5.2.1 *Cromatografia per gel-filtració*). S'obtingué el cromatograma que es mostra a la Figura 4.32 a on es van poder observar tres pics. Per analogia amb el cromatograma obtingut anteriorment per a la mostra salvatge que també presentava antigen O (veure Figura 4.18), el pic corresponent a la fracció N28b Δ orf7-B, corresponia a la fracció del nucli del LPS del mutant.

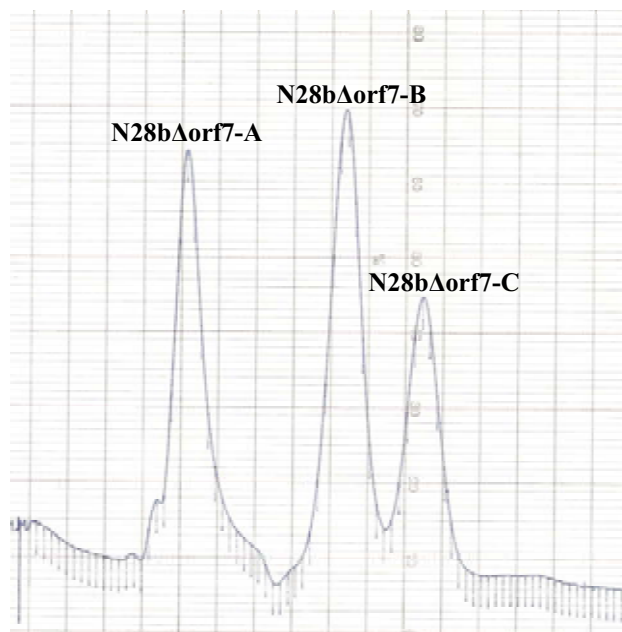


Figura 4.32. Cromatograma obtingut per cromatografia de gel-filtració en columna Sephadex G-50 després de la hidròlisi amb àcid acètic 1% del LPS del mutant N28b Δ orf7

Seguidament, s'analitzà la composició de la fracció N28b Δ orf7-B i es comparà amb els resultats obtinguts per a la fracció N28b-B corresponent a la regió del nucli del LPS de la soca salvatge (veure Taula 4.20). L'anàlisi comparatiu va revelar una reducció significativa del contingut en D,D-heptosa (aproximadament del 70%) en el mutant mentre que el contingut en L,D-heptosa no es va veure afectat.

Taula 4.20. Composició en sucres de les fraccions N28b Δ orf7-B i N28b-B corresponents a la regió del nucli del LPS del mutant i de la soca salvatge, respectivament

	Concentració nmols / mg fracció						
	Rha	Glc	Gal	GalA	L,D-Hep	D,D-Hep	Kdo _{HCl}
N28bΔorf7-B	84	692	>0	66	402	34	194
N28b-B	20	497	>0	71	352	107	215

Si la nostra hipòtesi inicial era certa i per tant, el gen *orf7* codificava per un dels enzims implicats en la transferència d'alguna de les dues heptoses del nucli extern, al tractar-se d'una ramificació lateral amb monosacàrids neutres, no caldria esperar variacions importants del perfil cromatogràfic de l'oligosacàrid del nucli per HPAEC. Per a comprovar-ho, es varen injectar 60 μ l de les fraccions N28b Δ orf7-B i N28b-B a una columna analítica CarboPacTM PA-100 (4 x 250 mm, Dionex Corp.) aplicant un gradient lineal de 1% \rightarrow 100% de 1M NaAc en 0,1M NaOH durant 60 minuts i a un flux de 1 ml/min (veure secció 3.5.5.2.2 *Cromatografia d'intercanvi iònic d'alta resolució(HPAEC)*). Tal i com es pot observar a la Figura 4.33, els cromatogrames obtinguts mostraren un perfil de pics similar (si bé de menys intensitat en el mutant) que apareixien a uns temps de retenció pràcticament iguals en ambdues mostres. Aquests resultats reforçaven la nostra hipòtesi. D'altra banda, el fet que en el mutant s'observés un nombre considerable de pics, ens indicà que la regió del nucli del seu LPS estava formada per una mescla complexa d'oligosacàrids estructuralment relacionats, igual que s'observava en la soca salvatge.

Finalment, la fracció del nucli del LPS del mutant N28b Δ orf7 es va analitzar per espectrometria de masses de ressonància d'ió ciclotró per transformada de Fourier i ionització per electrospai (ESI FT-ICR-MS), segons el mètode descrit a la secció 3.5.7 *Espectrometria de Masses*. L'espectre de masses amb deconvolució de la càrrega que

s'obtingué (veure Figura 4.34) mostrà lògicament un patró complex de pics de diferents masses. A la Taula 4.21 es mostra la composició proposada per cadascun dels pics que van poder ser assignats a partir de les masses moleculars identificades.

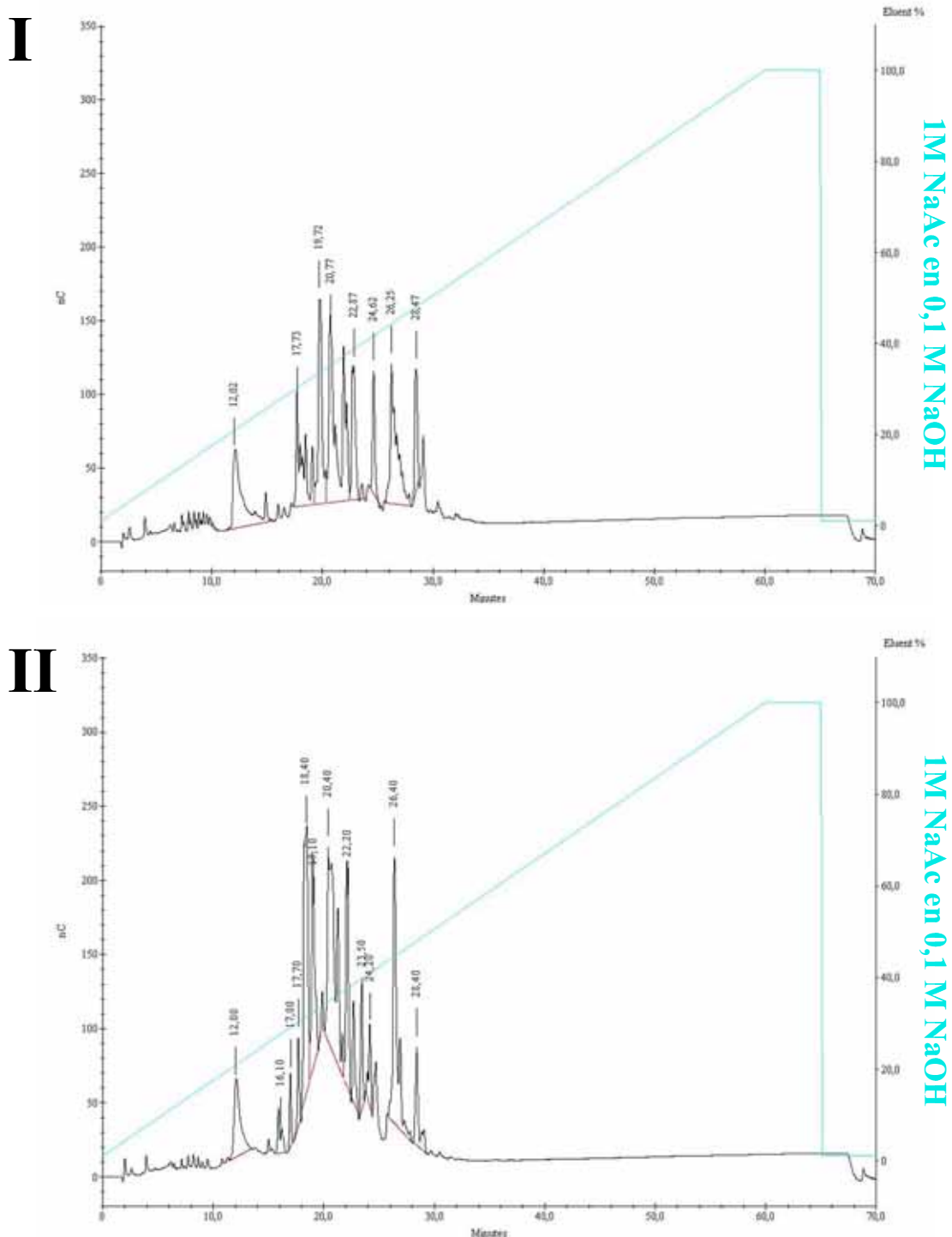


Figura 4.33. Cromatogrames obtinguts per a la separació per HPAEC de les mostres N28bΔorf7-B (I) i N28b-B (II) corresponents a les fraccions del nucli del LPS del mutant N28bΔorf7 i de la soca salvatge N28b, respectivament
 Columna: CarboPac™ PA-100 (4 x 250 mm, Dionex Corp.); gradient: 1% → 100% de 1M NaAc / 0,1M NaOH durant 60 minuts a un flux 1 ml/min

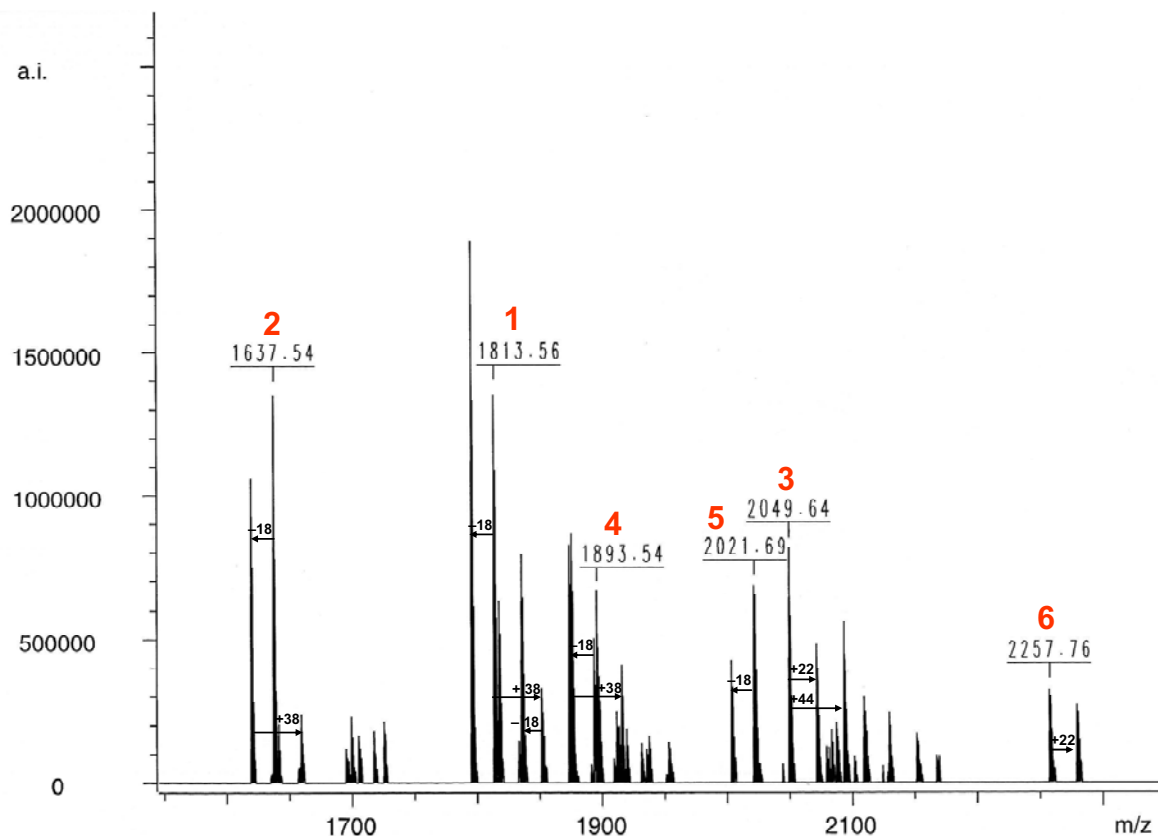


Figura 4.34. Espectre de masses ESI FT-ICR amb deconvolució de la càrrega obtingut per a la fracció N28bΔorf7-B

Aquesta fracció correspon a l'oligosacàrid del nucli aïllat a partir del LPS del mutant N28bΔorf7 després de la hidròlisi amb àcid acètic 1% i la separació per cromatografia gel-filtració en columna Sephadex G-50. Els números de masses es refereixen a les masses moleculars monoisotòpiques de la molècula neutra. +22 Da, +44 i +38 Da indiquen els adductes de sodi, dos sodis i potassi, respectivament. El -18 indica la forma anhidre

Tal i com s'observa a la Figura 4.34 i a la Taula 4.21, el segon grup de pics de més intensitat (pic 2) foren els de masses moleculars 1.637,54 i 1.619,53 que quadraven perfectament amb la massa molecular calculada per a una molècula constituïda per KdoHep₃HexAHex₃HexN i la seva forma anhidra, respectivament. El pic de més intensitat (pic 1) així com els pics 3 i 4 constituïen tots ells variants del pic 2 amb les següents modificacions:

- substitució per un residu addicional d'àcid hexosurònic, en el cas del pic 1 de la Figura 4.34 (massa de 1.813,56 Da);
- substitució per un residu addicional d'àcid *D-glicero-D-talo*-oct-2-ulosònic (Ko) i d'un residu addicional d'àcid hexosurònic, en el cas del pic 3 de la Figura 4.34 (massa de 2.049,64 Da);

- substitució per un residu addicional d'àcid hexosurònic i d'un possible grup fosfat, en el cas del pic 4 de la Figura 4.34 (massa de 1.893,54 Da).

Taula 4.21. Masses moleculars identificades en l'espectre de masses ESI FT-ICR de la mostra N28b Δ orf7-B, que correspon a la fracció del nucli del LPS del mutant N28b Δ orf7^(a)

Nº pic	Massa molecular (Da)		Composició química proposada
	Identificada	Calculada ^(b)	
1	1.813,56	1.813,55	KdoHep ₃ HexA ₂ Hex ₃ HexN
	1.795,55	1.795,54	Forma anhidra
2	1.637,54	1.637,52	KdoHep ₃ HexAHex ₃ HexN
	1.619,53	1.619,51	Forma anhidra
3	2.049,64	2.049,61	KdoKoHep ₃ HexA ₂ Hex ₃ HexN
4	1.893,54	1.893,52	KdoHep ₃ HexA ₂ Hex ₃ HexNP
	1.875,53	1.875,51	Forma anhidra
5	2.021,69	2.021,65	KdoHep ₅ HexAHex ₃ HexN
	2.003,66	2.003,63	Forma anhidra
6	2.257,76	2.257,71	KdoKoHep ₅ Hex ₃ HexAHexN

Kdo: àcid 3-deoxi-D-*manno*-oct-2-ulopiranosònic; Ko: àcid D-*glicero*-D-*talo*-oct-2-ulosònic; Hep: heptosa; Hex: hexosa; HexA; àcid hexosurònic; HexN: hexosamina; P: fosfat

- Es llisten únicament les masses moleculars monoisotòpiques de la molècula neutra. Els pics s'enumeren en ordre decreixent d'intensitat i els números que tenen assignats corresponen als que es mostren a la Figura 4.34. No es llisten els adductes de sodi, 2 x sodi i potassi (+22 Da, +44 Da i + 38 Da, respectivament) que s'observen a l'espectre de masses
- Pel càlcul teòric del pes molecular de cada oligosacàrid s'ha considerat les masses moleculars de cadascun dels monosacàrids individuals més una molècula d'aigua. Masses moleculars dels monosacàrids: HexN: 161,06 Da; Hex: 162,05 Da; HexA: 176,03 Da; Hep: 192,06 Da; Kdo: 220,05 Da; Ko: 236,06 Da

Considerant l'estructura proposada per al nucli del LPS de *S. marcescens* N28b, les dades obtingudes per espectrometria de masses ens suggeriren que el nucli del LPS del mutant N28b Δ orf7 estava constituït majoritàriament per un oligosacàrid sense les dues heptoses ramificades del nucli extern, el qual a més podria presentar algunes substitucions no-estequiomètriques amb un segon residu d'un àcid hexosurònic, de Ko i fins i tot, podrien existir derivats monofosforilats. Aquests resultats eren coherents amb els obtinguts prèviament en els anàlisis per espectrometria de masses realitzats sobre el nucli del LPS de la soca salvatge i del mutant deficient en antígen (veure secció 4.1.6 i 4.1.7), on ja s'havia pogut observar espècies derivades de l'oligosacàrid del nucli principal que presentaven aquest tipus de substitucions.

A part d'aquests pics, també es van detectar uns de baixa intensitat (pics 5 i 6) les masses moleculars dels quals (2.021,69 i 2.257,76) quadraven amb un oligosacàrid constituït per KdoHep₅HexAHex₃HexN (massa calculada 2.021,65 Da), que correspondria a l'estructura proposada pel nucli complert del LPS de *S. marcescens* N28b, i amb un oligosacàrid de la mateixa composició que estaria substituït per un residu de Ko (massa calculada 2.257,71Da), respectivament. L'existència d'aquests oligosacàrids "complets" en la regió del nucli del mutant, que cal insistir que es troben en baixa proporció respecte als desproveïts del disacàrid d'heptosa del nucli extern, podria ser explicada pel fet que, amb molt baixa eficiència, alguna altra heptosiltransferasa implicada en la biosíntesi del nucli pogués actuar i suplir els efectes provocats per la mutació en *orf7*. Per exemple, la proteïna codificada per *orf11* podria col·locar dues Hep a la Hep III en presència d'una mutació en *orf7*.

La composició predita pel mutant N28b Δ orf7 a partir de masses ens va permetre corroborar la presumpta funció heptosiltransferasa proposada per la proteïna codificada per la *orf7* i identificar la seva funció. Com els enzims responsables de la transferència de les tres heptoses del nucli intern ja havien estat assignats i a més, en l'anàlisi de masses del mutant N28b Δ orf7 no es va observar cap pic que pogués correspondre a la massa molecular d'un oligosacàrid constituït per KdoHep₄HexAHex₃HexN, és a dir per quatre heptoses enlloc de les tres observades en el mutant N28b Δ orf7, la *orf7* havia de codificar per l'enzim que transferís la α -HepIV ramificada a la posició 2 del α -GalA de la cadena principal. Aquestes dades estarien d'acord amb els resultats obtinguts per electroforesis en gels de Tricina-SDS-PAGE i per les dades de composició del nucli del LPS del mutant. Atès que no es coneixia un altre proteïna amb aquesta funció la vam anomenar *wabP*.

D'altra banda, els resultats de composició obtinguts pel mutant N28b Δ orf7 ens van permetre proposar la configuració absoluta D,D pel residu de α -HepIV transferit per la proteïna codificada per la *orf7*, ja que en l'anàlisi de composició realitzat sobre la fracció del nucli del LPS del mutant s'hi observà una reducció dràstica (~70%) del contingut en D,D-Hep mentre que el contingut en L,D-Hep no es va alterar.

Finalment, arribats a aquest punt, va ser possible llençar una hipòtesi sobre la funció de la proteïna codificada per la *orf11* de l'agrupació *waa* de *S. marcescens* N28b. Atès que aquesta proteïna compartia similitud amb proteïnes amb funció heptosiltransferasa i, que en base a l'estructura de nucli de LPS de *S. marcescens* N28b tan sols quedava per assignar l'heptosiltransferasa implicada en la transferència del residu terminal de α -heptosa del nucli extern, es podria suggerir que la proteïna codificada per la *orf11* podria ser la responsable d'aquesta activitat i la vam anomenar *wabQ*.

4.2.2.5 ORF4 i ORF6

La *orf4* i la *orf6* de l'agrupació *waa* de *S. marcescens* N28b codificaven per proteïnes de 388 i 326 aminoàcids, respectivament, per a les quals s'havia postulat una possible relació amb la biosíntesi de la càpsula d'aquest enterobacteri (Abitiu, 2000).

La proteïna codificada per la *orf4* presentava dominis característics d'enzims amb funció glicosiltransferasa (GT) de la família 1 (PFAM), que agrupa glicosiltransferases capaces de transferir sucres activats a diversos substrats, entre els quals s'inclouen els lipopolisacàrids. A més pertany a la família 4 de glicosiltransferases (CAZY) corresponents a enzims que retenen la configuració del carboni anomèric (*retaining* GT). Aquesta proteïna presentava nivells de similitud al voltant del 50% amb presumptes glicosiltransferases implicades en la biosíntesi de diverses estructures de bacteris llunyanament relacionats, algunes de les quals podrien estar implicades en la biosíntesi del lipopolisacàrid. De totes elles, la proteïna amb la que presentava més nivells de similitud (72%) i d'identitat (55%) era amb una presumpte glicosiltransferasa de l'agrupació *waa* de *K. pneumoniae* 52145, identificada pel nostre grup d'investigació durant l'elaboració d'aquest treball (Izquierdo, 2003).

Pel que fa a la proteïna codificada per la *orf6*, presentava un domini conservat característic de les glicosiltransferases de la família 2 (PFAM i CAZY), que corresponen a glicosiltransferases que inverteixen la configuració (*inverting* GT). Semblantment a la *orf4*, la proteïna codificada per la *orf6* presentava nivells de similitud pròxims al 50% amb glicosiltransferases presumptament implicades en la biosíntesi de la paret cel·lular, de la càpsula, de l'exopolisacàrid o del LPS, entre les quals calia destacar la proteïna WbcK, presumiblement implicada en la biosíntesi del nucli extern

del LPS de *Yersinia enterocolitica* O3 (Skurnik *et al.*, 1995), i amb la que compartia un 53% de similitud (29% identitat). De nou, els nivells més alts de similitud (61%) i d'identitat (39%) els presentava amb una presumpta glicosiltransferasa de l'agrupació *waa* de *K. pneumoniae* 52145, identificada pel nostre grup d'investigació durant l'elaboració d'aquest treball (Izquierdo, 2003).

Aquestes dades i el coneixement de l'estructura de nucli del LPS de *S. marcescens* N28b ens van portar a pensar que aquestes dues proteïnes codificades per les *orf4* i *orf6* podrien estar implicades en la biosíntesi del nucli extern del seu LPS. En efecte, en aquesta regió del LPS de *S. marcescens* N28b s'hi havia identificat un disacàrid de β -Glc-(1 \rightarrow 6)- α -Glc unit a la posició O-4 de la GlcN (veure Figura 4.31). Atès que de les 14 ORFs identificades en l'agrupació *waa* de *S. marcescens* N28b s'havien pogut proposar/assignar funcions per a totes les ORFs excepte la *orf4* i *orf6* i d'altra banda, no s'havien identificat les proteïnes responsables de la transferència d'aquest disacàrid terminal, semblava lògic pensar que les *orf4* i *orf6* fossin les responsables de realitzar aquesta funció.

Per a comprovar-ho, es va construir el mutant en N28b Δ orf4 per doble recombinació, segons el mètode descrit a la secció 3.4.12 *Tècniques de mutagènesi*, que contenia una deleció en el gen *orf4* sense provocar efectes polars (veure secció 4.2.1.3 *Característiques genètiques dels mutants*).

L'anàlisi del mutant N28b Δ orf4 per electroforesi en gels de Tricina-SDS-PAGE va posar de manifest que el nucli del LPS d'aquest mutant migrava més ràpid que el nucli de la soca salvatge (veure Figura 4.22, carril 7), indicant la pèrdua d'algun residu del nucli. Aquestes alteracions a nivell de nucli no havien de ser tan profundes com les del mutant N28b Δ orf9-10, el qual migrava significativament més ràpid que el mutant N28b Δ orf4. D'altra banda, el mutant N28b Δ orf4 no presentava antigen O, i per tant, era coherent amb el fet que no tingués el residu de β -Glc o bé el disacàrid de β -Glc-(1 \rightarrow 6)- α -Glc situat a l'extrem de la cadena principal del nucli extern.

En definitiva, les dades obtingudes recolzaven la hipòtesi de que ambdues *orf4* i *orf6* estiguessin implicades en la transferència dels residus de glucosa del nucli extern.

D'altra banda, el fet que les proteïnes codificades per les *orf4* i *orf6* codifiquessin per glicosiltransferases que pertanyien a la família CAZY 4 i 2, respectivament, corresponents a enzims de retenció i d'inversió de la configuració, respectivament, suggerí que la transferasa codificada per la *orf4* transferia el residu de α -Glc al residu de GlcN del nucli extern mentre que la proteïna codificada per la *orf6* transferia el residu de β -Glc al residu de α -Glc. D'acord amb les funcions assignades pels seus homòlegs a *K. pneumoniae*, les *orf4* i *orf6* de *S. marcescens* N28b s'anomenaren *wabK* i *wabM*, respectivament (veure secció 5. *Discussió*).