



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

5. DISCUSSIÓ

5. DISCUSSIÓ

5.1 ESTRUCTURA DEL NUCLI DEL LPS DE *S. marcescens* N28b vs. ALTRES BACTERIS

En aquest treball s'ha proposat una estructura per l'oligosacàrid majoritari (oligosacàrid 3) del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b O4 (veure Figura 5.2), que s'ha provat, per espectrometria de masses, que és representatiu d'aquesta regió (Coderch *et al.*, 2004). En efecte, els estudis realitzats han posat de manifest l'elevada heterogeneïtat de la regió del nucli d'aquesta soca, constituïda per una mescla complexa d'oligosacàrids, fet que també s'ha observat en els LPSs d'altres soques de *S. marcescens* 111R (serovar O29) i IFO3735 (serovar O19) investigades recentment (Vinogradov *et al.*, 2006). L'elucidació estructural de la regió del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b O4 s'ha realitzat a partir d'un mutant d'aquesta soca deficient en antígen O (N28b4) per mutacions en els gens *wzm* i *wzt* que impedeixen l'exportació de l'antígen O complet al periplasma. (Saigi *et al.*, 1999). Atès que no presentava cap alteració en la biosíntesi del nucli, la utilització d'aquest mutant lliure d'antígen O ens va semblar una bona aproximació per a facilitar l'aïllament i purificació de la regió del nucli en quantitats suficients per als estudis estructurals. Diversos anàlisis comparatius realitzats sobre la regió del nucli de la soca salvatge i del mutant han permès demostrar que aquesta regió és compartida per ambdós bacteris i per tant l'estructura de nucli proposada és perfectament extrapolable a la de la soca salvatge.

En la família *Enterobacteriaceae*, les regions del nucli intern del LPS es classifiquen en dos grans grups en funció de les seves característiques estructurals: els que presenten una regió de nucli similar a la de *Salmonella enterica* i els que són diferents. Tots ells però comparteixen el següent oligosacàrid comú: L,D-HepIII-(1→7)-L,D-HepII-(1→3)-L,D-HepI-(1→5)- α -KdoI (HepIII-HepII-HepI-KdoI). La diferència entre ambdós grups recau en què en el primer grup (nuclis tipus *S. enterica*) l'oligosacàrid comú està substituït a la posició O-3 de l'HepII per un residu de D-Glc, l'HepI i HepII del nucli intern estan fosforilades i la posició O-4 de la HepI no està substituïda per un sucre; mentre que en el segon tipus de nucli, l'oligosacàrid comú no està substituït a la posició O-3 de l'HepII per un residu de D-Glc, els residus de HepI i HepII no solen estar

fosforilats i la posició O-4 de l'HepI està substituïda o bé per un residu d'hexosa o un oligosacàrid (Holst, 2002, 2007) (veure Figura 5.1, A i B).

L'estructura proposada per l'oligosacàrid del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b permet situar la regió del nucli del LPS d'aquesta soca dins el segon grup d'estructures de nucli, on s'inclouen les de *Klebsiella pneumoniae* (Vinogradov i Perry, 2001; Vinogradov *et al.*, 2001, 2002; Regué *et al.*, 2005), *Proteus* spp. (Vinogradov i Radziejewska-Lebrecht, 2000; Vinogradov *et al.*, 2000, 2002b,c; Vinogradov i Sidorczyk, 2002), *Yersinia enterocolitica* (Oertelt *et al.*, 2001; Müller-Loennies *et al.*, 1999) i *Y. pestis* (Vinogradov *et al.*, 2002a; Knirel *et al.*, 2005, 2005a) entre d'altres. Els estudis estructurals realitzats recentment sobre la regió del nucli del LPS de *S. marcescens* 111R i IFO3735 (Vinogradov *et al.*, 2006) confirmen aquesta dada. En efecte, aquestes dues soques presenten una estructura de nucli molt similar a la proposada per nosaltres per a la soca N28b (veure Figura 5.2), amb algunes excepcions que s'especifiquen més endavant. La diferència però més notable és que en el LPS de tipus R de la soca 111R, el trisacàrid del nucli extern de β -Glc-(1 \rightarrow 6)- α -Glc-(1 \rightarrow 4)- α -GlcN unit a la posició O-4 del GalA no hi és present. Això suggereix que probablement aquest mutant rugós s'hagi generat per una mutació a nivell del gen *wabH* explicant així l'absència de bona part del nucli extern i per tant, de l'antigen O.

De fet, el nucli del LPS de *S. marcescens* N28b combina trets estructurals característics de les regions de nucli dels LPSs de totes aquestes espècies bacterianes. Concretament, el nucli del LPS de *S. marcescens* N28b, igual que el de *K. pneumoniae* i de *Proteus* spp., presenta l'oligosacàrid comú HepIII-HepII-HepI-KdoI, on l'HepII està substituïda en la posició O-3 per un residu de α -D-GalA, el qual al mateix temps està substituït a la posició O-4 per un aminosucre, que en el cas de *K. pneumoniae* i *S. marcescens* N28b, és principalment un residu de GlcN, mentre que a *Proteus* spp. pot ser un residu de GlcN o de galactosamina (GalN) (Vinogradov *et al.*, 2002c) (veure Figura 5.1, B). En *Proteus mirabilis* O28 (Vinogradov i Radziejewska-Lebrecht, 2000) i en les soques de *Proteus penneri* 7, 14, 21 (Vinogradov *et al.*, 2002b) aquest residu de GlcN es troba parcialment amidat amb glicina. La presència de glicina també ha estat detectada en el nucli del LPS de les soques de *S. marcescens* 111R i IFO3735 (Vinogradov *et al.*, 2006), a diferència de la soca N28b investigada per nosaltres, tot i que es desconeix la ubicació exacta dins

l'estructura de nucli. Un altre diferència entre la soca N28b i les 111R i IFO3735 és que en les dues últimes s'hi ha detectat la presència d'arabinosamina en diferents posicions de la regió del nucli (KdoII)- lípid A. Aquest tipus de substitució s'ha relacionat amb la resistència d'aquest bacteri a la polimixina (Vinogradov *et al.*, 2006).

Un altre tret característic de la regió del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b que també és compartit amb algunes soques de *Proteus* spp., *K. pneumoniae* i *Yersinia* spp. és la presència de residus d'heptosa en el nucli extern, que són més propis de la regió del nucli intern. En aquest sentit, els LPSs d'un gran nombre de soques de *Proteus* spp. presenten el disacàrid de α -Hep-(1 \rightarrow 2)- α -D,D-Hep substituïnt la posició O-2 del residu de α -D-GalA unit a l'HepII, igual com passa a *S. marcescens* N28b, mentre que d'altres presenten únicament un residu de D,D-Hep unit al α -D-GalA o a altres posicions (veure Figura 5.1, B). En canvi, en els nuclis dels LPSs de *Y. enterocolitica* (Oertelt *et al.*, 2001) i *Y. pestis* (Vinogradov *et al.*, 2002a) el residu de D,D-Hep substitueix no-estequiomètricament la posició O-7 de l'HepIII (veure Figura 5.1, B). En *K. pneumoniae*, la majoria de serovars investigats fins ara (a excepció del O1:K2, soca 52145) tenen un residu de L,D-Hep a l'extrem terminal del nucli extern, que s'uneix al residu de GlcN a través d'un residu de α -Kdo. És interessant destacar el cas particular de *K. pneumoniae* O1, a on el nucli del LPS de les formes S presenta un residu de L,D-Hep a l'extrem terminal del nucli extern mentre que les formes R no tenen aquest residu i en el seu lloc, el residu de GlcN del nucli extern està substituït en la posició O-6 per una cadena d'un nombre variable de D,D-Hep (Vinogradov *et al.*, 2002). Aquest és un exemple de com les modificacions estructurals de nucli extern poden alterar l'eficiència de lligació de l'antigen O al nucli.

Una de les característiques més destacables i més àmpliament compartida pels membres del subgrup d'enterobacteris al qual pertany *S. marcescens* és la presència d'un residu de β -Glc unit a la posició O-4 de l'HepI del nucli intern (veure Figura 5.1, B). L'única excepció en aquest subgrup és el cas de *Plesiomonas shigelloides* O54 i O13, on els seus LPSs presenten trets característics d'aquest subgrup però en canvi l'HepI està substituïda en la posició O4 per un residu de β -Gal enlloc de β -Glc (Lukasiewicz *et al.*, 2006; Holst, 2006). A banda d'això, convé destacar que la presència d'un residu de β -Glc unit a la posició O-4 de l'HepI és un tret compartit amb membres d'altres famílies

bacterianes com *Vibrio cholerae* (fam. *Vibrionaceae*) (Vinogradov *et al.*, 1995; Knirel *et al.*, 1997,1998) i *Burkholderia caryophylli* (fam. *Burkholderiaceae*) (Molinaro *et al.*, 2002), però sobretot, és un tret característic dels lipooligosacàrids (LOS) dels bacteris patògens de les mucoses com *Bordetella* spp. (Vinogradov, 2000), *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp. i *Campylobacter* (Holst, 1999). En tots ells, el residu de β -Glc pot estar substituït per un monosacàrid o bé un oligosacàrid.

En els enterobacteris, aquest residu de β -Glc unit a la posició O-4 de l'HepI pot no estar substituït, com en el cas de la majoria de soques de *Proteus* spp. (a excepció de *P. mirabilis* O27) i *Yersinia* spp. o bé pot presentar substitucions no-estequiomètriques a la posició O-6 per un residu de β -D-GalA o α -D-GalA a *K. pneumoniae* (Vinogradov i Perry, 2001) i a *P. mirabilis* O27 (Vinogradov i Bock, 1999), respectivament (veure Figura 5.1, B). En el cas del LPS de *S. marcescens* N28b no s'ha identificat per RMN cap oligosacàrid en què el residu de β -Glc unit a la posició O-4 de l'HepI estigui substituït per un residu d'àcid galacturònic. No obstant, les dades obtingudes per espectrometria de masses suggereixen la presència d'un residu addicional d'àcid galacturònic en una posició terminal de la regió del nucli. Si a més es té en compte que en les espècies moleculars aïllades del mutant N28b Δ orf7 (Δ wabP), que suposadament estaria desproveït del disacàrid ramificat de α -Hep-(1 \rightarrow 2)- α -D,D-Hep del nucli extern, s'han identificat masses moleculars que poden correspondre a la presència d'un segon residu d'àcid galacturònic, cal pensar que aquest eventual residu pugui estar unit o bé a l'HepIII o bé a la β -Glc unida a l'HepI, que són dos posicions habituals entre els membres d'aquest subgrup d'enterobacteris. De fet, en els nuclis dels LPSs de la major part de soques de *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* i algunes de *P. penneri* es localitza un segon residu de β -D-GalA unit a la posició O-7 de l'HepIII. Paral·lelament, a *K. pneumoniae* (excepte serovar O1:K2), *P. mirabilis* O27 i *P. shigelloides* O74 (Niedziela *et al.*, 2006) hi ha un residu no-estequiomètric de D-GalA substituint la posició O-6 del residu de β -Glc del nucli intern (veure Figura 5.1, B). En el cas de *S. marcescens* N28b, les dades obtingudes ens fan pensar que aquest eventual residu no-estequiomètric de GalA estaria més probablement unit a la β -Glc del nucli intern que no pas a la HepIII, ja que el mutant N28b Δ waaE presenta una reducció significativa del contingut en galacturònic. Aquest fet que s'explicaria per la pèrdua del residu de β -Glc del nucli intern a on hipotèticament hi podria estar unit. Altrament, aquestes dades

també són coherents amb l'alteració important del perfil electroforètic observada en el mutant N28b Δ waaE, difícilment explicable únicament per la pèrdua d'un residu neutre de β -Glc i en canvi, fàcilment atribuïble a la pèrdua d'una càrrega negativa que aportaria el residu de GalA unit a la β -Glc.

Apart d'aquest segon residu de D-GalA, els resultats obtinguts suggereixen la presència d'altres substituents no-estequiomètrics en la regió del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b. En efecte, tot i que no es va identificar cap residu de Ko en els oligosacàrids aïllats de la regió del nucli del LPS del mutant deficient en antigen O (N28b4), es van detectar petites quantitats de Ko en la mescla d'oligosacàrids del nucli del LPS del mutant doble i en els LPS sencers de totes les mostres estudiades (soca salvatge, mutant deficient en antigen O i mutants N28b Δ orf7 i Δ orf9-orf10), fet que va ser corroborat per GC-MS. A més, els anàlisis per ESI FT-ICR-MS realitzats sobre les fraccions de nucli de totes aquestes mostres, suggeriren amb força probabilitat, l'existència d'algun residu de Ko en el nucli del LPS de *S. marcescens* N28b. És més, en els anàlisis per GC-MS realitzats sobre el LPS extret del mutant deficient en antigen O es detectaren pics corresponents als d'una estructura on Kdo i Ko estarien units. Recentment, s'ha descrit l'existència d'un residu de Ko unit a la posició O-4 del residu de KdoI en les regions del nucli del LPS de les soques de *S. marcescens* 111R i IFO3735, on s'intercanvia en quantitats no-estequiomètriques amb un segon residu de Kdo, que també ha estat detectat en aquestes dues soques (Vinogradov *et al.*, 2006). La presència de Ko fou inicialment detectada en els LPSs de *Acinetobacter*, reemplaçant en quantitats no-estequiomètriques el KdoI (Vinogradov *et al.*, 1997). Posteriorment, la presència d'un residu de Ko es va identificar en els LPSs de *Burkholderia cepacia* (Isshiki *et al.*, 2003), i de l'enterobacteri *Yersinia pestis* (Vinogradov *et al.*, 2002a), on, igual que a *S. marcescens* 111R i IFO3735, s'intercanviava amb el KdoII en quantitats no-estequiomètriques (veure Figura 5.1, B). En l'estructura proposada per nosaltres pel nucli del LPS de *S. marcescens* N28b no s'hi ha identificat aquest segon residu de Kdo, tot i que, si tenim en compte els anàlisis realitzats sobre els LPSs sencers, els resultats ens suggereixen la seva presència en quantitats no-estequiomètriques. L'absència d'aquest KdoII estaria justificada pel mètode d'hidròlisi utilitzat per a la separació de la part polisacàridica de la part lipídica, ja que, degut a la presència d'àcids urònics en el nucli del LPS de *S. marcescens* N28b, es va realitzar una hidròlisi suau amb àcid acètic

que trenca l'enllaç ketosídic entre un residu de Kdo i la GlcN del lípid A, però que indirectament, també trenca l'enllaç ketosídic entre dues molècules de Kdo.

D'altra banda, en els anàlisis per ESI FT-ICR-MS realitzats sobre les fraccions de nucli del LPS de *S. marcescens* N28b, del mutant deficient en antigen O i del mutant N28b Δ orf7 (Δ wabP), també s'hi van detectar espècies moleculars a +80 Da que podrien correspondre a derivats monofosforilats, encara que no van ser identificats en cap dels oligosacàrids aïllats de la regió del nucli del LPS del mutant deficient en antigen O. Tot i que en principi la presència de grups fosforilats en la regió del nucli del LPS és un tret característic dels membres del subgrup de *Salmonella* spp. però no del subgrup al qual pertany *S. marcescens*, cal senyalar que en el LPS de *Proteus* spp. la HepII està substituïda a la posició O-6 per un residu de fosfoetanolamina, mentre que a *Yersinia enterocolitica* O3 (Radziejewska-Lebrecht *et al.*, 1994) el residu de D,D-heptosa terminal està substituït per un residu fosfat no-estequiomètric. També s'han trobat aquest tipus de substitucions en els residus de Kdo del nucli intern de certs bacteris. En concret, el KdoII pot estar substituït a la posició O-7 per un grup fosfoetanolamina en els LPSs de *E. coli*, *Salmonella* (Holst *et al.*, 1990) i *Y. pestis* (crescuda a 6°C) (Knirel *et al.*, 2005a) o bé per un grup fosfat en el cas de *Vibrio cholerae* O1 (Vinogradov *et al.*, 1995). No obstant, suposant que hi hagués algun residu de fosfat en el nucli del LPS de *S. marcescens* N28b, no és probable que estigui unit al Kdo, ja que les heptosiltransferases (WaaC) que transfereixen el residu de HepI al KdoI no poden actuar quan el Kdo està fosforilat (Kdo-P). És més, les heptosiltransferases I presenten diferències significatives segons transfereixen el residu de HepI al Kdo o a Kdo-P (Gronow *et al.*, 2005). En canvi, el gen *waaC* de *S. marcescens* complementa mutacions en aquest gen de *E. coli* i *S. enterica* (Abitiu, 2000).

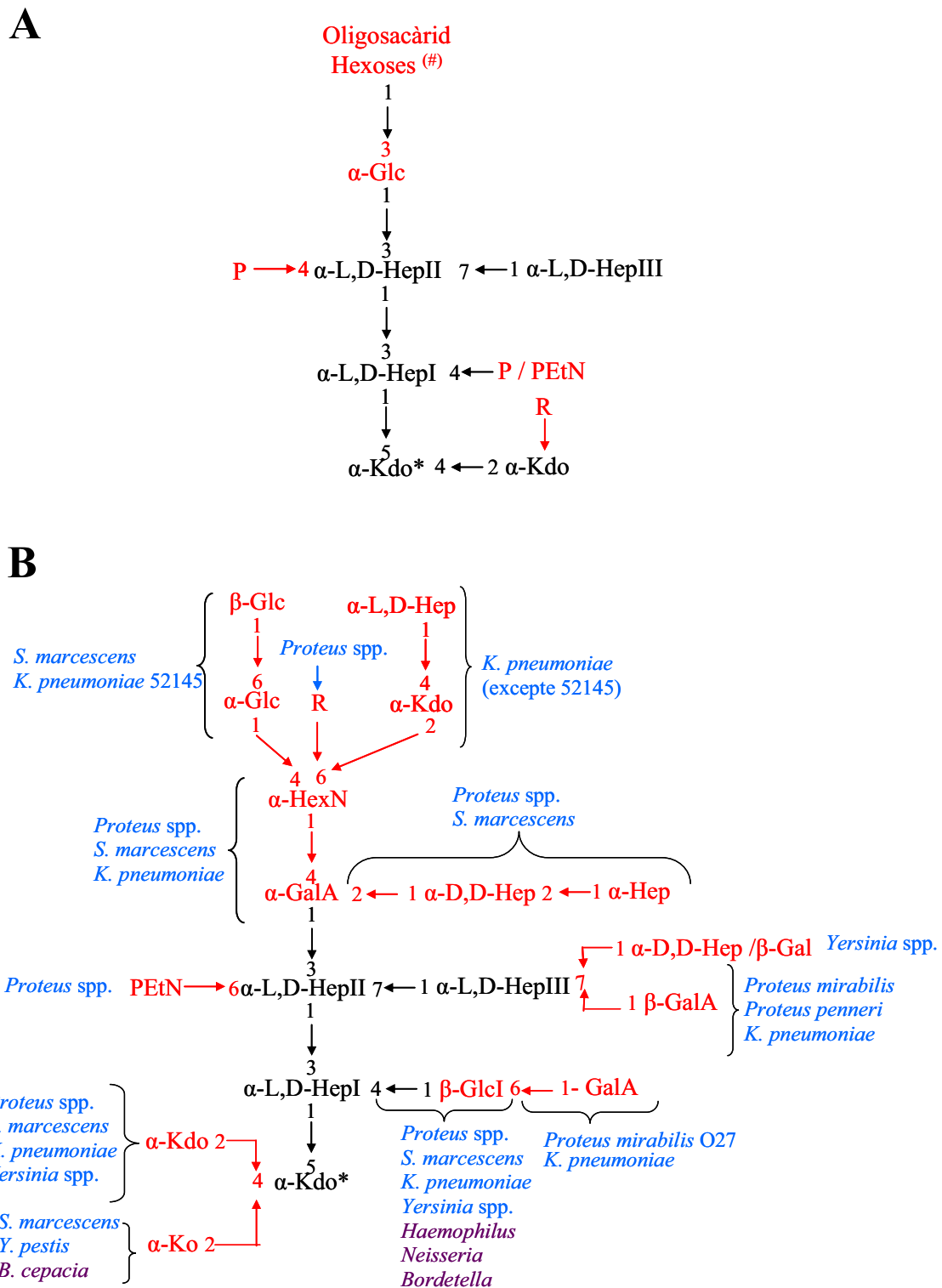


Figura 5.1. Esquemes de les estructures representatives dels dos grans subgrups d'estructures de nucli dels LPSs dels membres de la família *Enterobacteriaceae*

A: Estructures de nucli tipus *Salmonella*; **B:** Estructures de nucli diferents de *Salmonella*. En negre es marquen els elements estructurals comuns a tots els enterobacteris mentre que en vermell es marquen les diferències. En la figura **A:** R= Kdo o fosfoetanolamina; (*) Punt d'unió al lípid A; (#) Majoritàriament constituït per Glc i Gal però també GlcNAc. En la figura **B:** en blau s'indiquen els membres de la família *Enterobacteriaceae* que presenten els trets estructurals senyalats mentre que en morat s'indiquen aquelles espècies bacterianes que no pertanyen a aquesta família bacteriana. (*) Punt d'unió al lípid A; R: oligosacàrid variable on poden haver-hi residus de D,D-heptosa, formes obertes de GalNAc, ... Abreviatures: PEtN: fosfoetanolamina; HexN: hexosamina; P: fosfat

Tal i com s'ha dit anteriorment, l'estructura de la regió del nucli de LPS *S. marcescens* N28b, com la de les soques 111R i IFO3735 sembla ser molt heterogènia, la qual cosa complica els anàlisis estructurals. En bona part, aquesta heterogeneïtat és atribuïble a la presència de substitucions no-estequiomètriques que comporta sovint variacions en el nombre de nuclis "complets" en un mateix cultiu bacterià però no es pot menysprear l'heterogeneïtat que es genera com a conseqüència dels procediments analítics que s'utilitzen per a l'aïllament i purificació de la regió del nucli del LPS. Tot i que el procediment d'hidròlisi emprat consisteix en una hidròlisi àcida suau suficient per a separar l'oligosacàrid del nucli del lípid A poden produir-se alteracions o pèrdua de residus de Kdo, o d'altres substituents làbils i/o fosforilats i consegüentment, no identificar-se la seva posició. D'altra banda, mètodes d'hidròlisi en condicions alcalines fortes provoquen el trencament de molts substituents tipus fosfodièster, difosfat, difosfodièster, acetil, carbamoïl,... així com un procés de β -eliminació dels residus de galacturònic substituïts a la posició O-4 (Holst, 2002). L'heterogeneïtat també es pot generar durant la separació dels oligosacàrids per HPAEC, ja que les condicions alcalines emprades poden donar lloc a processos de β -eliminació en presència d'àcids galacturònics substituïts en posició O-4, pèrdua de grups fosfats, migració de grups fosfoetanolamina i/o modificacions dels residus de Kdo/Ko entre d'altres.

Finalment, un altre punt important a considerar és el punt d'ancoratge de l'antigen O al nucli del LPS de *S. marcescens* N28b. Els resultats obtinguts per SDS-PAGE i d'anàlisi de composició ens suggereixen que l'antigen O s'uniria al residu de β -Glc del nucli extern ja que les mutacions que afecten a les ramificacions laterals com la β -Glc unida a l'HepI (N28b Δ waaE) o al disacàrid d'heptoses [(N28b Δ orf7) (Δ wabP)] no impedeixen la lligació de l'antigen O mentre que la mutació que afecta a la transferència del disacàrid de β -Glc-(1 \rightarrow 6)- α -Glc [(N28b Δ orf4) (Δ wabK)] sí que la impedeix. El fet que en els gels de LPS realitzats amb el mutant N28b Δ orf9-orf10 (Δ wabG-wabH) s'hi observessin unes taques dèbils que podrien correspondre a l'antigen O ens suggerí inicialment la possibilitat de que l'antigen O es pogués unir alternativament a algun residu lateral. No obstant, si aquest fos el cas, caldria esperar que el mutant N28b Δ orf4 (Δ wabK), que afecta a la cadena principal, tingués antigen O encara que fos en quantitats residuals, que correspondria a la part d'antigen O que estaria unida a algun residu lateral. Atès que el mutant N28b Δ orf4 (Δ wabK) no presenta

gens d'antigen O, pensem que existeix un sol punt d'unió de l'antigen O al nucli a través de la β -Glc terminal. Per tant, les bandes que s'observen en el mutant N28b Δ orf9-orf10 (Δ wabG-wabH) no correspondrien en realitat a l'antigen O sinó a altres polisacàrids no capsulars que es trobarien a la superfície del bacteri i que s'haurien pogut extraure conjuntament amb el lipopolisacàrid. És probable que per compensar els canvis fisicoquímics que es produirien en el seu LPS (caldría esperar que fos més hidrofòbic), el mutant N28b Δ orf9-orf10 (Δ wabG-wabH) produís més polisacàrids a la superfície en contacte amb el medi exterior. Recentment s'ha caracteritzat l'estructura de l'antigen O de *S. marcescens* IFO3735 (serovar O19) de la que també es coneix l'estructura completa de nucli, a on es posa de manifest que l'antigen O s'uneix al residu final de β -Glc del nucli a través d'un primer de β -GlcNAc. Considerant que ambdues soques de *S. marcescens* presenten una estructura de nucli molt similar sembla lògica la nostra hipòtesi.

En conclusió, l'estructura proposada pel nucli del LPS de *S. marcescens* N28b combina característiques estructurals de les regions de nucli dels LPS de *Yersinia* spp., *Proteus* spp. i *Klebsiella pneumoniae*, essent molt característica, en aquest tipus d'estructures, la presència d'un residu de β -Glc unit a l'HepI i residus d'àcid galacturònic. De fet, el nucli del LPS de *S. marcescens* N28b és molt similar al de la soca *K. pneumoniae* 52145 (Regué *et al.*, 2005) investigada recentment, on bàsicament la diferència entre els dos nuclis és la presència en el LPS de *S. marcescens* N28b del disacàrid d'heptoses ramificat del nucli extern (veure Figura 5.2). Els residus d'àcid galacturònic presents en el nucli del LPS d'aquests enterobacteris aporten càrregues negatives a aquesta regió, les quals són molt importants per contribuir a la rigidesa de la paret dels bacteris gramnegatius a través de la formació d'enllaços intermoleculars amb cations divalents (Firdich *et al.*, 2005). En aquest sentit, aquests residus d'àcid galacturònic jugarien un paper molt similar en la membrana externa al que juguen els grups fosfats en els LPSs de *E. coli* i *Salmonella*.

5.2 ASSIGNACIÓ DE FUNCIONS ALS GENS DE L'AGRUPACIÓ GÈNICA *waa* DE *S. marcescens* N28b

L'agrupació de gens *waa* de *S. marcescens* N28b O4 havia estat completament seqüenciada pel nostre grup d'investigació (Piqué, 2000; Abitiu, 2000), i constava de 14 ORFs organitzades en tres unitats transcripcionals més dos gens monocistrònics (*orf 7* i *11*) que es transcrivien en direcció oposada (veure Figura 5.2). Per als gens compartits amb la resta d'enterobacteris, majoritàriament s'havien pogut assignar funcions. A partir de l'estructura proposada per *S. marcescens* N28b, en aquest treball s'ha pogut corroborar les funcions prèviament assignades i completar la caracterització dels gens no compartits (publicat parcialment a Coderch *et al.*, 2004).

Quan es comparen les agrupacions gèniques *waa* de diferents enterobacteris s'observa que en tots els casos coneguts els gens *hldD* i *coaD* es situen als extrems 5' i 3', respectivament. Dins d'aquesta agrupació s'hi localitzen sempre els gens *waaF* i *waaC* formant part de l'operó *hldD* així com els gens *waaQ* i *waaA*, la ubicació dels quals dins l'agrupació gènica *waa* pot variar sensiblement. En el cas concret de *S. marcescens* N28b, s'hi han identificat tots aquests gens implicats en l'epimerització (*hldD*) i transferència de la L,D-HepI (*waaC*), L,D-HepII (*waaF*), L,D-HepIII (*waaQ*) i en la transferència de Kdo (*waaA*). La presència de tots aquests gens es correlaciona amb l'estructura L- α -D-HepIII-(1 \rightarrow 7)-L- α -D-HepII-(1 \rightarrow 3)-L- α -D-HepI-(1 \rightarrow 5)- α -KdoI, que constitueix la regió del nucli intern del LPS de *S. marcescens* N28b (Figura 5.2) i que és present en totes les estructures de nucli intern del LPS de tots els enterobacteris estudiats (Holst, 1999, 2002, 2007). En concordança amb l'estructura elucidada per a l'oligosacàrid majoritari de la regió del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b, en l'agrupació *waa* de *S. marcescens* N28b no s'han identificat gens similars als *waaP* i *waaY* de *E. coli* i *S. enterica* sv. Typhimurium que estan implicats en les fosforilacions de les L,D-HepI i L,D-HepII, respectivament, però això no vol dir que no es puguin trobar en altres localitzacions. Apart d'aquests gens, s'ha identificat el gen *waaL* (*orf5*) que codifica per la proteïna implicada en la lligació de l'antigen O al nucli (Abitiu, 2000).

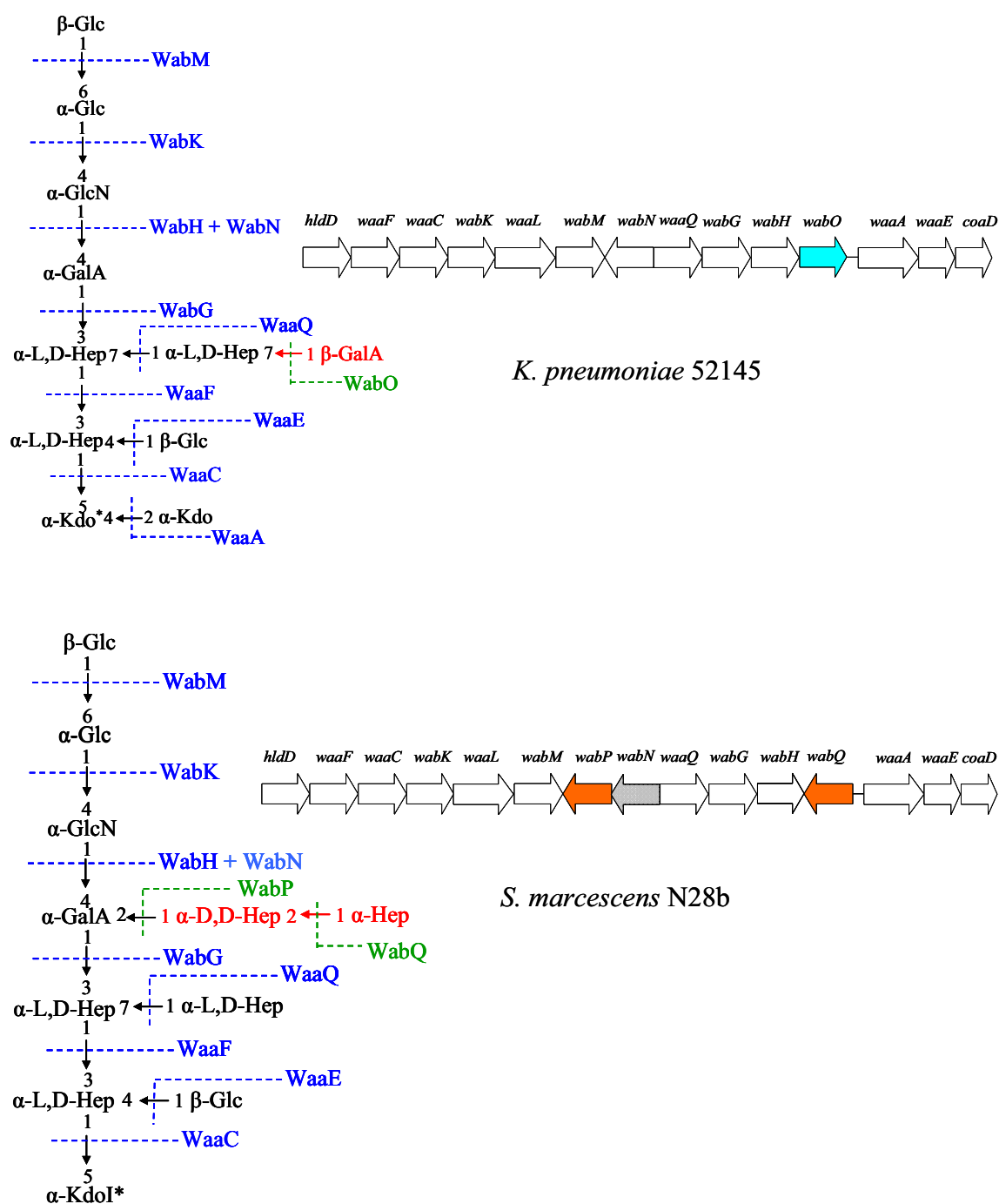


Figura 5.2. Esquema de les estructures de nucli dels LPSs de *K. pneumoniae* 52145 i de *S. marcescens* N28b i de les respectives agrupacions gèniques *waa* que contenen els gens implicats en la seva biosíntesi

Respecte a les estructures, en blau i en verd s'indiquen els enzims implicats en la biosíntesi del nucli del LPS comuns i diferents respectivament entre ambdós bacteris mentre que en vermell es mostren els trets estructurals diferents. Referent a les agrupacions gèniques, en color es mostren els gens diferents entre ambdues agrupacions. En gris s'indica el gen *wabN* de *S. marcescens* N28b localitzat a la presumpta regió intergènica i identificat recentment pel nostre grup d'investigació (Regué *et al.*, 2005a)

Els estudis realitzats sobre *orf13* (*waaE*) han permès determinar que aquest gen codifica per la transferasa implicada en la transferència del residu de β -Glc ramificat a l'HepI (veure Figura 5.2). Al no afectar a la cadena principal del nucli del LPS, mutacions en el gen *waaE* no impedeixen la unió de l'antigen O a nivell de nucli extern, tal i com s'observa en el mutant N28b Δ *waaE*. No obstant, el LPS d'aquest mutant conté menors quantitats d'antigen O que la soca salvatge N28b, la qual cosa podria explicar certes característiques fenotípiques observades en aquest mutant com la disminució de la capacitat de “*swarming*” o de formar biofilms *in vitro* o la modificació d'alguns fenotips patogènics tals com una disminució de la capacitat d'adhesió a les cèl·lules uroepiteliales o de colonització i infecció del tracte urinari en rates, que també s'observen en mutants del gen *waaE* de *Proteus mirabilis* i *K. pneumoniae* (Izquierdo *et al.*, 2002). Tot i així, no es pot descartar que l'aparició d'aquests fenotips sigui conseqüència directe de l'absència del residu de β -Glc unit a la posició O-4 de l'HepI, ja que mutants en el gen *waaP* de *E. coli* F470 i de *S. enterica* sv. Typhimurium, en els que com a conseqüència de la mutació està impedita la incorporació d'un grup fosfat o pirofosfoetanolamina en l'HepI del seu LPS, presenten també un patró de migració alterat del seu LPS en gels de Tricina-SDS-PAGE i una reducció de la quantitat d'antigen O. A més, el mutant *waaP* de *S. enterica* sv. Typhimurium presenta una reducció de la seva virulència *in vivo* (Yethon *et al.*, 2000).

S'han identificat homòlegs del gen *waaE* a *P. mirabilis*, *Y. enterocolitica*, *K. pneumoniae* i *V. cholerae* (Izquierdo *et al.*, 2002, 2002a; Regué *et al.*, 2001). En les estructures de nucli del LPS de tots aquests bacteris s'hi troba un residu de β -Glc unit a la posició O-4 de l'HepI. A més en totes aquestes espècies, la localització del gen *waaE* en l'agrupació *waa* és sempre la mateixa, entre els gens *waaA* i *coaD* (Izquierdo *et al.*, 2002) a diferència de les agrupacions *waa* de *E. coli* i *Salmonella*, on en l'últim operó els gens *waaA* i *coaD* són contigus (Heinrichs *et al.*, 1998; Sofia *et al.*, 1994). Des d'un punt de vista clínic, també és important destacar que existeixen homòlegs del gen *waaE* en els bacteris patògens de les mucoses com *Neisseria* spp. i *Haemophilus* spp. (Kahler *et al.*, 1996; Filiatrault *et al.*, 2000), que estan també implicats en la transferència del residu de β -Glc a la posició O-4 de l'HepI del nucli intern del seu LOS. A través d'aquest residu de β -Glc s'estén la cadena α , que presenta una elevada variabilitat ja que està sotmesa a variacions de fase a fi d'evadir la resposta immune de l'hoste. En

aquests bacteris patògens, els LOSs són importants factors de virulència i malgrat la gran variabilitat antigènica, la regió del nucli intern, on es localitza la β -Glc, està bastant conservada. Per tant, el disseny de futurs inhibidors d'aquests enzims homòlegs del WaaE podria tenir una potencial aplicació terapèutica ja que s'impediria la presència del corresponent oligosacàrid i això probablement disminuiria la capacitat patògena de la soca fent-la, per exemple, més sensible a l'acció bactericida del complement.

A continuació del nucli intern, formant la cadena principal del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b es localitza el disacàrid de α -GlcN(1 \rightarrow 4)- α -GalA unit a la posició O-3 de la HepII. Aquesta estructura està també present a totes les soques de *K. pneumoniae* i a algunes de *Proteus* spp. Els resultats d'estructura i composició obtinguts pel mutant doble en comparació amb els de la soca salvatge juntament amb l'elevada homologia dels productes dels gens *orf9*_{Sm} i *orf10*_{Sm} amb els enzims implicats en la transferència d'aquests residus a *K. pneumoniae* ens han permès identificar els productes dels gens *wabG* (*orf9*_{Sm}) i *wabH* (*orf10*_{Sm}) com els responsables putatius de la transferència del residu d'àcid galacturònic i de la glucosamina respectivament, al nucli del LPS (veure Figura 5.2). Això suggeriria que es podrien trobar homòlegs d'aquests gens *wabG* i *wabH* en totes les agrupacions gèniques *waa* dels membres de la família *Enterobacteriaceae* que presentin l'estructura α -GlcN(1 \rightarrow 4)- α -GalA en el seu LPS.

El mutant doble N28b Δ orf9-orf10 (Δ *wabG-wabH*) presenta una alteració molt important del perfil electroforètic en gels de Tricina-SDS-PAGE que és fàcilment explicable si es té en compte que la mutació en el gen *wabG* implica la pèrdua de l'àcid galacturònic i per tant, de la càrrega negativa estequiomètrica a nivell de nucli, apart de la pèrdua de tot el nucli extern. En aquest sentit, és important destacar que en el nucli del LPS de *K. pneumoniae* les càrregues negatives necessàries per a l'estabilitat de la membrana externa són aportades pel grup carboxil dels residus d'àcid galacturònic (Friedrich *et al.*, 2005) i això suggereix que el mateix podria passar en el cas de *S. marcescens*. Una bona mostra d'això és el fet que mutants de *K. pneumoniae* en el gen *wabG* són sensibles als pèptids catiònics com la polimixina B i als detergents, que són característiques d'un fenotip *deep-rough* (Izquierdo *et al.*, 2003), com el que es produeix per la pèrdua de grups fosfats a *E. coli* i *Salmonella*. D'aquesta manera, el

disseny de futurs inhibidors de l'enzim WabG podria tenir una potencial aplicació terapèutica com a part integrant de cocktails antimicrobians per al grup d'enterobacteris al qual pertany *S. marcescens*, ja que al impedir l'addició de càrregues negatives estequiomètriques al nucli del LPS podrien desestabilitzar la membrana externa fent-la més permeable i afavorint la penetració de compostos antibacterians que en condicions normals no podrien utilitzar-se per la seva incapacitat de travessar les membranes externes dels bacteris gramnegatius.

D'altra banda, atès que el mutant doble N28b Δ orf9-orf10 (Δ wabG-wabH) presenta una doble mutació a nivell de cadena principal i assumint, com s'ha mencionat anteriorment, que l'antigen O s'uniria principalment al residu de β -Glc terminal del nucli extern, caldria esperar que aquest mutant doble no presentés antigen O. La presència de bandes en els gels de Tricina-SDS-PAGE en la zona on s'observaria l'antigen O creiem que és probablement deguda a l'existència en el LPS extret de contaminants procedents de polisacàrids no capsulars que es podrien trobar en les envoltures bacterianes del mutant.

En relació a la funció proposada en aquest treball pel gen *wabH* de *S. marcescens* N28b, cal mencionar els coneixements adquirits recentment. Així, estudis realitzats amb la proteïna codificada pel gen *wabH* van demostrar que catalitzava la incorporació d'un residu de N-acetilglucosamina (GlcNAc) a partir de UDP-GlcNAc al nucli extern de *K. pneumoniae* (Firdich *et al.*, 2004). Atès però que en totes les estructures conegudes d'aquest bacteri hi havia un residu de GlcN però no de GlcNAc, això feia pensar que hi havia una activitat enzimàtica addicional. Estudis realitzats en el nostre grup d'investigació van permetre identificar un nou gen *wabN* en l'agrupació *waa* de *K. pneumoniae* que codificava per una proteïna amb activitat GlcNAc deacetilasa. D'aquesta manera, es proposa que la incorporació del residu de GlcN al nucli del LPS de *K. pneumoniae* té lloc en dos passos enzimàtics; primer, la proteïna WabH, incorporaria el residu de GlcNAc al residu de GalA del nucli i seguidament, actuaria l'enzim WabN, convertint la GlcNAc incorporada en GlcN (Regué *et al.*, 2005a). Paral·lelament, en l'agrupació gènica *waa* de *S. marcescens* N28b s'identificà un homòleg del gen *wabN* de *K. pneumoniae* en la regió compresa entre el *wabP* i *waaQ* que era capaç de complementar el mutant en el gen *wabN* de *K. pneumoniae* (veure

Figura 5.2). Per tant, es pot assumir que en *S. marcescens* té lloc el mateix mecanisme d'incorporació de la GlcN al nucli del LPS i de fet, es proposa que aquest mecanisme és força comú en la biosíntesi de les regions de nucli dels LPS dels enterobacteris que contenen GlcN (Regué *et al.*, 2005a).

En l'agrupació gènica *waa* de *S. marcescens* hem identificat dues heptosiltransferases addicionals *wabP* (*orf7*) i *wabQ* (*orf11*), responsables de la transferència del residu de D,D-Hep al residu d'àcid galacturònic del nucli del LPS i de la transferència d'un residu d'heptosa (la configuració absoluta del qual no ha estat determinada) a la D,D-Hep, respectivament. Aquestes dades es correlacionen amb la presència del disacàrid de α -Hep-(1→2)- α -D,D-Hep, com a ramificació de la cadena principal del nucli del LPS de *S. marcescens* (veure Figura 5.2). Per tant, caldria esperar la presència d'homòlegs d'aquests gens en aquelles espècies de la família *Enterobacteriaceae* com algunes soques de *Proteus* spp., que presenten aquesta estructura, però ara per ara no han estat identificats. En concordança amb la funció proposada, el mutant N28b Δ orf7 (Δ *wabP*) presenta una mobilitat electroforètica en gels de Tricina-SDS-PAGE lleugerament més ràpida que la de la soca salvatge com correspondria a la pèrdua de dos residus i a més presenta antigen O, que és coherent amb el fet que la mutació afecti a una ramificació i no a un residu de la cadena principal del nucli del LPS.

Tal i com s'ha dit anteriorment, l'estructura del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b és molt similar a la de *K. pneumoniae* 52145 (Regué *et al.*, 2005), el nucli extern de la qual difereix de la resta de soques de *K. pneumoniae* estudiades. Per aquesta raó, quan es comparen les agrupacions gèniques *waa* de *S. marcescens* N28b i de *K. pneumoniae* 52145 (veure Figura 5.2), s'observa que la seva organització genètica és molt similar. Això es deu a que necessiten pràcticament les mateixes funcions enzimàtiques per a la biosíntesi de la regió del nucli dels seus LPSs. La diferència principal entre les seves estructures de nucli és precisament la presència d'aquest disacàrid d'heptoses addicional en el nucli del LPS de *S. marcescens* N28b i això es correlaciona amb el fet que aquests dos gens *wabP* (*orf7*) i *wabQ* (*orf11*), que precisament són dos gens monocistrònics transcrits en direcció oposada a la resta de gens de l'agrupació *waa*, no estan presents en l'agrupació *waa* de *K. pneumoniae* 52145 (veure Figura 5.2).

Considerant l'estructura proposada per *S. marcescens* N28b, a l'extrem del nucli extern s'hi troba un disacàrid de β -Glc-(1 \rightarrow 6)- α -Glc unit a la posició O-4 de la GlcN, que també està present al LPS de *K. pneumoniae* 52145 (veure Figura 5.2). Tenint en compte que les proteïnes codificades per les *orf4* i *orf6* restants presenten característiques pròpies de les glicosiltransferases de la família 4 (CAZY) corresponents a enzims que retenen la configuració i a la família 2 (CAZY) corresponents a enzims que inverteixen la configuració, respectivament, proposem que els gens *orf4* (*wabK*) i *orf6* (*wabM*) codifiquen per transferases implicades en la transferència dels residus de α -Glc a la posició O-4 de la GlcN i del residu de β -Glc al residu de α -Glc del nucli extern, respectivament. En concordança amb la funció predita, el mutant N28b Δ *orf4* presenta major mobilitat electroforètica en gels de Tricina-SDS-PAGE que la soca salvatge deguda a la pèrdua de dos residus i a més no conté antigen O, com cal esperar d'una mutació que afecti a la cadena principal del nucli del LPS.

D'altra banda, els gens *orf4* (*wabK*) i *orf6* (*wabM*) de *S. marcescens* N28b presenten elevada homologia amb els gens *orf4* (*wabK*) i *orf6* (*wabM*) de *K. pneumoniae* 52145, la qual cosa es correlaciona amb la presència en ambdós LPSs del disacàrid de β -Glc-(1 \rightarrow 6)- α -Glc unit a la posició O-4 de la GlcN (veure Figura 5.2). La ubicació dels gens *orf4* (*wabK*) i *orf6* (*wabM*) de *S. marcescens* N28b i la dels seus homòlegs a *K. pneumoniae* 52145 dins les respectives agrupacions gèniques és la mateixa, flanquejant el gen *waaL*. Estudis realitzats recentment pel nostre grup d'investigació han demostrat que els gens *wabM* i *wabK* de *K. pneumoniae* 52145 estan implicats en la transferència successiva dels residus de Glc a la posició O-6 de la Glc i a la posició O-4 de la GlcN, respectivament (Regué *et al.*, 2005), i això reforça encara més la nostra hipòtesi proposada per als gens *wabK* i *wabM* de *S. marcescens* N28b.

Finalment, en referència a les substitucions no-estequiomètriques, atès que no hi ha gens dins l'agrupació gènica *waa* de *S. marcescens* N28b sense una funció assignada, cal pensar que els enzims responsables de la transferència d'aquests residus estiguin codificats per gens ubicats fora de l'agrupació *waa* o bé que alguns dels enzims amb funció assignada pugui actuar com enzim bifuncional. En el cas del Ko, es desconeixen en l'actualitat tant la biosíntesi com la regulació de l'intercanvi entre els residus de Kdo i de Ko (Holst, 2007). Es desconeix si l'enzim WaaA bifuncional capaç de transferir els

residus de Kdo tant al lípid IV_A com a un Kdo podria transferir un residu de Ko a Kdo. Pel que fa als residus d'àcid galacturònic, s'ha identificat recentment a *K. pneumoniae* un gen *wabO*, ubicat dins l'agrupació gènica *waa*, que codifica per a una proteïna responsable de la transferència d'un segon residu de β-GalA a la L,D-HepIII (Fresno *et al.*, 2007), tot i que en aquest cas no es tracta d'una substitució no-estequiomètrica. En el cas de *S. marcescens* N28b, no existeix un homòleg del gen *wabO* dins l'agrupació *waa*, però podria trobar-se fora de l'agrupació, tal i com passa a la soca HI4320 de *Proteus mirabilis* (resultats no publicats del nostre grup). Alternativament, el gen *wabG* podria actuar en alguns casos com un enzim bifuncional. Respecte a les substitucions per grups fosfats, no s'han identificat homòlegs dels gens *waaP* o *waaY* dins l'agrupació *waa*, de manera que, en cas d'haver-hi aquest tipus de substitucions, el més probable és que aquests grups fosfats poguessin estar transferits per enzims codificats per gens fora de l'agrupació *waa*.

