

cibeRes
Centro Investigación Biomédica en Red
Enfermedades Respiratorias



UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS
Facultat de Ciències
Departament de Biologia



TESIS DOCTORAL

Papel del lípido A de *Klebsiella pneumoniae* en el control de la respuesta inmune.

Tesis doctoral presentada por Verónica Martínez Moliner para optar al título de Doctora en Microbiología ambiental y Biotecnología.

Directores: Dr. José Antonio Bengoechea Alonso y Dr. Enric Llobet Brossa

Palma de Mallorca, 2014

El Dr. José Antonio Bengoechea Alonso y el Dr. Enric Llobet Brossa, como directores de la Tesis “Papel del lípido A de *Klebsiella pneumoniae* en el control de la respuesta inmune”, realizada por Verónica Martínez Moliner autorizan su presentación puesto que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Dr. José Antonio Bengoechea

Dr. Enric Llobet

Palma de Mallorca, 2014

La Doctoranda

Verónica Martínez Moliner

Este trabajo ha sido realizado gracias a un contrato del Centro de Investigaciones Biomédicas en Red Enfermedades Respiratorias (CIBERES; Programa Corporativo de Investigación en Nuevas Dianas Terapéuticas) y a un proyecto financiado por el Programa Nacional de proyectos de investigación fundamental (Plan Nacional; Ministerio de Economía y Competitividad SAF 2012-39841). CIBERES es una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III.

1. Introducción	9
1.1 El género <i>Klebsiella</i>	9
1.1.1 La especie <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
1.1.2 Importancia clínica de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
1.2 Factores de virulencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
1.2.1 Fimbrias	10
1.2.2 Proteínas de membrana externa	11
1.2.3 El polisacárido capsular (CPS)	12
1.2.4 El lipopolisacárido (LPS).....	12
1.2.4.1 El antígeno O.....	13
1.2.4.2 El núcleo del polisacárido	14
1.2.4.3 El lípido A.....	15
1.3 Síntesis del lípido A.....	16
1.3.1 Modificaciones del lípido A	18
1.3.1.1 Adición de 4-amino-deoxi-L-arabinosa (L-Ara4N).....	19
1.3.1.2 Adición de fosfoetanolamina	19
1.3.1.3 Adición de palmitato	20
1.3.1.4 Hidroxilación del lípido A.....	20
1.3.1.5 Deacilación del lípido A.....	21
1.4 Regulación de las modificaciones del lípido A: los sistemas de dos componentes	21
1.4.1 El sistema PmrAB	23
1.4.2 El sistema PhoPQ.....	25
1.4.3 El sistema RcsFCDB.....	28
1.5 Hfq.....	31
1.6 El sistema inmune innato del pulmón.....	34
1.6.1 Inmunidad celular	35
1.6.1.2 El lípido A y la inmunidad innata celular	36
1.6.2 Inmunidad humoral.....	39
1.6.2.1 El sistema del complemento	39
1.6.2.2 Proteínas y Péptidos antimicrobianos (AMP).....	40
1.7 El lípido A y otros mecanismos de resistencia frente a AMPs	43
1.8 <i>K. pneumoniae</i> y sus mecanismos de defensa frente al sistema inmune innato	44
Hipótesis y objetivos	47
Material y métodos	49
2. Material y métodos.....	51
2.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo	51
2.2 Técnicas de DNA recombinante	52
2.2.1 Caracterización rápida del DNA plasmídico a partir de colonia	53
2.2.2 Métodos de transferencia genética	53
2.2.2.1 Transformación por choque térmico en células químicamente competentes.....	53
2.2.2.2 Transformación mediante electroporación	54
2.2.2.3 Conjugación en medio sólido	55
2.2.3 Construcción de mutantes	56
2.2.3.1 Construcción de mutantes por inserción	56
2.2.3.2 Construcción de mutantes por delección	56
2.2.3.3 Eliminación del cassette de Km	59
2.2.4 Complementación del mutante hfq.....	60

2.2.5 Construcción de fusiones transcripcionales lucFF.....	60
2.3 Medida de la actividad luciferasa.....	61
2.3.1 Medida de la actividad luciferasa in vitro.....	61
2.3.2 Medida de la actividad luciferasa in vivo.....	61
2.4 Extracción de proteínas de membrana externa.....	62
2.5 Extracción de LPS para su análisis mediante SDS-PAGE.....	62
2.6 Extracción y cuantificación de CPS.....	63
2.7 Infección en el modelo murino.....	64
2.7.1 Virulencia y medida de actividad luciferasa.....	64
2.7.2 Obtención del lípido A in vivo.....	65
2.8 Extracción y análisis de lípido A.....	66
2.8.1 Extracción de lípido A mediante hidrólisis ácida.....	66
2.8.2 Extracción de lípido A en condiciones ligeramente ácidas.....	66
2.8.3 Purificación de lípido A.....	67
2.8.4 Análisis del lípido A mediante MALDI-TOF.....	69
2.9 Cultivo de macrófagos alveolares de ratón.....	69
2.9.1 Estimulación de macrófagos con lípido A para la detección de TNF α ..	70
2.9.2 Estimulación de macrófagos con lípido A para la obtención de extractos celulares para western blot.....	71
2.9.3 Estimulación de macrófagos con lípido A para la visualización de translocación de p65 al núcleo.....	71
2.10 Western blot.....	72
2.11 Ensayos de difusión radial.....	73
2.12 Ensayos de supervivencia.....	74
2.12.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria 50.....	74
2.12.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria 50 (CMI ₅₀) mediante el método de microtitulación en caldo.....	75
2.13 Ensayos de permeabilidad de membrana.....	76
2.14 Cuantificación de la expresión génica.....	76
2.14.1 Extracción de RNA de tejido.....	76
2.14.2 Extracción de RNA bacteriano.....	77
2.14.3 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	77
2.15 Estadística.....	78
3. Papel de Hfq en la regulación de las modificaciones del lípido A.....	82
3.1 Efecto de la delección de hfq en el lípido A de <i>K. pneumoniae</i>	82
3.2 Efecto de la delección de hfq en el lípido A de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium.....	84
3.3 Análisis del papel de Hfq en la regulación de la remodelación del lípido A.....	86
3.5 Estudio de la capacidad inmunoestimuladora del lípido A heptaacilado de <i>K. pneumoniae</i>	93
4. Caracterización del Lípido A de <i>K. pneumoniae</i> in vivo.....	96
4.1 Caracterización de lpxO.....	98
4.1.1 Papel de lpxO en la virulencia de <i>K. pneumoniae</i>	99
4.2 Medios de cultivo in vitro para reproducir la estructura expresada por <i>K. pneumoniae</i> en el pulmón.....	103
4.3 Regulación de la expresión de lpxO.....	107
4.4 Papel del 2-hidroxiimidato en la modulación de la respuesta inmune.....	111
4.4.1 Activación de la vía de NF κ B.....	112
4.4.2 Activación de las vías MAPKs.....	114

4.4.3 Secreción de TNF α	114
4.5 LpxO y resistencia a AMPs	115
4.5 LpxO y resistencia a colistina en cepas clínicas	121
4.6 Mecánica de la resistencia a colistina	124
Discusión	130
Conclusiones	141
Anexo.....	146
Bibliografía.....	151

1-NPN	1-N-fenilnaftilamina
AMP	Del inglés <i>Antimicrobial peptide</i>
Amp	Ampicilina
AP-1	Proteína activadora 1
BAL	Del inglés <i>Bronchoalveolar lavage</i>
BD	Beta defensina
Cm	Cloramfenicol
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CPS	Polisacárido capsular
Ct	Del inglés <i>Cycle threshold</i>
DNA	Del inglés <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Deoxiribonucleotido trifosfato
DO	Densidad óptica
DOC	Deoxicolato
EDTA	Ácido etilén-diamino tetraacético
GalA	Galactosa
GlcN	Glucosamina
HNP	Del inglés <i>Human neutrophil protein</i>
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IFN	Interferón
IKK	Del inglés <i>IκB kinase</i>
IRAK	Del inglés <i>IL-1R-associated kinases</i>
IRF	Del inglés <i>Interferon regulatory factor</i>
IκB	Inhibidor de kappa B
JNK	Del inglés <i>Jun N-terminal kinase</i>
Kb	Kilobase
Kdo	ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico
Km	Kanamicina
L-Ara4N	4-amino-deoxi-L-arabinosa
LB	Luria-Bertani
LB0	LB libre de NaCl con 10 % de sacarosa
LPS	Lipopolisacárido
MAL	Del inglés <i>MyD88-adaptor like</i>
MALDI-TOF	Del inglés <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectroscopy</i>
MAPK	Del inglés <i>Mithogen activated protein kinase</i>
MOI	Del inglés <i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	Del inglés <i>messenger RNA</i>
MyD88	Del inglés <i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NFκB	Factor nuclear kappa B
NLR	Del inglés <i>NOD-like receptor</i>
NLS	Del inglés <i>Nuclear localization signal</i>
nm	nanómetro
NOD	Del inglés <i>Nucleotide oligomerization domain</i>
° C	Grado celsius
OMP	Del inglés <i>Outer membrane protein</i>
p/v	Peso/volumen
pag	Del inglés <i>Pho-activated gene</i>
PAMP	Del inglés <i>Pathogen associated molecular pattern</i>
pb	Par de bases
PBS	Del inglés <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Del inglés <i>Polymerase chain reaction</i>
pEtN	Fosfoetanolamina

PRR	Del inglés <i>Pattern recognition receptor</i>
PxB	Polimixina B
qRT-PCR	Del inglés <i>Quantitative real time PCR</i>
RBS	Del inglés <i>Ribosome binding site</i>
Rif	Rifampicina
RNA	Del inglés <i>Ribonucleic acid</i>
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SPI	Del inglés <i>Salmonella pathogenicity island</i>
sRNA	Del inglés <i>small RNA</i>
T3SS	Del inglés <i>Type 3 secretion system</i>
TAB	Del inglés <i>TAK-1 binding protein</i>
TAK-1	Del inglés <i>Factor-β-associated kinase-1</i>
Tc	Tetraciclina
TCS	Del inglés <i>Two component system</i>
TEA	Trietilamina
TIR	Del inglés <i>Toll/interleukin-1 receptor</i>
TLR	Del inglés <i>Toll-like receptor</i>
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF	Del inglés <i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
TRAM	Del inglés <i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	Del inglés <i>TIR-domain-containing adaptor protein including interferon-β</i>
ucf	Unidades formadoras de colonias
UDP	Uridina difosfato
UMP	Uridina monofosfato
urf	Unidades relativas de fluorescencia
url	Unidades relativas de luz
UTR	Del inglés <i>Untranslated region</i>
VMM	Del inglés <i>in vitro minimal medium</i>

Introducción

1.Introducción

1.1 El género *Klebsiella*

El género *Klebsiella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos Gram negativos, no esporulados e inmóviles que pueden encontrarse de forma individual, formando pares o cadenas cortas. *Klebsiella* spp. es un género ubicuo que engloba seis especies distintas; *K. oxytoca*, *K. mobilis*, *K. planticola*, *K. granulomatis*, *K. terrigena* y *K. pneumoniae* ¹. Podemos encontrar estas especies en diversos ambientes como aguas superficiales o residuales, suelos, plantas e incluso colonizando el tracto intestinal de mamíferos ². Su DNA presenta un alto contenido en GC (entre 53-58 %). Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 37°C-40°C. Metabólicamente son anaerobias facultativas, oxidasa negativas, catalasa positivas, ureasa positivas, pueden utilizar citrato como fuente de carbono, fermentar lactosa y producen 2,3-butanodiol como producto de la fermentación de glucosa. Una propiedad que las distingue del resto de enterobacterias es la capacidad que tienen la mayoría de cepas de *Klebsiella* spp. para fijar N₂, hecho que solamente ocurre en condiciones de anoxia.

1.1.1 La especie *Klebsiella pneumoniae*

Esta especie incluye tres subespecies *K. pneumoniae* subespecie *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subespecie *ozaenae* y *K. pneumoniae* subespecie *rhinoscleromatis* ³. *K. pneumoniae* es un patógeno oportunista que causa infecciones del tracto urinario y neumonías adquiridas en la comunidad (neumonía de Friedländer). Estas neumonías afectan, preferentemente, a personas de edad avanzada o con alguna patología de base como por ejemplo diabetes o alcoholismo ⁴.

1.1.2 Importancia clínica de *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae se ha convertido a lo largo de las últimas décadas en un destacado patógeno nosocomial siendo el agente responsable de hasta el 8% de las infecciones bacterianas nosocomiales diagnosticadas en Europa y Estados Unidos. Aunque la infección por *Klebsiella* puede darse en diversas partes del organismo, el tracto urinario y el tracto respiratorio son los lugares más usuales. Concretamente, *K. pneumoniae* causa un 9% de las infecciones

del tracto urinario ^{5 6} y hasta el 60% de las neumonías de adquisición hospitalaria, especialmente en las Unidades de Cuidados Intensivos ⁷, con unos índices de mortalidad de entre el 25% y el 60% ^{8 1 9}.

La facilidad con que *K. pneumoniae* se transmite en el ambiente hospitalario la ha convertido en agente causante de serios brotes epidémicos ¹⁰. La infección sistémica es rápida y difícilmente controlable ya que el incremento de cepas multiresistentes a los antibióticos dificulta el tratamiento de estas infecciones ^{8 11 12}.

En la década de los 70 ya se aislaron cepas resistentes a aminoglicósidos ¹³ y en la década de los 80 se incrementó el número de aislamientos de cepas productoras de β -lactamasas de amplio espectro y resistentes a cefalosporinas ^{14 15}. La fácil transmisión y la elevada estabilidad de los plásmidos que contienen genes codificantes para β -lactamasas ha posibilitado la acumulación de múltiples resistencias en una misma cepa. Actualmente, la terapia más utilizada para el tratamiento de infecciones causadas por *K. pneumoniae* multiresistente implica el uso de colistina y/o tigeciclina en combinación con algún aminoglicósido ^{16 17 18}.

1.2 Factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae*

Aunque no cabe duda de la importancia clínica de *K. pneumoniae*, sus factores de virulencia todavía son poco conocidos. La mayor parte de trabajos se han centrado en el estudio de los elementos más superficiales como las fimbrias, las proteínas de membrana, el polisacárido capsular (CPS) y el lipopolisacárido (LPS).

1.2.1 Fimbrias

Un factor crítico en el proceso infeccioso es la proximidad del microorganismo a las superficies del huésped. Las fimbrias son proyecciones filamentosas no flagelares en la superficie de la bacteria que median la adhesión a los tejidos del huésped ¹. En *Klebsiella* existen dos tipos de fimbrias, las fimbrias de tipo 1 ^{19 20 21}, y las fimbrias de tipo 3 ^{22 23 24}.

Las fimbrias de tipo 1 se encuentran codificadas en un *cluster* de genes, *fim*, que codifica todos los genes necesarios para la síntesis y el ensamblaje de la fimbria ²¹. Este tipo de fimbria está compuesta por subunidades de la proteína FimA y una molécula de adhesión en el extremo, FimH, que confiere adhesión

a las moléculas glicoconjugadas del huésped que contienen manosa y la expresión de estas fimbrias está regulada por variación de fase ²⁵. Actúan como factores de virulencia en infecciones con *Klebsiella* en el tracto urinario, pero no interfieren en la habilidad de colonizar el intestino o de infectar los pulmones ²⁰.

Las fimbrias de tipo 3 se encuentran codificadas en el operón *mrk*. Estas fimbrias están formadas por subunidades de la proteína MrkA y la proteína de adhesión MrkD ²⁶. Se ha descrito que median la adhesión a células endoteliales, epitelio del tracto respiratorio y células del tracto urinario ^{22 23}.

1.2.2 Proteínas de membrana externa

Aproximadamente el 50% de la membrana externa corresponde a proteínas de membrana externa (OMPs, del inglés *outer membrane proteins*) ²⁷. Las OMPs pueden ser lipoproteínas o proteínas integrales de membrana con estructura barril β . Éstas últimas son esenciales para mantener tanto la integridad como la permeabilidad selectiva de la membrana ²⁸ y juegan un papel importante en la adaptación del microorganismo al huésped ²⁹. Entre las múltiples funciones que desempeñan las hay que confieren resistencia al efecto bactericida del suero o que forman los canales de las bombas de flujo, algunas tienen actividad proteolítica para degradar péptidos antimicrobianos (AMPs, del inglés *Antimicrobial peptides*), otras son enzimas implicadas en la modificación del lípido A o participan en los mecanismos de captación de hierro ²⁹.

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, la proteína OmpA se encuentra muy conservada ³⁰ y es una de las mejor caracterizadas. OmpA es una de las proteínas más abundantes en la membrana externa de *Klebsiella* spp., presenta estructura de barril β y tiene un papel importante en el mantenimiento de la integridad celular, en la conjugación, en la división celular y en la habilidad para invadir células de mamíferos ^{31 32}.

En nuestro grupo hemos descrito cómo la ausencia de OmpA aumenta la sensibilidad de *K. pneumoniae* frente a los péptidos antimicrobianos ³³. Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que OmpA está implicada en la activación de mecanismos bacterianos, aún por determinar, que alivian la citotoxicidad de los AMPs. Más recientemente, hemos descrito la contribución de OmpA en la atenuación de la respuesta inmune en células epiteliales del

huésped y su implicación en la supervivencia de *K. pneumoniae* en el pulmón³⁴.

1.2.3 El polisacárido capsular (CPS)

El CPS de *Klebsiella* spp. es una estructura polisacarídica que se organiza en capas sobre la superficie celular dando lugar a una matriz altamente hidratada. Se trata de un compuesto con carga negativa compuesto por repeticiones de un oligosacárido formado por 4-6 subunidades de azúcares neutros y ácidos urónicos, en distinta combinación. Esta variabilidad estructural del CPS ha permitido la clasificación de hasta 85 serotipos capsulares. Todos los aislados clínicos de *K. pneumoniae* expresan CPS en su superficie, además se ha observado una correlación entre la cantidad de CPS expresada y la virulencia del aislado^{35 36 37 38}. De hecho, los serotipos capsulares K1 y K2 son los que presentan mayor cantidad de cápsula^{1 39}, son los más virulentos en el modelo murino de infección y los más frecuentemente aislados en infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad⁴⁰. Además el tipo y cantidad de azúcar presente en el CPS también están relacionados con la virulencia^{41 42}.

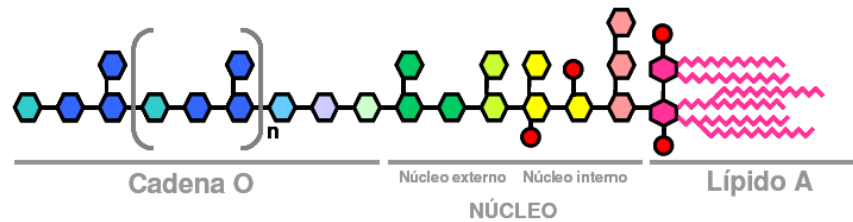
El CPS se ha relacionado con la resistencia al sistema del complemento, pues impide la deposición del componente C3^{43 36 44} sobre la bacteria. Además, el CPS actúa de escudo protegiendo a la bacteria tanto de ser fagocitada por macrófagos como de ser internalizada por células epiteliales^{36 37 45 46} y le confiere resistencia frente a los AMPs⁴⁷. Finalmente, se ha observado que el CPS en la superficie bacteriana tiene un papel relevante en la evasión del sistema inmune inducida por *K. pneumoniae*^{48 49}.

1.2.4 El lipopolisacárido (LPS)

Las bacterias Gram negativas tienen un bajo contenido de peptidoglicano en su pared celular; por este motivo la estructura responsable de mantener la homeostasis es la membrana externa, filtrando moléculas tóxicas y estableciendo el espacio periplasmático dónde se retienen enzimas hidrolíticas, proteínas de unión a diferentes sustratos y quimiorreceptores⁵⁰. La membrana externa es una bicapa lipídica asimétrica compuesta por fosfolípidos en su cara interna y por el lipopolisacárido (LPS) en su cara externa^{51 52}. Es precisamente esta asimetría la responsable de que la membrana externa funcione como barrera de permeabilidad⁵³. La mayoría de compuestos hidrofílicos son

expulsados por las porinas, en cambio los compuestos hidrofóbicos pueden atravesar la membrana externa de manera lenta. El LPS es una molécula glicolipídica que consta de tres dominios, desde el exterior hacia el interior son: el antígeno O (también llamado cadena O), el núcleo y el lípido A ⁵⁴, (**figura 1A**).

A



B



Figura 1: Representación esquemática del lipopolisacárido de una bacteria Gram negativa (A) ⁵⁵. Patrón de migración del LPS de *K. pneumoniae* en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y tinción con *Pro-Q Emerald stain kit* (B).

1.2.4.1 El antígeno O

El antígeno O es la región polisacáridica del LPS y la más expuesta al exterior. Es un polisacárido de gran variabilidad en cuanto a longitud y composición de azúcares, y presenta los determinantes antigénicos que confieren especificidad serológica al microorganismo. Las cadenas O pueden ser heteropoliméricas u homopoliméricas. Las cadenas heteropoliméricas están formadas por un número variable de repeticiones de un oligosacárido que contiene entre 2 y 8

azúcares. Por otro lado, las cadenas homopoliméricas están compuestas por “x” repeticiones de un mismo azúcar.

K. pneumoniae presenta un antígeno O homopolimérico que da lugar a un modelo de migración en forma de mancha al analizarlo mediante SDS-PAGE (**figura 1B**). Se conocen hasta 11 estructuras químicas diferentes de cadena O, sin embargo el número de estructuras que pueden ser discriminadas mediante métodos inmunológicos apenas alcanza la cifra de 9 debido a la existencia de motivos estructurales similares que producen reacciones serológicas cruzadas. Así, los serotipos descritos en *K. pneumoniae* son O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8, y O12. El serotipo O1 es el más común entre los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* ⁵⁶.

La cadena O de *K. pneumoniae* tiene un papel principal en la resistencia frente al efecto bactericida del suero ya que enmascara otras estructuras de la superficie bacteriana capaces de activar el sistema del complemento por la vía clásica, como son el lípido A y las porinas ⁵⁷. Por su parte, la cadena O activa principalmente la vía alternativa del sistema del complemento aunque impide la activación de la vía clásica, evitando la formación del complejo de ataque a la membrana y la lisis del microorganismo ⁵⁸.

Varios estudios han examinado la importancia de la cadena O en la virulencia de *K. pneumoniae* aunque con resultados contradictorios. Por un lado, utilizando un modelo de neumonía en ratón, dos estudios no encontraron diferencias entre la virulencia de la cepa silvestre y la de un mutante que no expresaba cadena O ^{37 59}, mientras que otro trabajo concluyó que un mutante sin cadena O es incapaz de diseminarse más allá del tracto respiratorio ⁶⁰.

1.2.4.2 El núcleo del polisacárido

El núcleo es el punto de unión entre el antígeno O y el lípido A. Es la región más conservada del polisacárido, especialmente dentro de la misma familia de bacterias ⁶¹. El núcleo del polisacárido se subdivide en núcleo externo y núcleo interno, siendo éste último el que se ancla al lípido A (**figura 1A**).

En *K. pneumoniae* el núcleo externo está formado por hexosas como glucosa, galactosa o glucosamina; mientras que el núcleo interno contiene heptosas y Kdo (ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico) ^{62 63}. La mayoría de *Enterobacteriaceae* estudiadas presenta grupos fosfatos substituyendo las

heptosas, en cambio las heptosas de *K. pneumoniae* se encuentran substituidas con residuos de ácido galacturónico. Estas substituciones confieren estabilidad a la membrana externa y sirven de punto de anclaje del polisacárido capsular^{64 65 59 66 67}.

En *K. pneumoniae* hay dos tipos de núcleos externos, denominados tipo 1 y 2 (**figura 2**), que se diferencian en las substituciones que presenta el residuo de glucosamina en el disacárido proximal del núcleo externo (GlcN-(1,4)-GalA). En los núcleos de tipo 1 la glucosamina está substituida en la posición O-6 por un residuo de Kdo o por un disacárido de α -Heptosa (1-4)- α -Kdo. En cambio, en los núcleos de tipo 2 se encuentra substituida en la posición O-4 por un disacárido de β -Glucosa(1-6)- α -Glucosa.

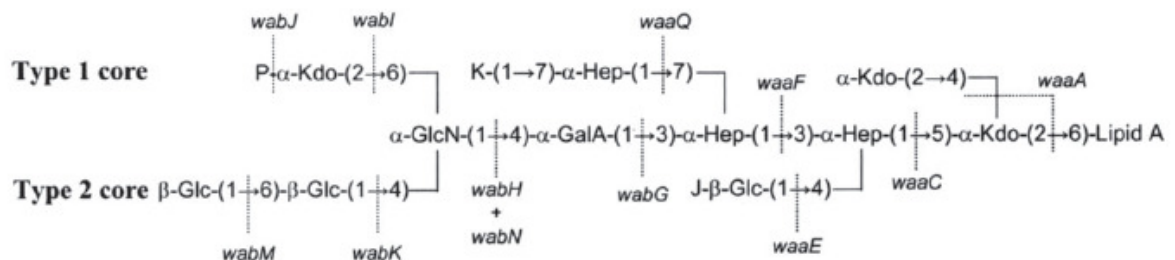


Figura 2: Estructura del núcleo del polisacárido de *K. pneumoniae*⁶⁸.

Los aislados clínicos más virulentos poseen núcleos del tipo 2^{63 69}.

En un modelo de neumonía en ratón usando mutantes en el núcleo de *K. pneumoniae*, se comprobó el aumento de virulencia a medida que el núcleo interno era más completo y concluyeron que *K. pneumoniae* necesita un LPS completo con cadena O para colonizar el tracto urinario⁵⁹.

1.2.4.3 El lípido A

El lípido A es la región hidrofóbica del LPS, posee propiedades de endotoxina y es el dominio del LPS reconocido por TLR4^{70 71}. La estructura del lípido A de *K. pneumoniae* es relativamente similar a la de otros lípidos A expresados por bacterias de la familia de las enterobacterias, es decir, un disacárido de glucosamina hexaacilado y fosforilado⁵⁴. Sin embargo, también encontramos poblaciones minoritarias de lípido A que presentan adiciones de aminoarabinosa, 2-hidroximiristato o un séptimo ácido graso (palmitato) (**figura**

4B y 4D) ^{72 73 74}. En otros patógenos, estas modificaciones están asociadas a la resistencia frente a AMPs ⁷⁵.

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la exposición a AMPs incrementa las especies minoritarias del lípido A de *Klebsiella*, poniendo de manifiesto la correlación entre el contenido de aminoarabinosa y de palmitato con una mayor resistencia de la bacteria frente a AMPs ⁷⁴. Además, también hemos comprobado que estas modificaciones son importantes para la supervivencia de *K. pneumoniae* en el pulmón ⁷⁴.

1.3 Síntesis del lípido A

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, el lípido A es la región hidrofóbica del LPS, posee propiedades de endotoxina y es el dominio del LPS reconocido por TLR4 ^{70 71}. Aunque las enzimas responsables de la síntesis del lípido A se encuentran conservadas en las bacterias Gram negativas, existe una gran heterogeneidad en cuanto al grado de acilación, el tipo y la longitud de los ácidos grasos que lo forman y la presencia de decoraciones tales como la adición de aminoarabinosa o fosfoetanolamina ⁵⁴. Las 9 enzimas constitutivas implicadas en la síntesis del lípido A son intracelulares y están presentes en prácticamente todas las bacterias Gram negativas. Los genes que las codifican generalmente se encuentran repartidos en el genoma en copia única y en general no están sujetos a ningún tipo de regulación ^{54 76}. En cambio, la mayoría de enzimas responsables de las modificaciones del lípido A son extracitoplasmáticas, varían de un organismo a otro y su expresión suele estar regulada por las condiciones extracelulares ^{77 78 79 80 81}. En la **figura 3** se muestra la ruta de síntesis del lípido A en *Escherichia coli*, que se considera conservada en la mayoría de las bacterias Gram negativas. La síntesis empieza en la cara interna de la membrana citoplasmática con una reacción catalizada por la enzima LpxA, que añade una cadena de hidroximiristato (3-OH-C₁₄) a una molécula de UDP-N-acetilglucosamina para formar UDP-3-O-monoacil-N-acetilglucosamina. A continuación, la deacetilasa LpxC elimina el grupo acetilo y la aciltransferasa LpxD incorpora otra molécula de 3-OH-C₁₄, dando lugar así a una molécula de UDP-2,3-diacilglucosamina. Sobre esta molécula actúa la hidrolasa LpxH que da lugar a UMP y 2,3-diacilglucosamina-1-P (lípido X). Seguidamente, LpxB condensa mediante enlace β1-6 una

molécula de UDP-2,3-diacilglucosamina con una molécula de lípido X generando así el disacárido. La posición 4' del disacárido es fosforilada por la enzima LpxK dando lugar al lípido IV_A⁸². Sobre el lípido IV_A la enzima KdtA (WaaA) incorpora dos residuos de Kdo, imprescindibles para que las aciltransferasas LpxL y LpxM añadan las acilaciones secundarias de laureato (en posición 2') y miristato (en posición 3')^{83 84}, respectivamente, dando lugar así a un lípido A hexaacilado.

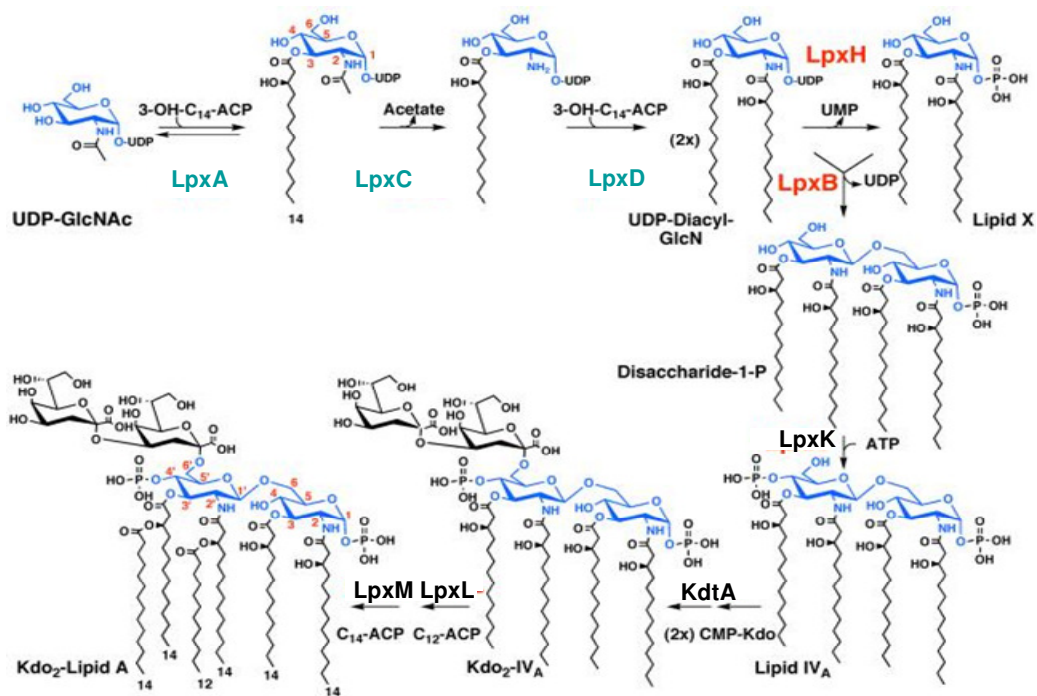


Figura 3: Representación esquemática de la biosíntesis del lípido A en *E. coli*⁸⁵. En verde se representan las enzimas solubles, en color rojo las enzimas periféricas de membrana y en negro las enzimas integrales de membrana.

El lípido A de *E. coli* (m/z 1797) es un disacárido de glucosamina unido mediante enlace β (1'-6) y se encuentra fosforilado en los carbonos 1 y 4'. Las posiciones 2, 2', 3 y 3' están aciladas, mediante enlace éster o amida, con residuos de 3-hidroximiristato (3-OH-C₁₄). Los ácidos grasos en las posiciones 2' y 3' se encuentran a su vez esterificados con laureato (C₁₂) y miristato (C₁₄) respectivamente (**figura 4A y 4C**)⁵⁴. El lípido A de *K. pneumoniae* (**figura 4B y 4D**) presenta mayoritariamente una estructura hexaacilada (m/z 1824) que consta de 2 glucosaminas, 2 fosfatos, 4 cadenas de 3-OH-C₁₄ y dos C₁₄.

Pueden encontrarse especies minoritarias consistentes con la adición de aminoarabinosa (m/z 1955) o de palmitato (m/z 2036 y 2063)^{72 73 74}.

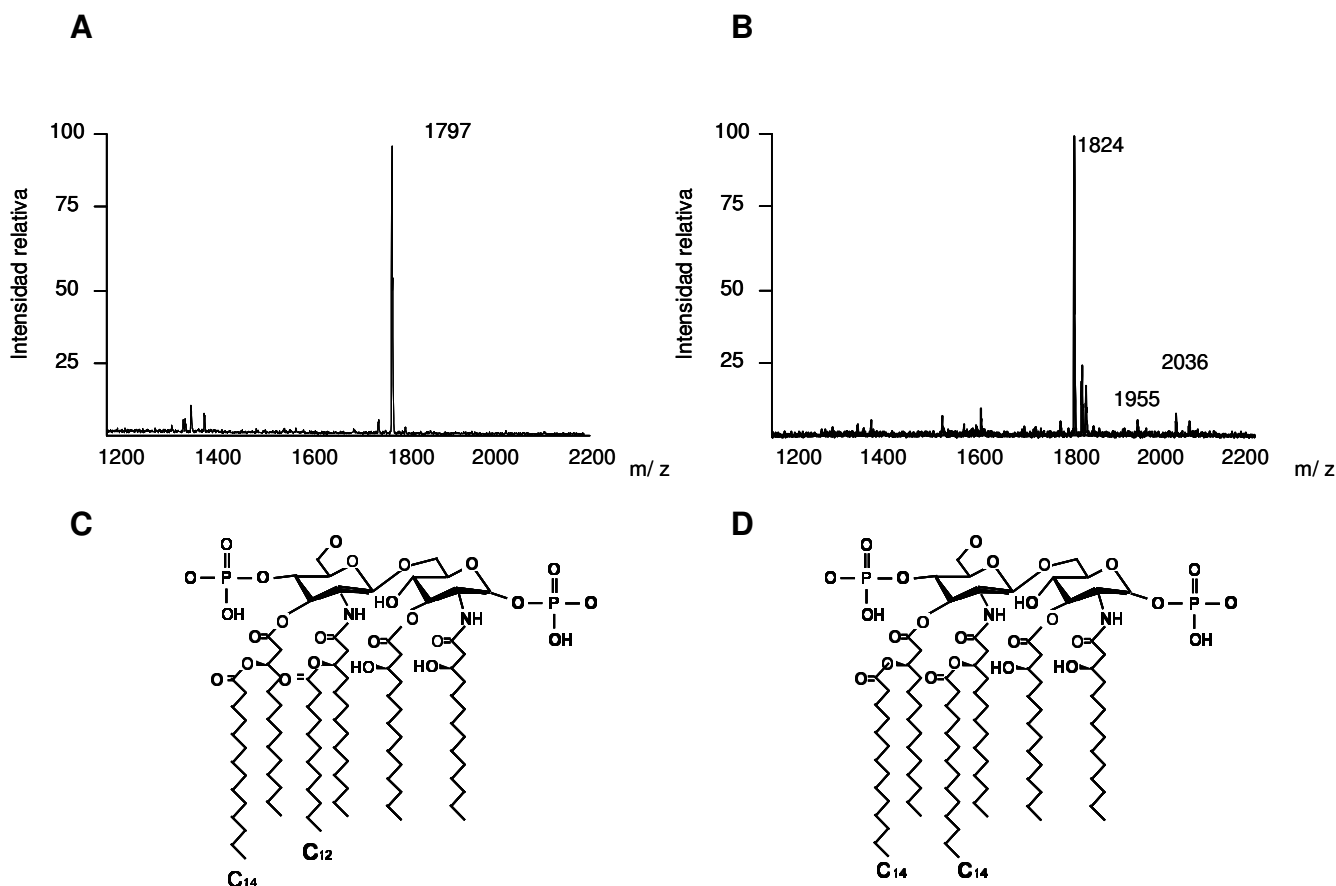


Figura 4: Espectrometría de masas del lípido A de *E. coli* (A) y de *K. pneumoniae* 52145 (B) cultivadas en LB a 37° C obtenida mediante MALDI-TOF. Representación de la estructura del lípido A mayoritario en *E. coli*, correspondiente al pico de m/z 1797 (C), y en *K. pneumoniae*, correspondiente al pico de m/z 1824 (D).

1.3.1 Modificaciones del lípido A

Como ya se ha comentado, a pesar de que las enzimas responsables de la síntesis del lípido A están altamente conservadas en las bacterias Gram negativas⁵⁴, existe heterogeneidad en cuanto al grado de acilación y la presencia de decoraciones tales como la adición de aminoarabinosa, de fosfoetanolamina, de palmitato, así como el grado de hidroxilación de los ácidos grasos secundarios presentes. A continuación se describen las más relevantes de estas modificaciones. En la figura 5 se muestran estas enzimas y las modificaciones que llevan a cabo.

1.3.1.1 Adición de 4-amino-deoxi-L-arabinosa (L-Ara4N)

Los genes necesarios para la biosíntesis y la adición de aminoarabinosa (L-Ara4N) al lípido A están codificados en el operón *arnBCADTEF* (*pmrHFIJKLM*). Este operón está directamente inducido por el sistema de transducción de señales de dos componentes PmrAB^{80 86 87}, y tanto directa como indirectamente por el sistema PhoPQ^{88 89}.

El primer paso para la biosíntesis de L-Ara4N es la conversión de UDP-glucosa a UDP-ácido glucurónico, reacción catalizada por la deshidrogenasa Ugd. Este UDP-ácido glucurónico es también el precursor del ácido D-glucurónico, el elemento estructural del polisacárido capsular^{90 85 91}. A continuación, siguen una serie de reacciones de descarboxilación, transaminación y formilación hasta que la molécula formilada de UDP-β-L-Ara4FN es transferida al aceptor undecaprenil fosfato (en la membrana interna). Tras ser deformilada, la molécula de undecaprenil fosfato-L-Ara4N es transportada a la membrana externa y el residuo de L-Ara4N es transferido al lípido A, preferentemente al fosfato en la posición 4'^{90 92 93 94}. Esta adición de L-Ara4N al lípido A reduce las cargas negativas presentes en la superficie bacteriana confiriendo resistencia frente a polimixina B (PxB) y otros AMPs^{77 74}. En *K. pneumoniae* la adición de L-Ara4N participa en la supervivencia de la bacteria durante el proceso de fagocitosis, tanto en macrófagos alveolares (MH-S) como en el modelo de la ameba *Dictyostelium discoideum*⁹⁵.

1.3.1.2 Adición de fosfoetanolamina

La enzima responsable de la adición de fosfoetanolamina (pEtN) es la enzima PmrC (EptA) localizada en la membrana interna. Añade pEtN principalmente al fosfato en la posición 1 del lípido A⁹⁶; aunque en ocasiones puede añadir pEtN en la posición 4', como por ejemplo en ausencia de L-Ara4N⁸⁰. Al igual que ocurre con la L-Ara4N, la adición de pEtN también está inducida por el sistema PmrAB^{80 86 87}, y directa e indirectamente por el sistema PhoPQ^{88 89} y, al igual que la adición de L-Ara4N, también reduce las cargas negativas de superficie de la célula. En *Acinetobacter baumannii*, la adición de pEtN confiere resistencia a colistina⁹⁷. En el caso de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium la delección de *pmrC* no afecta a su virulencia en el modelo murino de infección, ni tiene un efecto drástico en su susceptibilidad frente a PxB⁹⁸. Sin embargo, no

puede descartarse el que algunas de las modificaciones del LPS mediadas por el sistema PmrAB se hallen implicadas en reducir el reconocimiento de la bacteria por parte del sistema inmune innato del huésped ⁹⁹.

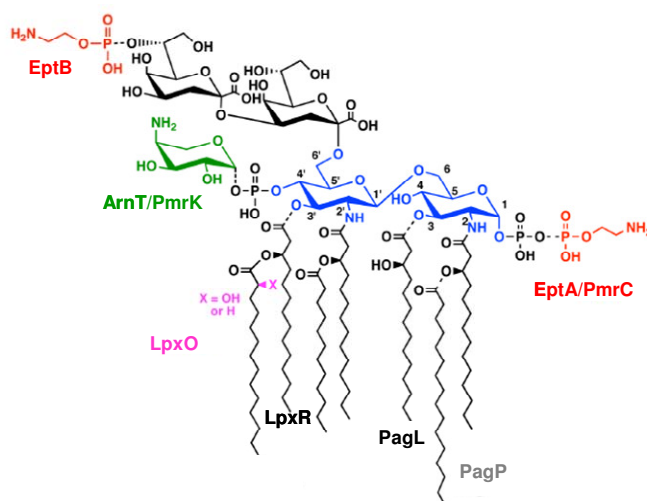


Figura 5: Representación de la estructura del lípido A con las posibles modificaciones y las enzimas que catalizan cada una de las reacciones ⁸⁵. EptB transfiere fosfoetanolamina al residuo distal de Kdo ¹⁰⁰.

1.3.1.3 Adición de palmitato

La adición de palmitato está catalizada por la aciltransferasa PagP ^{101 102} cuya expresión se encuentra bajo el control del sistema de dos componentes PhoPQ ¹⁰³ (o del regulón Bvg en el caso de *Bordetella bronchiseptica* ¹⁰⁴). PagP se localiza en la membrana externa donde utiliza los fosfolípidos como donadores de grupos palmitato ¹⁰⁵. El gen *pagP* se encuentra distribuido en un estrecho rango de bacterias patógenas ¹⁰⁶. La adición de palmitato confiere resistencia frente a ciertos tipos de AMPs en *Legionella pneumophila* o *Yersinia enterocolitica* ^{107 108}, confiere resistencia a la lisis mediada por el complemento en *B. bronchiseptica* ¹⁰⁴. En *K. pneumoniae*, la adición de palmitato confiere resistencia frente a magainina II y juega un papel importante en la supervivencia de la bacteria durante la interacción tanto con MH-S como con la ameba *D. discoideum* ^{74 55 95}.

1.3.1.4 Hidroxilación del lípido A

LpxO es una dioxigenasa localizada en la membrana interna que utiliza Fe²⁺ y α-ketoglutarato como cofactores. Esta enzima es responsable de la 2-hidroxilación del ácido graso secundario en la posición 3' en *S. Typhimurium* y

su expresión es parcialmente dependiente del sistema PhoPQ^{109 78 102}. También se ha descrito la presencia de LpxO en otras bacterias como *B. bronchiseptica* y *K. pneumoniae*^{110 73 111}. Estas hidroxilaciones de los ácidos grasos contribuyen a estabilizar la membrana externa mediante la creación de puentes de hidrógeno entre distintas moléculas de lípido A^{109 112 113}. En *S. Typhimurium* se ha demostrado que la 2-hidroxilación es importante en el proceso de invasión de células epiteliales pero no participa en la resistencia a PxB¹¹⁴.

1.3.1.5 Deacilación del lípido A

En *S. Typhimurium* se han descrito las lipasas de membrana externa LpxR y PagL como responsables de la deacilación del lípido A. LpxR deacila el lípido A eliminando el ácido graso en posición 3'¹¹⁵, mientras que PagL elimina el ácido graso de la posición 3¹¹⁶. Se ha descrito que PagL está bajo el control del sistema PhoPQ¹¹⁶. Estas dos enzimas en *S. Typhimurium* son latentes, lo que indica la presencia de inhibidores endógenos que impiden su función, como la L-Ara4N¹¹⁷. De hecho, nuestro grupo ha demostrado recientemente que en *Y. enterocolitica* O8 la presencia de L-Ara4N inhibe la actividad de LpxR. En este trabajo también comprobamos que la expresión de LpxR está regulada por los sistemas PhoPQ y PmrAB¹¹⁸.

Aunque la deacilación podría estar asociada a una menor capacidad inmunogénica del LPS^{119 120 121}, cabe resaltar que la distribución de PagL no se encuentra restringida solamente a microorganismos patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* o *S. Typhimurium*¹⁰⁷, si no que podemos encontrar esta proteína en bacterias ambientales como, por ejemplo, *Azotobacter vinelandii*, y jugaría un papel en la permeabilidad de la membrana frente a compuestos hidrofóbicos¹²².

1.4 Regulación de las modificaciones del lípido A: los sistemas de dos componentes

En bacterias, los sistemas de dos componentes (TCS, del inglés *two component system*) son aparatos de transducción de señales involucrados en la regulación de una gran multitud de procesos que permiten que el microorganismo responda y se adapte a las condiciones cambiantes del medio donde crece. Principalmente, la respuesta adaptativa a estos estímulos

ambientales es a través de cambios en la expresión génica ¹²³. En la actualidad, se han identificado más de 4000 TCS en los genomas bacterianos secuenciados hasta la fecha, hecho que demuestra la importancia de los TCS para la adaptación a los diferentes nichos ¹²⁴. Se ha encontrado una relación positiva entre el tamaño del genoma y el número de TCS codificados. De manera similar, las bacterias que tienen una gran versatilidad metabólica, como las ambientales, poseen mayor variedad de TCS que aquellas adaptadas a vivir en un solo hábitat ¹²³; es el caso de los patógenos *Chlamydia*, *Rickettsia* y *Helicobacter pylori* ¹²³. Un caso extremo es el de *Mycoplasma genitalium* que carece de TCS pero posee sistemas tipo serina/treonina quinasa y serina/treonina fosfatasa (STK/STP) que son cruciales para su virulencia ¹²⁵. La habilidad que tienen las bacterias patógenas para adaptarse tanto a las condiciones que encuentra en el huésped como a las que encuentra fuera de él, está generalmente regulada por los TCS de manera que éstos podrían ser considerados como factores esenciales para su patogenicidad. Los sistemas de dos componentes están formados por un sensor con actividad histidina quinasa, localizado en la membrana interna, y un regulador transcripcional localizado en el citoplasma de la bacteria. Cuando el sensor detecta el estímulo, se autofosforila en un residuo conservado de histidina. Esta histidina fosforilada transfiere el fosfato a un residuo de ácido aspártico en el “dominio receptor”, situado en el extremo N-terminal, del regulador transcripcional. Esta fosforilación da lugar a un cambio conformacional que altera las propiedades de unión a DNA del factor de transcripción ¹²³. Los estímulos detectados por el sensor pueden ser tanto físicos como químicos. De este modo, los TCS responden tanto a cambios en la temperatura, presión de oxígeno, pH u osmolaridad, como a la presencia de determinados iones o al contacto con células del huésped.

Diversos trabajos muestran como las modificaciones del lípido A están reguladas principalmente por los sistemas de dos componentes PmrAB y PhoPQ ¹²⁶. En un trabajo reciente, nuestro grupo ha demostrado cómo un tercer sistema de dos componentes, el sistema RcsFCDB, juega un papel indirecto en la regulación del lípido A debido su acción sobre el sistema PhoPQ

74.

1.4.1 El sistema PmrAB

En la mayoría de *Enterobacteriaceae* el sistema de dos componentes PmrAB se encuentra codificado en el operón *pmrCAB*¹²⁷. El operón *pmrCAB* da lugar a tres productos génicos: una fosfoetanolamina fosfotransferasa (PmrC o EptA) (**figura 5**)⁹⁶, el regulador de respuesta (PmrA) y el sensor con actividad histidina quinasa (PmrB), localizado en la membrana interna⁹⁹ (**figura 6**). Se ha descrito que el sistema PmrAB regula la expresión de unos 20 genes en *Salmonella* spp., aunque esta cifra podría ser mayor según datos de *microarray*, mutagénesis y análisis *in silico*^{98 128 129}. Los promotores de los genes directamente regulados por el sistema PmrAB contienen una secuencia consenso de unión con repeticiones directas de 5'-YTTAAK-3'^{130 131}. Sin embargo, no todos los genes regulados por el sistema PmrAB contienen dicha secuencia lo que sugiere una regulación indirecta⁹⁹.

La mayoría de genes regulados por PmrAB están implicados en la remodelación del LPS y la resistencia a PxB. En bacterias patógenas como *Yersinia* spp., *P. aeruginosa* o *E. coli*, PmrA activa también los genes implicados en la adición de L-Ara4N al LPS (*ugd* y el operón *arnBCADTEF/pmrHFIJKLM*), lo cual aumenta la resistencia a AMPs^{132 133 134 135}. Sin embargo, PmrAB también regula otras funciones celulares. En *Erwinia carotovora* es crucial para su virulencia y supervivencia en plantas¹³⁶; en *L. pneumophila* y *Coxiella burnetii* controla el sistema de secreción tipo IV necesario para la transferencia de efectores de virulencia a las células del huésped¹³⁷; y en *Francisella tularensis* PmrA se ha descrito como un regulador de respuesta huérfano que regula la transcripción de genes de la isla de patogenicidad necesarios para la virulencia y para la supervivencia de la bacteria dentro del macrófago¹³⁸.

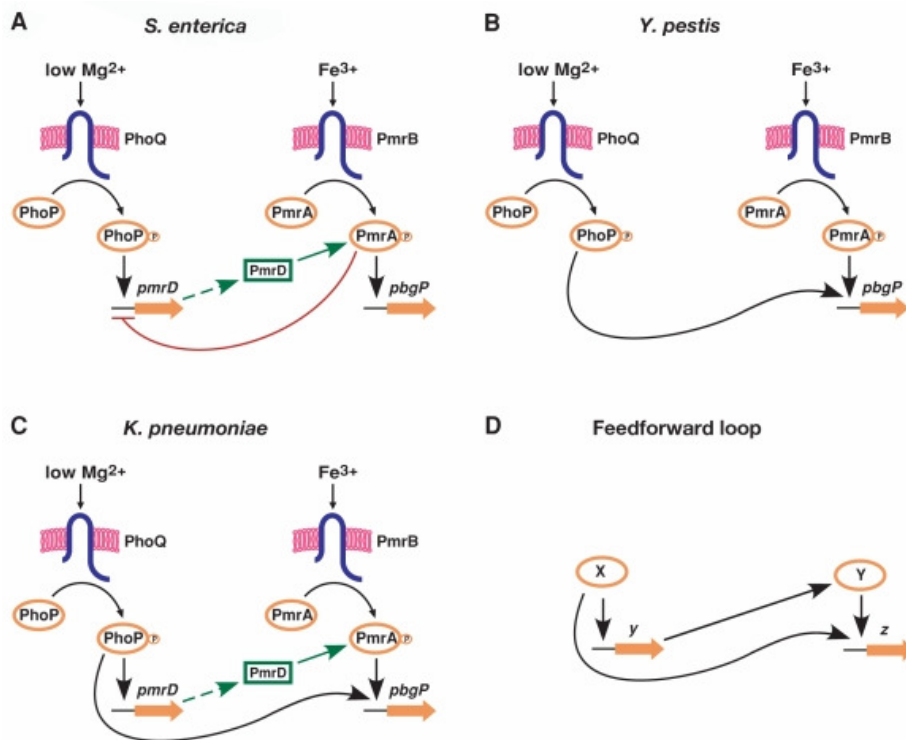


Figura 6: Modelo de la regulación del sistema PmrAB en diferentes enterobacterias.
139

En especies como *Salmonella* spp., el sistema PmrAB puede activarse de manera directa o de manera indirecta (**figura 6A**). La activación directa del sistema está mediada por PmrB. En *Salmonella* spp., la concentración de hierro férrico (Fe^{3+}), aluminio (Al^{3+}), vanadato y el pH ácido activan el sistema PmrAB a través de PmrB^{140 141}. Se ha demostrado que, *in vitro*, el sistema PmrAB juega un papel importante en la supervivencia de este patógeno frente a concentraciones elevadas de hierro y aluminio¹⁴². En cambio, la activación indirecta del regulón PmrAB ocurre a través del TCS PhoPQ, que se explicará con más detalle en el apartado 1.4.2^{88 89}. Bajo las condiciones que activan al sistema PhoPQ, se activa también la transcripción de *pmrD*, tanto en *Salmonella* spp. como en *K. pneumoniae* (**figura 6C**)¹³⁹. PmrD regula la actividad de PmrA a nivel post-transcripcional uniéndose a la forma activa de PmrA (fosforilada). De esta manera, se estabiliza la forma fosforilada de PmrA y aumenta la transcripción de los genes regulados por PmrAB^{143 144}. A su vez, PmrA regula negativamente la expresión de *pmrD*, de manera que el circuito PhoP-PmrD-PmrA queda cerrado¹⁴⁵.

En el caso de *Yersinia* spp. las modificaciones de lípido A con L-Ara4N también ocurren de forma PhoP dependiente a pesar de carecer de la proteína PmrD (**figura 6B**). Este fenómeno ocurre porque PhoP y PmrA inician la transcripción de *ugd* y del operón *pmrF* desde distintos promotores ¹⁴⁶.

Como se ha indicado al principio, la activación del sistema PmrAB da lugar también a una fosfoetanolamina fosfotransferasa (PmrC) que cataliza la adición de fosfoetanolamina en el lípido A, concretamente en el carbono en posición 1 ⁹⁶.

Recientemente hemos demostrado que en *Y. enterocolitica* O8 esta adición media la resistencia frente a PxB. En este mismo trabajo también demostramos que esta adición es independiente del sistema PmrAB ya que *pmrC* no se encuentra en el mismo operón ¹²¹.

1.4.2 El sistema PhoPQ

El sistema de dos componentes PhoPQ se encuentra codificado en el locus *phoP*. El locus *phoP* fue descrito por primera vez en *S. Typhimurium* como un sistema que controla la expresión de una fosfatasa ácida no específica, de ahí que el locus se designara *pho* (asociado al metabolismo del fosfato) ¹⁴⁷. Este sistema media la adaptación de la bacteria cuando el Mg^{2+} es un factor limitante y controla la expresión de factores de virulencia en muchas bacterias Gram negativas así como modificaciones de la envuelta celular ⁷⁹. Este TCS está compuesto por un sensor en la membrana interna, PhoQ, y un regulador citoplasmático, PhoP (**figura 7**). PhoQ posee dos regiones transmembrana que dan lugar a un dominio periplasmático y a una cola citoplasmática. El dominio periplasmático alberga varios residuos ácidos que serían los responsables de detectar los niveles de cationes divalentes. Principalmente la presencia extracelular de Mg^{2+} , aunque también el Ca^{2+} o el Mn^{2+} , sirve de señal para inducir la fosforilación del dominio citoplasmático de PhoQ y la desfosforilación de PhoP. Se ha propuesto que en condiciones de elevada concentración de Mg^{2+} , la fosforilación de PhoQ (histidina 243) implica la transferencia del fosfato en el residuo de aspartato 57 de PhoP y la represión de los genes regulados por PhoP ^{148 149 150}. Por otro lado, y a concentraciones de Mg^{2+} fisiológicas (1-2 mM), la presencia de AMPs es capaz de activar la actividad quinasa de PhoQ

81

Dado que el pH ácido favorece la transcripción de algunos genes regulados por el sistema PhoPQ en *Salmonella* spp., antiguamente se había propuesto a PhoQ como sensor de pH ¹⁵¹ sin embargo, esta idea se ha desestimado ya que estos genes siguen activándose en un mutante *phoQ* cuando crece en medio ácido ^{149 88}.

En cuanto a la regulación de la expresión de este sistema, se ha descrito que los niveles de PhoP y de PhoQ regulan de manera positiva la expresión del operón (*phoPQ*) tanto en *E. coli* K-12 como en *Salmonella* spp. ^{152 153}. Este operón se transcribe desde dos promotores diferentes; uno es constitutivo y el otro solamente es activo cuando la concentración de Mg²⁺ es limitante, del orden de micromolar, y es dependiente de los niveles de PhoP y PhoQ ¹⁴⁹. En *E. coli*, el promotor proximal a *phoP* es el promotor inducible ¹⁵², mientras que en *Salmonella* spp. es el promotor distal a *phoP* el que está regulado por los niveles de Mg²⁺, de PhoP y PhoQ ¹⁵³. De la misma manera, en *P. aeruginosa* la transcripción del operón *phoPQ* puede iniciarse desde dos promotores distintos. Uno de ellos está regulado por la concentración de Mg²⁺ y por PhoP, originando un transcrito policistrónico para expresar tanto *phoP* y *phoQ* como *oprH* (gen que precede al operón y que codifica para la proteína de membrana OprH). El otro promotor está situado dentro de *oprH* (o “corriente abajo”), y da lugar a niveles basales de transcripción de *phoP* y *phoQ* ¹⁵⁴.

Como se ha comentado en el apartado 1.4.1, PhoP activa la transcripción de *pmrD*. La proteína PmrD estabiliza la forma fosforilada de PmrA favoreciendo que se transcriban los genes necesarios para la síntesis y la adición de L-Ara4N al lípido A ^{88 89 139 143 144}, así como otros genes necesarios para el crecimiento de la bacteria en medio sólido con bajo Mg²⁺ ¹⁵⁵.

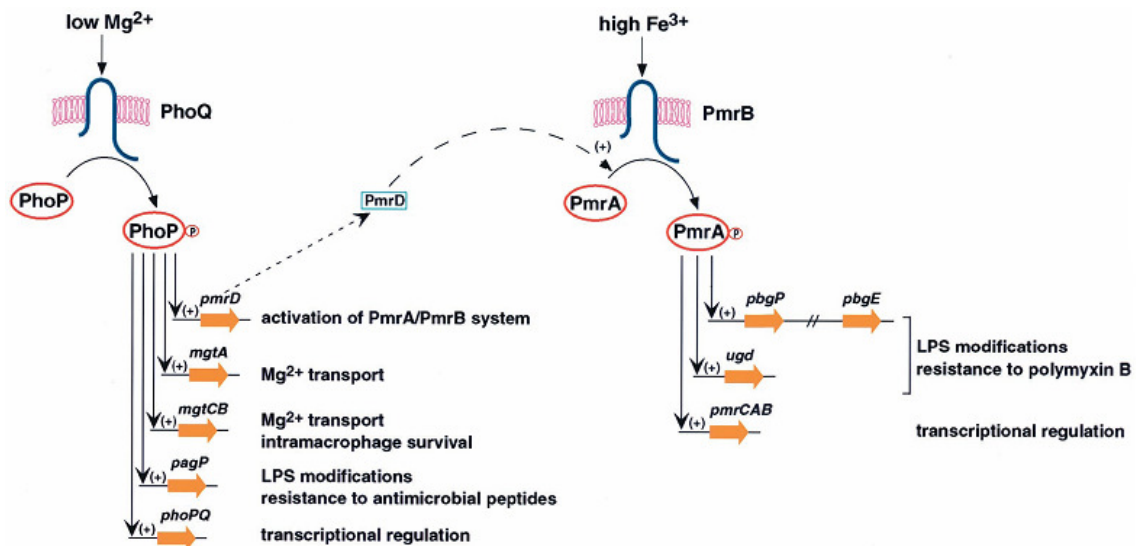


Figura 7: Modelo de la regulación de los sistemas PhoPQ y PmrAB ⁷⁹.

PhoPQ regula directamente otros genes responsables de modificaciones del lípido A independientemente de PmrA como son los genes *pagP* ¹⁰⁵, *pagL* ¹¹⁰ ¹⁵⁶ y *lpxO* ¹⁰².

PagP es la aciltransferasa responsable de la adición de palmitato al lípido A ¹⁰⁵. Se ha descrito en *Salmonella* spp. que esta modificación reduce la capacidad del LPS para activar el receptor TLR4 ¹⁵⁷ ¹²⁰ ¹⁵⁸ y le confiere resistencia a ciertos tipos de AMPs ¹⁵⁹ ¹⁰². De la misma forma, en otras *Enterobacteriaceae* como *K. pneumoniae* o *Y. enterocolitica* O:8, la adición de palmitato aumenta la resistencia de estos microorganismos frente a AMPs como por ejemplo la magainina II ⁷⁴ ¹⁰².

PagL es la deacilasa que elimina cadenas de ácido hidroxidecanoico en bacterias como *B. bronchiseptica* ¹¹⁰ o *P. aeruginosa* ¹⁵⁶. Una de las implicaciones de la deacilación del lípido A es un menor reconocimiento por el receptor TLR4 ¹⁶⁰ ¹²⁰.

LpxO es la enzima responsable de la 2-hidroxilación del ácido graso secundario en posición 3' y su expresión también se encuentra bajo el control de este sistema, al menos en *S. Typhimurium* ¹⁰². Esta modificación estabiliza la membrana externa ¹⁰⁹ ¹¹² ¹¹³.

En general, estas modificaciones mediadas por el sistema PhoPQ están destinadas a crear una membrana externa más estable e impermeable frente a

agentes antimicrobianos cuando la bacteria se encuentra en un medio de cultivo con una baja concentración de cationes divalentes ¹¹³.

A parte de las modificaciones de lípido A, el sistema PhoPQ activa otros genes para mediar la adaptación a bajas concentraciones de Mg²⁺, como es el caso de *Salmonella* spp en la que activa la transcripción de *mgtA* y *mgtB* que codifican para 2 transportadores de Mg²⁺ ¹⁶¹. También en *Salmonella* spp., PhoPQ activa la remodelación del peptidoglicano mediante D-alanilación cuando ésta crece en las células epiteliales del huésped ¹⁶² y regula la expresión de los T3SS (del inglés *Type 3 secretion system*) codificados en las SPI-1 y SPI-2 (del inglés *Salmonella pathogenicity island*) ^{79 163}. Se ha descrito que en muchas bacterias Gram negativas controla la expresión de factores de virulencia así como otras modificaciones de la envuelta celular ⁷⁹.

1.4.3 El sistema RcsFCDB

El sistema Rcs (del inglés *Regulator of capsule synthesis*) fue descrito inicialmente en *E. coli* por su papel en la regulación de los genes responsables de la síntesis del polisacárido capsular ^{164 165 166}. Sin embargo, se ha demostrado su importancia en la regulación de distintos procesos fisiológicos en otras bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, comensales y patógenas, que colonizan el tracto digestivo ^{167 168 169}. Por ejemplo controla la división celular, la síntesis del flagelo, la formación de *biofilms* y la síntesis de proteínas necesarias para la invasión en *S. Typhi* ^{170 171 172 173 174 175}, la expresión del operón *tolQRA* y la síntesis de la proteína de membrana externa OsmC de *E. coli* ^{176 177} o la regulación del *swarming* en *Proteus mirabilis* ^{178 179}, *E coli* ^{180 181} y *S. Typhi* ¹⁸¹. Diversos factores pueden activar el sistema Rcs *in vitro* entre ellos la baja temperatura, la elevada osmolaridad del medio, una elevada concentración de Zn²⁺, el cultivo en medio sólido y perturbaciones en el peptidoglicano causadas por la presencia de antibióticos β-lactámicos, AMPs o por lisozima ^{182 183 184 185 186 187 188 189}.

Rcs es un sistema complejo que consta de varios componentes de fosforilación y en el que el regulador transcripcional puede actuar tanto sólo como asociado a reguladores auxiliares (**figura 8**):

RcsF es una lipoproteína anclada en la membrana externa que transduce señales desde la superficie celular hasta RcsC^{190 184}.

El sensor RcsC es una proteína de membrana interna que presenta un dominio histidina quinasa y un dominio aceptor de fosfato (un residuo conservado de aspartato)¹⁶⁶.

RcsD, que fue inicialmente identificada como YojN, también es una proteína localizada en la membrana interna que contiene un dominio Hpt (del inglés *histidine phosphotransfer*) encargado de aceptar el fosfato de RcsC y transferirlo al regulador de respuesta RcsB¹⁹¹.

RcsB puede regular la transcripción de sus genes diana de dos maneras distintas; formando un homodímero y uniéndose a la región promotora del gen diana, o uniéndose al promotor usando la proteína auxiliar RcsA¹⁶⁸. Además RcsB puede actuar junto con PhoP bajo ciertas condiciones ambientales, tales como baja concentración de Mg^{2+} o elevadas concentraciones de Fe^{3+} , hecho que permitiría regular de una manera más fina los genes activados por el sistema Rcs¹⁹².

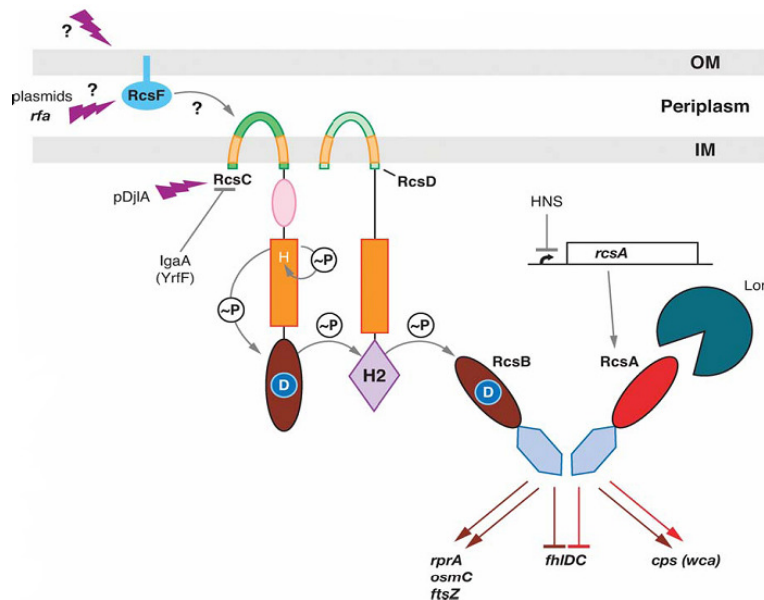


Figura 8: Modelo de la transducción de señales en el sistema Rcs. En marrón se indica la regulación dependiente del homodímero RcsB. En rojo se indica la regulación dependiente del heterodímero RcsA/RcsB¹⁶⁸.

Existe una estricta regulación entre los sistemas PhoPQ y RcsFCDB ¹⁹³. Cuando el sistema Rcs se activa, RcsB favorece la síntesis del sRNA (del inglés *small RNA*) RprA que es un activador de la traducción de RpoS ¹⁹⁴. A su vez, RpoS modula negativamente la expresión de *phoP*. De los genes regulados por PhoP, el único que no ve afectada su expresión es *ugd* ¹⁹³ ya que, como se ha comentado en el apartado 1.3.1.1, su producto génico está implicado también en la síntesis del polisacárido capsular ⁹¹. A su vez, la proteína IgaA (del inglés *Intracellular growth attenuator*) en *S. Typhimurium* ejerce una fuerte inhibición sobre el sistema Rcs y por tanto favorece la expresión de los genes activados por PhoPQ ¹⁹³.

En *K. pneumoniae* también se da esta regulación entre RcsFCDB y PhoPQ. Al activarse el sistema PhoPQ, se promueve la transcripción del sistema *rsc*, mientras que Rcs reprime la transcripción de *phoP* ⁷⁴.

En la **figura 9** se resumen, de manera general, los TCS comentados, algunas de las señales que detectan así como algunos de los genes que regulan.

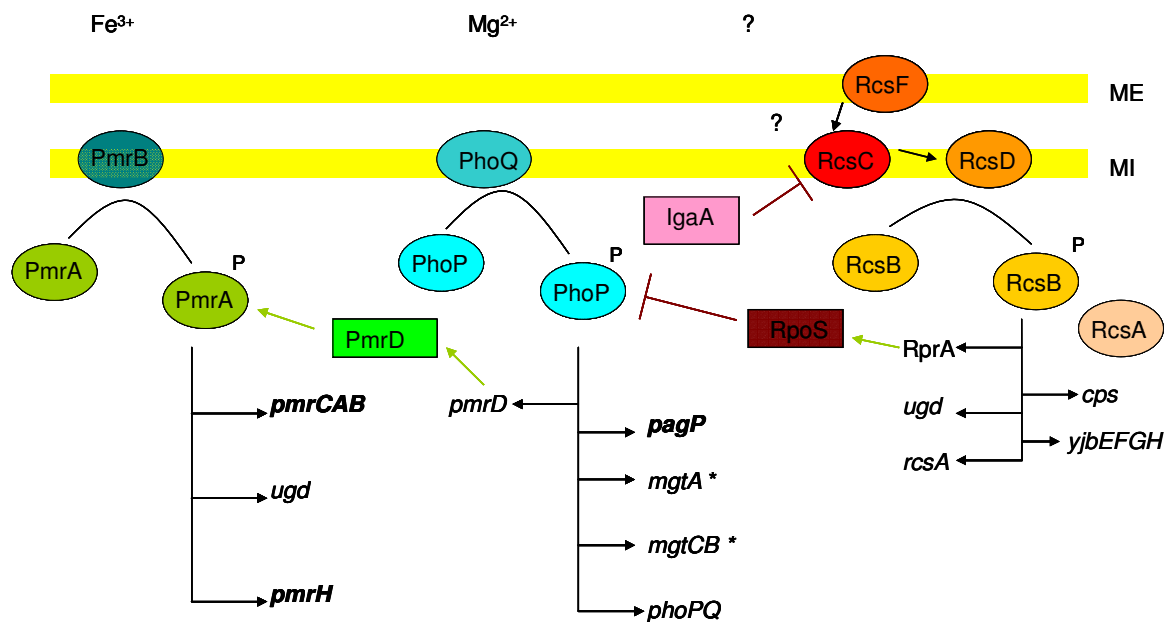


Figura 9: Resumen de los TCS PmrAB, PhoPQ y RcsFCDB. ME membrana externa, MI membrana interna. Las flechas verdes indican activación de la transcripción mientras que las líneas marrones indican represión. En negrita se indican los genes responsables de las modificaciones del lípido A, los asteriscos hacen referencia a otros pag (pho activated genes).

1.5 Hfq

Hfq es una chaperona que actúa como regulador post transcripcional global ¹⁹⁵ ¹⁹⁶ y está ampliamente distribuida en eubacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas ¹⁹⁶. Fue descubierta por primera vez hace más de cuarenta años en *E. coli* como un factor necesario para la replicación del bacteriófago de RNA Qβ ¹⁹⁷. Hfq se ensambla en un anillo hexamérico que es homólogo a las proteínas Sm y Sm-like de eucariotas, las cuales participan en el procesamiento y en la degradación del mRNA (RNA mensajero); de hecho Hfq media la unión entre sRNAs y su mRNA diana (**figura 10**) ¹⁹⁵ ¹⁹⁶. Normalmente la interacción sRNA-mRNA, que se da principalmente en la región 5'-UTR (del inglés *Untranslated region*) del mensajero, reprime la traducción del mRNA (pues enmascara el RBS, del inglés *Ribosome Binding Site*,) o acelera su degradación ¹⁹⁸ ¹⁹⁹. Sin embargo, también se dan casos de activación del mensajero, pues esta unión de sRNA puede romper estructuras secundarias en el mRNA que provocan que el RBS no sea accesible ²⁰⁰ ²⁰¹ ²⁰². Los sRNAs que

regulan la expresión génica mediante complementariedad de bases pueden clasificarse en dos clases: los codificados en *cis* y los codificados en *trans*. Mientras que los sRNAs codificados en *cis* tienen una elevada complementariedad de bases con su mRNA diana porque están codificados en la cadena complementaria de DNA ^{203 204}, los sRNAs codificados en *trans* presentan una baja complementariedad de bases con su diana o dianas, pues se encuentran codificados en otros lugares del genoma, y necesitan generalmente la acción de chaperonas como Hfq para estabilizar esta unión ^{202 205 206 196} (figura 10). La mayoría de sRNAs codificados en *trans* son sintetizados bajo condiciones específicas, como por ejemplo estrés oxidativo, estrés de membrana, concentraciones limitantes de Fe³⁺ o cambios en la concentración de glucosa, y contribuyen a la supervivencia de la bacteria frente a estos desafíos mediante la modulación de la traducción de ciertos reguladores o inhibiendo la síntesis de proteínas innecesarias en esas condiciones ²⁰⁷.

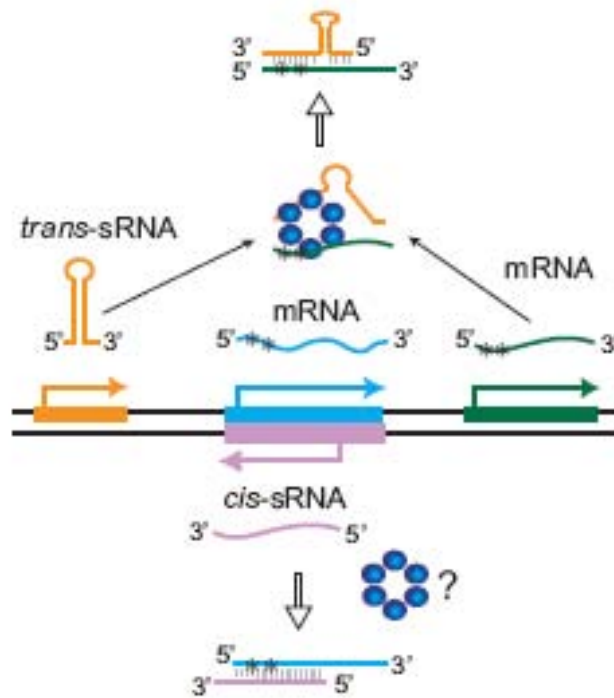


Figura 10: sRNAs codificados en *cis* y codificados en *trans* y su interacción con el mRNA diana. En color naranja y en color morado se representan los sRNA codificados en *trans* y en *cis*, respectivamente. En color verde y color celeste se representan los mRNA diana. El hexámero azul representa a Hfq²⁰⁸.

Además de mediar la unión sRNA-mRNA, Hfq también interacciona con enzimas del metabolismo del RNA entre las que se encuentran la RNasa E, la polinucleotido fosforilasa o la poli(A) polimerasa²⁰⁹.

A pesar de que los fenotipos observados varían según la bacteria en cuestión, un mutante *hfq* es generalmente viable aunque presenta defectos de crecimiento en medios de cultivo estándar (su tiempo de duplicación es mayor y presenta una menor densidad celular final), es más susceptible a condiciones estresantes y su virulencia se ve atenuada²¹⁰. En *Salmonella* spp., Hfq se halla implicada en el control de los T3SS codificados en las SPI-1 y SPI-2 que favorecen la invasión de la célula huésped y la supervivencia intracelular, respectivamente. Por eso, un mutante *hfq* invade y sobrevive menos en los modelos *in vitro*^{211 212 213}. En cambio, Hfq regula negativamente el T3SS en *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), así un mutante *hfq* sobreexpresa y secreta elevadas cantidades de efectores^{214 215}. En *P. aeruginosa*, Hfq regula la expresión de exotoxina²¹⁶, en *Vibrio cholerae* regula el *quorum sensing* y la

virulencia ²¹⁷, y promueve la formación de *biofilms* en *E. coli* uropatógeno (UPEC) ²¹⁸.

En nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto una relación entre Hfq y las modificaciones del lípido A ¹²¹. En este trabajo se comprobó que la delección de *hfq* provoca que *Y. enterocolitica* exprese un lípido A que presenta un mayor grado de heptaacilación a 21° C y que incorpore al lípido A una cadena de palmitoil (C_{16:1}) a 37°C (**figura 11**). Estos patrones en el fondo genético del mutante *hfq* son debidos a una mayor expresión de *phoPQ* y de *pagP* a ambas temperaturas estudiadas y a la mayor expresión de *lpxP* a 37° C, responsable de la adición inusual de C_{16:1}. La expresión de *lpxP* se encuentra regulada por la temperatura siendo mayor a 21°C que a 37°C. La expresión de ambos genes se encuentra bajo el control del sistema PhoPQ, que también ve aumentada su expresión en este fondo genético ^{121 219}.

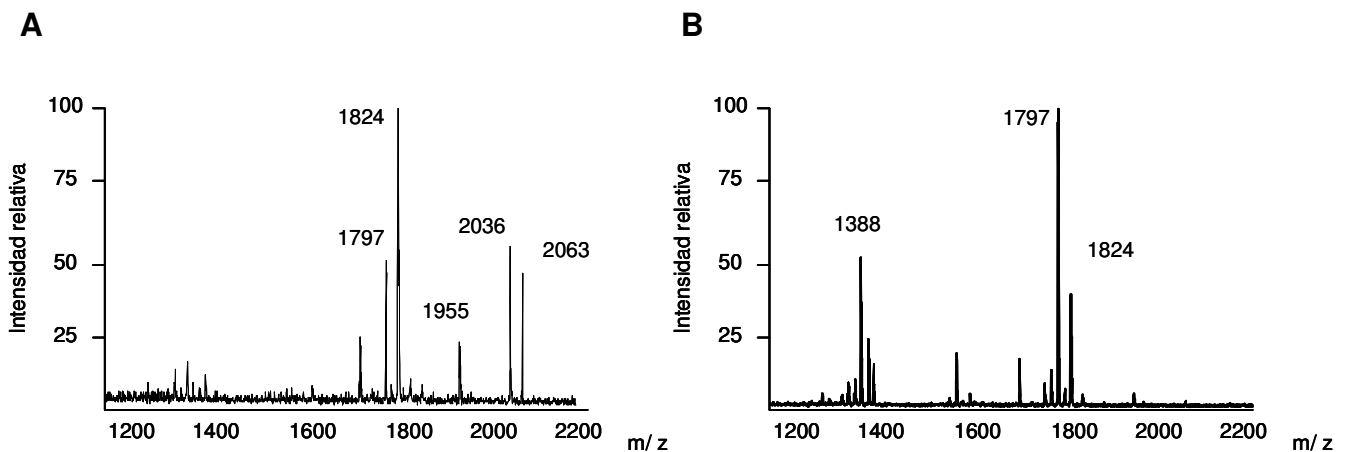


Figura 11: Espectrometría de masas del lípido A del mutante *hfq* de *Y. enterocolitica* O8 cultivada a 21°C (A) y a 37°C (B), obtenidos mediante MALDI-TOF ¹²¹.

1.6 El sistema inmune innato del pulmón

El sistema respiratorio está continuamente expuesto a agentes del medio externo y a microorganismos. Sin embargo, el pulmón mantiene un control muy estricto sobre la microbiota del pulmón gracias a la efectividad de la barrera formada por la mucosa del tracto respiratorio y a la inmunidad innata (que se divide en inmunidad innata humoral e inmunidad innata celular).

En el epitelio del tracto respiratorio, que también contribuye a la defensa del pulmón, se pueden distinguir dos zonas: la zona conductiva y la zona respiratoria.

En la zona conductiva diferenciamos dos regiones, una cartilaginosa proximal y otra no cartilaginosa distal en donde encontramos el epitelio de los bronquiolos respiratorios. La superficie luminal de esta zona conductiva está recubierta por un epitelio que varía a lo largo del recorrido. Al inicio de la zona cartilaginosa encontramos un epitelio pseudoestratificado formado por células ciliadas, células basales y células secretoras (responsables de la secreción de mucina). A medida que avanza hacia bronquios y bronquiolos, el epitelio pasa de pseudoestratificado a simple y aparecen las células Clara (no ciliadas, responsables de la secreción del surfactante pulmonar y de la protección del epitelio bronquiolar) que pasan a ser las mayoritarias al alcanzar la zona no cartilaginosa.

Por otro lado, el epitelio de la zona respiratoria está formado por neumocitos de tipo I y tipo II. Los neumocitos de tipo I ocupan aproximadamente el 95% de la superficie alveolar, no tienen capacidad de división y son los responsables del intercambio de gases. Por su parte, los neumocitos de tipo II sí tienen capacidad de división, pueden diferenciarse a neumocito tipo I y también secretan surfactante pulmonar. El surfactante pulmonar es imprescindible para evitar el colapso alveolar y además posee actividad antimicrobiana y antiinflamatoria.

Así, gracias a la acción conjunta tanto del movimiento mucociliar, la secreción de productos antimicrobianos y la presencia de uniones intercelulares, el epitelio del tracto respiratorio funciona como una barrera física entre el medio externo y el medio interno²²⁰.

1.6.1 Inmunidad celular

Las células del sistema inmune innato en la piel y en las mucosas son las encargadas de reconocer a los microorganismos, ya sean parte de la microbiota normal o patógenos, y evitar que se diseminen. Los microorganismos poseen unas estructuras altamente conservadas llamadas PAMPs (del inglés *Pathogen Associated Molecular Pattern*) que son reconocidas por las células del huésped mediante los receptores PRR (del inglés *Pattern Recognition Receptor*). Hasta el momento, los principales PRR descritos son los receptores *Toll-like* (TLRs), NOD y NOD-like (del inglés *Nucleotide Oligomerization Domain*), receptores RIG-I-like (RLRs) y receptores

lectina tipo-C (CLRs) ²²¹. Un mismo microorganismo puede activar diferentes PRRs a la vez y éstos activarán cascadas de señalización celular que generalmente convergen en factores de transcripción como NFκB, la proteína activadora 1 (AP-1), factores reguladores de interferón (IRFs) o el factor nuclear de células T activadas (NFAT) para activar la transcripción de efectores antimicrobianos, citoquinas, quimioquinas así como de genes que inducen la inmunidad adaptativa ^{222 223}. En la tabla 1 se resumen los TLRs descritos hasta la fecha y el PAMP o PAMPs que reconocen.

Tabla 1: Toll-like receptors y sus ligandos ²²⁴.

TLR	Localización	Ligando
TLR1 (junto con TLR2)	Membrana plasmática	Triacil lipoproteínas, factores solubles
TLR2 (junto con TLR1 o TLR6)	Membrana plasmática	Lipoproteínas, peptidoglicano, ácido lipoteicoico, porinas, LPS inusuales
TLR3	Endosoma	dsRNA
TLR4	Membrana plasmática	LPS
TLR5	Membrana plasmática	Flagelina
TLR6 (junto con TLR2)	Membrana plasmática	Diacil lipoproteínas, ácido lipoteicoico, β-glucano
TLR7	Endosoma	ssRNA
TLR8	Endosoma	ssRNA
TLR9	Endosoma	Motivos CpG en el DNA
TLR10* (±TLR1 o TLR2)	Membrana plasmática	Lipopéptidos
TLR11 [§]	Endosoma	Flagelina
TLR12 [§]	Endosoma	Profilina
TLR13 [§]	Endosoma	23S RNA

* Sólo en humanos

§ Sólo en ratón

1.6.1.2 El lípido A y la inmunidad innata celular

El lípido A es el dominio del LPS reconocido por el sistema inmune innato mediante la unión al complejo TLR4-MD2-CD14 ^{225 226} (**figura 12**). Una vez que el LPS se ha unido a este complejo, TLR4 dimeriza a través de su dominio intracelular TIR (del inglés *Toll/interleukin-1 receptor*). Los dominios TIR atraen

entonces a proteínas adaptadoras que también contienen dominios TIR, como son MyD88 (del inglés *Myeloid Differentiation factor 88*), MAL (*MyD88-adaptor like*, o también llamado TIRAP), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein including interferon- β*) y TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), dando lugar a la activación de cascadas de señalización MyD88 dependientes e independientes.

MyD88 reúne a las siguientes moléculas de señalización en la vía ²²⁷, las quinasas IRAK que se activan mediante autofosforilación y fosforilación cruzada ²²⁸. La fosforilación de estas quinasas lleva al reclutamiento de TRAF6 (del inglés *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*) y del complejo formado por la quinasa TAK1 (del inglés *factor- β -associated kinase-1*) y las proteínas de unión TAB1 y TAB2 (del inglés *TAK-1 binding protein*). Entonces, TAK1 fosforila a IKK β activando así el complejo IKK (del inglés *I κ B kinase*). A continuación, IKK fosforila a I κ B con lo que se induce la poliubiquitinación del complejo I κ B α para su degradación por el proteosoma ^{227 229 230}. Cuando I κ B α es degradado, la NLS (señal de localización nuclear) de NF κ B queda visible y éste puede translocarse al núcleo. Una vez en el núcleo, NF κ B se une a las regiones κ B e inicia la activación de la transcripción de los genes necesarios para la respuesta inmunitaria innata ^{231 232 233}.

complejo transcripcional AP-1. La vía JNK está implicada, entre otros procesos, en la regulación de la apoptosis.

-vía p38: Regula la expresión de algunas citoquinas siendo importante para la activación de la respuesta inmune.

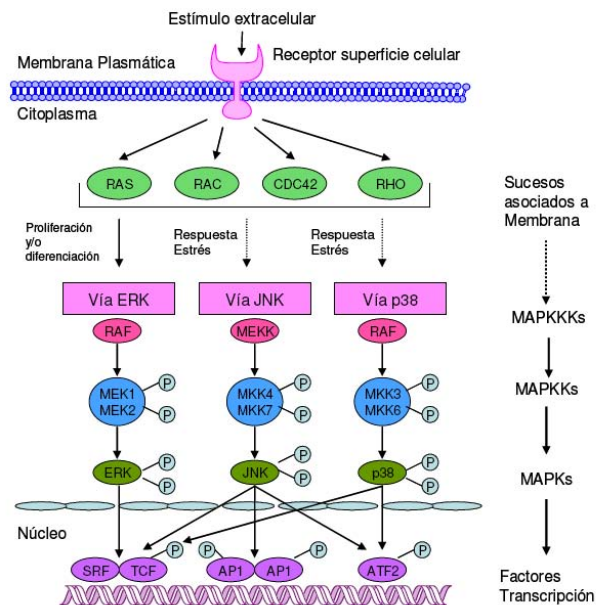


Figura 13: Diagrama de la activación de las MAPK ²³⁷.

A parte de la señalización dependiente de MyD88, TLR4 puede señalizar a través de TRIF y TRAM, de manera MyD88 independiente, tras ser internalizado (**figura 12**). La activación de TRIF culmina en la activación del factor de transcripción IRF-3 (del inglés *Interferon regulatory factor 3*) y promueve la expresión de IFN- α e IFN- β (interferón) entre otros genes ^{238 239 240 221}.

1.6.2 Inmunidad humoral

1.6.2.1 El sistema del complemento

El sistema del complemento es un conjunto de proteínas y glicoproteínas inactivas que circulan por el torrente sanguíneo y que se activan de manera secuencial por escisión proteolítica ^{241 242}. El sistema del complemento puede activarse por tres vías diferentes: la vía clásica, la vía alternativa y la vía de las lectinas que es dependiente de la deposición de MBP (del inglés *Mannose Binding Protein*) (**figura 14**). Para la activación mediante la vía clásica, el

componente C1, presente en el suero, debe interactuar con un complejo antígeno-anticuerpo. La vía alternativa se inicia con el depósito del componente C3 sobre la superficie bacteriana. Finalmente, para la activación de la vía de las lectinas es necesaria la unión de MBP a moléculas de la bacteria que contienen manosa. El resultado final de la activación del complemento es la formación del complejo de ataque a la membrana que provocará la muerte de la bacteria.

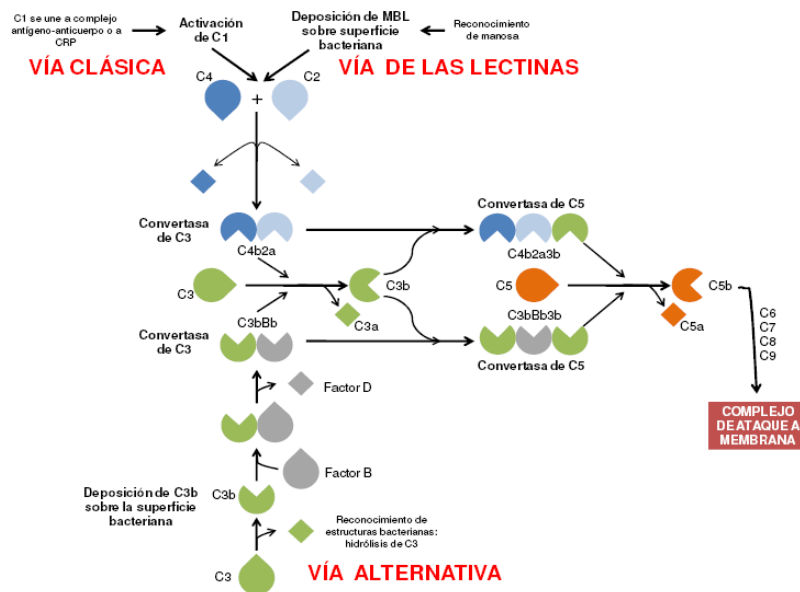


Figura 14: Vías de activación del sistema del complemento ⁵⁵.

1.6.2.2 Proteínas y Péptidos antimicrobianos (AMP)

Los AMPs son moléculas de naturaleza peptídica, con carácter anfipático y catiónicos ^{243 244 245 246}. Los AMPs son sintetizados tanto por organismos procariotas como eucariotas ^{247 248 249}. Por ejemplo, la PxB es un AMP sintetizado por *Bacillus polymyxa* y actúa principalmente sobre bacterias Gram negativas ²⁵⁰, las especies de *Xenopus* sintetizan magaininas ²⁵¹ y los insectos pueden producir AMPs como la cecropina ²⁵² (en la hemolimfa) o la melitina ²⁵³ (en la superficie del cuerpo). En el caso de vertebrados, los AMPs son una pieza importante de la respuesta inmune innata (tabla 2). Hasta el momento se han descrito 4 clases estructurales de AMPs (lámina β unidos mediante enlace di-sulfuro, hélice α , péptidos extendidos y péptidos en forma de bucle) ^{254 245}, aunque su mecanismo de acción es el mismo (**figura 15**). Los AMPs

interaccionan con las cargas aniónicas del núcleo del LPS y del lípido A de manera que neutralizan estas cargas creando poros por los cuales pueden atravesar la membrana (**figura 15A**) o alternatively pueden desplazar los cationes divalentes de manera que perturban la integridad de la membrana externa (**figura 15B**)²⁵⁵. Una vez que el AMP ha atravesado la membrana externa se une a la membrana interna, ya que posee carga negativa, y se inserta en ella (**figura 15C**) para después formar estructuras micelares (**figura 15D**) o entrar en el citoplasma mediante un movimiento de “flip-flop” (**figura 15E**) que está favorecido por el potencial transmembrana (**figura 15F**)^{53 256} y de esta forma alcanzar su diana intracelular.

En la tabla 2 se describen los principales AMPs del tracto respiratorio y su actividad descrita.

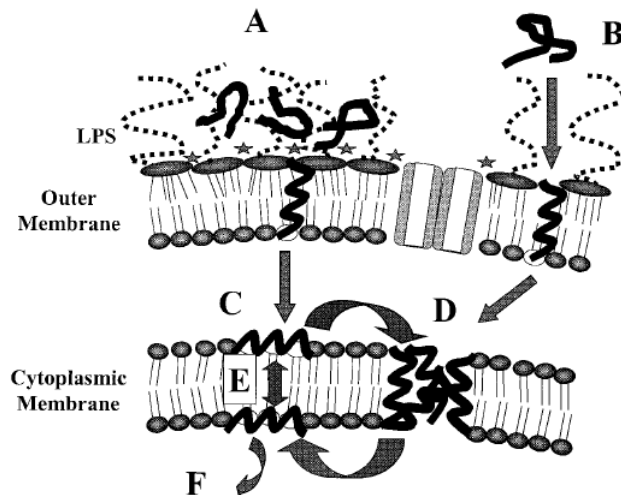


Figura 15: Mecanismo de acción de los AMPs con la envoltura celular de las bacterias Gram negativas²⁵⁵.

Las membranas eucariotas están compuestas principalmente por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélinea y colesterol que confieren una carga neutra. En cambio, las membranas procariontas poseen una carga neta negativa debido a la presencia de fosfolípidos hidroxilados como fosfatidilglicerol, cardiolipina y fosfatidilserina²⁵⁷. Además, la asimetría que presentan las membranas eucariotas en cuanto a la distribución de los fosfolípidos en la bicapa lipídica, junto con el potencial transmembrana que exhiben las células eucariotas, hacen que la afinidad de los AMPs sea mayor por las membranas procariontas^{243 258}. Además, existe una expresión diferencial

de AMPs según el tejido lo cual favorece a que un determinado AMP sea tóxico para los microorganismos patógenos y poco nocivo para el órgano en que se expresa ²⁵⁸. Además de tener efecto antimicrobiano y antiinfectivo, los AMPs secretados por el sistema inmune poseen propiedades antiinflamatorias, cicatrizantes y adyuvantes ²⁵⁹.

Tabla 2: Proteínas y péptidos antimicrobianos del tracto respiratorio ^{260 261}

Proteínas y AMPs	Origen	Actividad
Lisozima	Macrófagos alveolares, células polimorfonucleares (PMN), células epiteliales	Bactericida contra Gram positivas y Gram negativas
Lactoferrina	PMN	Quelante del hierro, desestabiliza la membrana externa
SLPI (<i>Secretory leucoprotease inhibitor</i>)	Macrófagos alveolares, PMN, células epiteliales	Mitigan la acción de las proteasas expresadas por patógenos
α Defensinas HNP-1,2,3,4 HD-5, HD-6	PMN, células epiteliales	Bactericida contra Gram positivas y Gram negativas, activación del complemento, quimiotácticas, regeneración tisular, producción de citoquinas
β Defensinas HBD-1,2,3,4		
Catelicidina LL-37	Células epiteliales	Bactericida, reducen la expresión de citoquinas proinflamatorias.
BPI (<i>Bacterial permeability increasing protein</i>)	PMN	Bactericida
Colectinas SP-A (<i>surfactant protein</i>) SP-D	Neumocitos tipo II	Bactericida, inhiben la adhesión bacteriana, promueven la fagocitosis, quimiotácticas, reducen la expresión de citoquinas proinflamatorias.

1.7 El lípido A y otros mecanismos de resistencia frente a AMPs

Las bacterias poseen mecanismos de resistencia frente a los AMPs. Estos mecanismos de resistencia pueden ser constitutivos o inducibles.

Entendemos por mecanismos constitutivos la propiedad que posee un microorganismo que hace que éste sea resistente a un determinado AMP sin necesidad de estar expuesto a dicho péptido. Entre estos mecanismos podemos destacar la presencia de cadena O, el CPS, la síntesis de una membrana plasmática menos electronegativa o la adaptación evolutiva de la bacteria a un nicho específico²⁵⁸. En concreto, la cadena O dificulta el acceso de los AMPs al lípido A^{262 263}. Por otro lado, en bacterias como *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *L. pneumophila* y *K. pneumoniae* el CPS protege del efecto bactericida de los AMPs^{264 47}. Sin embargo, la expresión de CPS también es un mecanismo inducible ya que en algunos patógenos, la exposición a AMPs aumenta la producción de CPS⁴⁷.

En cambio, los mecanismos inducibles son aquellos que se ponen en marcha cuando la bacteria se enfrenta a la presencia de AMPs. Entre los mecanismos inducibles encontramos la expresión de proteasas, la presencia de bombas de expulsión, o las modificaciones del lípido A.

Por ejemplo, las proteasas OmpT y PgtE, en *E. coli* y en *Salmonella* spp. respectivamente, hidrolizan AMPs con estructura de hélice- α ^{265 266 267}.

En *Neisseria gonorrhoeae*, *Yersinia* spp. y *K. pneumoniae* se ha descrito la presencia de las bombas de expulsión MtrCDE, RosAB y AcrAB, respectivamente^{268 269 270}.

En relación a las modificaciones del lípido A, las fosfatasa LpxF y LpxE (que eliminan los fosfatos en la posición 4' en *Francisella novicida*^{271 272 273 274} y en la posición 1 en *Helicobacter pylori*²⁷⁵, respectivamente) reducen las cargas negativas del lípido A y confieren resistencia frente a la PxB. Las adiciones de pEtN o L-Ara4N incrementan la carga catiónica de la membrana externa, aumentando la resistencia a los AMPs en *Salmonella* spp., *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* entre otros^{276 277 134 74}. En *Salmonella* spp. la adición de palmitato o la hidroxilación del lípido A contribuyen a crear una membrana más robusta^{278 140 89}.

1.8 *K. pneumoniae* y sus mecanismos de defensa frente al sistema inmune innato

La aparición en los últimos años de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a múltiples antibióticos, ha convertido a los péptidos antimicrobianos como la colistina o la PxB en las últimas alternativas para tratar infecciones por cepas de *K. pneumoniae* multiresistentes^{8 11 12}. Pero se ha descrito que *K. pneumoniae* es capaz de detectar la presencia de AMPs y poner en marcha una serie de mecanismos de remodelación de la superficie bacteriana cuya finalidad es la creación de una barrera más robusta para aumentar la resistencia frente a AMPs⁷⁴. De esta forma, la exposición a PxB induce resistencia tanto a PxB como resistencia cruzada a otros AMPs presentes en el tracto respiratorio. Entre las medidas, descritas hasta ahora, que *K. pneumoniae* pone en marcha en respuesta a AMPs encontramos la heptaacilación del lípido A mediada por la enzima PagP, la adición de L-Ara4N mediada por el operón *pmrH*, el aumento de la síntesis del CPS y el aumento de la expresión del transportador de Mg²⁺ *mgtA*. Estas respuestas están reguladas por los sistemas PhoPQ, PmrAB y RcsFCDB⁷⁴.

Nuestro grupo ha descrito también cómo la presencia de CPS no induce la expresión de β -defensinas en las células del tracto respiratorio⁴⁸ y cómo *K. pneumoniae*, manipula las vías de señalización implicadas en el control de la respuesta inmune del huésped, disminuyendo la secreción de citoquinas inflamatorias²⁷⁹.

Hipotesis y objetivos

Hipótesis y objetivos

Hfq es un regulador post transcripcional implicado en multitud de respuestas celulares cuando la bacteria se enfrenta a diferentes estímulos estresantes como la radiación ultravioleta, concentraciones limitantes de hierro o estrés oxidativo entre otros. En varias especies de bacterias Gram negativas, se ha demostrado que un mutante *hfq* es, generalmente, viable pero muy sensible a los mecanismos defensivos del huésped y extremadamente atenuado en los modelos animales de infección. En nuestro grupo hemos descrito con anterioridad cómo la chaperona Hfq regula la expresión de las modificaciones del lípido A en *Y. enterocolitica* O8 (YeO8). En este trabajo se demostró que el lípido A de un mutante *hfq* de YeO8 presenta un mayor grado de heptaacilación a 21°C por la adición de un grupo palmitato (C_{16:0}), con respecto a su cepa salvaje¹²¹. La enzima responsable de la adición de C_{16:0} es PagP. Nos planteamos entonces, si la chaperona Hfq regulaba las modificaciones de lípido A en otras *Enterobacteriaceae* como *K. pneumoniae* y *Salmonella* Typhimurium y, en caso de que así fuera, cuál sería el efecto de dicha modificación en la respuesta inmune del huésped. Para abordar estas cuestiones nos planteamos los siguientes objetivos:

- Determinar la estructura de lípido A tanto de las cepas salvajes como de los mutantes *hfq* de *K. pneumoniae* y *S. Typhimurium*.
- Estudiar los cambios de expresión de los genes implicados en las modificaciones del lípido A debidos a la delección de *hfq*.
- Analizar la respuesta inmune inducida por el lípido A del mutante *hfq* de *K. pneumoniae* estimulando macrófagos alveolares murinos MH-S.

Por otro lado, la idea de que las bacterias patógenas modifican la estructura de su lípido A para así evadir o modificar la respuesta inmune del huésped es cada vez más aceptada. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido del todo

probada ya que hasta la fecha no se ha conseguido aislar el lípido A expresado por un patógeno *in vivo*. Por lo tanto, nos planteamos cuál es el lípido A que *K. pneumoniae* expresa durante una infección *in vivo* y estudiar la respuesta inmune que esta estructura provoca en el huésped. Para elucidar esta hipótesis nos fijamos los siguientes objetivos:

-Aislar y caracterizar el lípido A que expresa *K. pneumoniae in vivo* durante una infección.

-Determinar los genes responsables de la estructura de lípido A expresado *in vivo*.

-Estudiar el efecto del lípido A que *K. pneumoniae* expresa *in vivo* en la respuesta inmune del huésped.

-Analizar el papel del lípido A de *K. pneumoniae* expresado *in vivo* en la resistencia frente a AMPs.

Material y métodos

2. Material y métodos

2.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las cepas de *K. pneumoniae* y de *E. coli*, detalladas en la **tabla 6**, se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani) tanto líquido como sólido (LB con 1.5% de agar bacteriológico), a 37°C (salvo en los casos indicados) y suplementado con antibióticos cuando fue necesario.

Los cultivos en medio líquido se realizaron en agitación continua a 180 rpm, 37°C (salvo en los casos indicados) durante toda la noche. A la mañana siguiente se realizó una dilución 1/10 de este cultivo en medio fresco, y se cultivó de la misma forma hasta alcanzar la fase estacionaria del crecimiento (para la medición de la actividad luciferasa *in vitro*) o la fase exponencial del crecimiento (para el resto de experimentos realizados).

Antibióticos:

Ampicilina (Amp): Sigma-Aldrich, utilizada a una concentración final de 100 µg/ml.

Cloramfenicol (Cm): Sigma-Aldrich, utilizada a una concentración final de 25 µg/ml.

Kanamicina (Km): Sigma-Aldrich, utilizada a una concentración final de 50 µg/ml.

Tetraciclina (Tc): Sigma-Aldrich, utilizada a una concentración final de 12.5 µg/ml.

Rifampicina (Rif): Sigma-Aldrich, utilizada a una concentración final de 50 µg/ml.

A continuación se citan otros medios utilizados en este trabajo:

LB0: 10 gramos de peptona bacteriológica o triptona (Laboratorios Conda), 5 gramos de extracto de levadura (Oxoid) y 10% sacarosa (Sigma-Aldrich) por litro.

Para reproducir *in vitro* la estructura de lípido A que *K. pneumoniae* expresa *in vivo* se probaron los medios de cultivo descritos a continuación. En todos los casos la incubación fue en agitación continua a 180 rpm y a 37°C.

LB-200 μM 2,2'-Dypiridil (Sigma-Aldrich).

RPMI (PAA, E15-848, sin rojo fenol).

RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal (PAA, inactivado por temperatura durante 1h a 60°C).

Sales mínimas M9 (Sigma-Aldrich) disueltas en tampón HEPES (Sigma-Aldrich) 100 mM y ajustado a pH 7, 6.5 o 6. Antes de inocular las bacterias se añadieron casaminoácidos (Sigma-Aldrich, a una concentración final de 0.1%), sulfato de magnesio (Panreac, concentración final 8 μM) y D-glucosa (Sigma-Aldrich, concentración final 0.4%).

Sales mínimas M9 (Sigma-Aldrich) disueltas en tampón MES (Sigma-Aldrich) 100 mM y ajustado a pH 3, 3.5, 4, 4.5, 5 y 5.5. Antes de inocular las bacterias se añadieron casaminoácidos al 0.1%, sulfato de magnesio 8 μM y glucosa al 0.4%.

Medio mínimo N: 4.9 mM de KCl (Panreac), 7.5 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Panreac), 0.5 mM K_2SO_4 (Panreac), 1 mM de KH_2PO_4 (Panreac) y 38 mM de glicerol (Sigma-Aldrich), todo ello disuelto en 0.1 M de tampón Tris-HCl a pH 7.5. Antes de inocular las bacterias, se añadió un 0.1% (peso/volumen) de casaminoácidos. En este medio se probaron las siguientes concentraciones de MgCl_2 (Panreac): 10 mM, 5 mM y 10 μM .

2.2 Técnicas de DNA recombinante

Las técnicas de biología molecular utilizadas en este trabajo se realizaron siguiendo protocolos ya descritos por Sambrook y colaboradores²⁸⁰. Para las reacciones de PCR convencionales se empleó la enzima *FlexiGoTaq*[®] *polymerase* de Promega. En cambio, cuando fue necesaria una mayor fidelidad se emplearon las enzimas *Vent polymerase* (New England Biolabs), *KOD HS polymerase* (Novagen) o *Ex Taq polymerase* (Takara) según la conveniencia.

Para la purificación de reacciones de PCR y para la extracción de DNA plasmídico se emplearon los kits comerciales *Nucleospin*[®] *Gel and PCR Clean-up* y *Nucleospin*[®] *Plasmid* (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Las enzimas de restricción del DNA (Promega o New England Biolabs), y las enzimas T4 DNA ligasa, T4 quinasa, T4 DNA polimerasa y el fragmento Klenow (New England Biolabs) se emplearon siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos utilizados y generados en este trabajo se describen en la **tabla 7**.

2.2.1 Caracterización rápida del DNA plasmídico a partir de colonia

Para comprobar la presencia de un plásmido en una bacteria se empleó el método descrito por Beuken y colaboradores que facilita la discriminación del material genético por su tamaño ²⁸¹. De manera breve, se inoculó una colonia en 5 ml de LB y se incubó en agitación a la temperatura adecuada hasta alcanzar una densidad óptica (DO) óptima. En ese momento se tomaron entre 500-1000 μ l del cultivo y se recogieron las bacterias por centrifugación. El sedimento bacteriano se resuspendió en 50 μ l de reactivo de tinción (6% sacarosa y 0.1% azul de bromofenol) y 20 μ l de una mezcla de fenol: cloroformo: isoamilalcohol (25:24:1). Después de lisar las bacterias por agitación mediante un agitador tipo vórtex, las muestras se centrifugaron a 17500 x g durante 10 minutos para separar la fase acuosa de la orgánica. Finalmente, se cargaron 10-20 μ l de la fase acuosa en un gel de agarosa al 1% y el material genético se separó mediante electroforesis. Como control, la cepa que contenía el plásmido de referencia se procesó de igual modo. Una vez verificada la presencia del plásmido, se comprobó mediante extracción de DNA plasmídico y digestión con enzimas de restricción.

2.2.2 Métodos de transferencia genética

2.2.2.1 Transformación por choque térmico en células químicamente competentes

El siguiente método se utilizó para generar células de *E. coli* químicamente competentes. 50 ml de un precultivo de *E. coli*, incubado a 30°C y 220 rpm durante 16 horas, se inocularon en 250 ml de LB-0.1% D-glucosa (Sigma-Aldrich). Este cultivo se incubó a 30°C y 220 rpm hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6 aproximadamente. Al alcanzar esta DO, el cultivo se enfrió en hielo durante 10 minutos y a continuación las células se recogieron por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos y a 4°C. A continuación las células se lavaron en 60 ml de $MgCl_2$ 100 mM frío y se centrifugaron a 4000

rpm durante 10 minutos a 4°C. Los sedimentos bacterianos se lavaron de nuevo, esta vez en 60 ml de CaCl₂ 100 mM frío y se recogieron de nuevo por centrifugación en las mismas condiciones. Por último, las células se resuspendieron en 6 ml de glicerol al 12% en CaCl₂ 100 mM, se repartieron en alícuotas de 100 µl y se conservaron a -80°C hasta su uso.

La transformación por choque térmico se llevó a cabo de la siguiente manera. Se descongeló en hielo una alícuota de células químicamente competentes y se añadió el DNA plasmídico o la reacción de ligación a transformar. Esta mezcla se mantuvo en hielo durante 20-30 minutos y seguidamente se procedió al choque térmico incubándola durante 90 segundos a 42°C. A continuación se incubó de nuevo en hielo durante 2 minutos y se añadieron 800 µl de LB. Las transformaciones se incubaron durante 1 hora en agitación a 37°C. Finalmente las bacterias se sembraron en placas de LB-agar, suplementadas con el antibiótico correspondiente para la selección de los transformantes y se incubaron a 37°C ²⁸².

2.2.2.2 Transformación mediante electroporación

En el caso de plásmidos que no son móviles mediante conjugación, como es el caso de los plásmidos pACYC177 o pKOBEG-*sacB*, la transformación se realizó mediante electroporación. Para preparar células electrocompetentes de *K. pneumoniae*, se inoculó una colonia en 5 ml de LB y se cultivó durante la noche a 37°C en agitación. A la mañana siguiente se transfirieron 500 µl de este precultivo a 4.5 ml de LB fresco y se incubó hasta alcanzar la fase exponencial del crecimiento. Llegado ese momento, las bacterias se recogieron por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C. A continuación se realizaron 2 lavados con 5 ml de sacarosa 300 mM. Tras el último lavado, el sedimento bacteriano se resuspendió en 500 µl de sacarosa 300 mM. Para la electroporación se mezclaron 100 µl de esta suspensión bacteriana con el DNA plasmídico a transformar y se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación de 2 mm *Gene Pulser* (Bio-Rad). Para la electroporación se utilizó un electroporador *Gene Pulser Xcell II* junto con el *PC Module* (Bio-Rad) y el siguiente protocolo:

Tipo de pulso	Caída exponencial
Capacitancia	25 μ F
Resistencia	200 Ω
Voltaje de descarga	2.5 kV
Fuerza del campo eléctrico aplicado	10-20 kV/cm
Duración del pulso	~ 5 ms

Tras el choque eléctrico, las bacterias se recuperaron en 800 μ l de LB, se transfirieron a un tubo tipo Eppendorf® y se incubaron durante 1-2 horas en agitación a la temperatura requerida por el plásmido. Finalmente, las bacterias se sembraron en placas de LB agar, suplementadas con el antibiótico apropiado, y se incubaron a la temperatura adecuada.

2.2.2.3 Conjugación en medio sólido

Un plásmido es movilizable por conjugación cuando contiene las regiones *bom* (del inglés *basis of mobility*, contiene el origen de transferencia) y *tra* (codifica para la maquinaria necesaria para la formación del *pili*). En estos casos se puede realizar una conjugación biparental entre una cepa donadora de *E. coli* y una cepa receptora de *K. pneumoniae*. En los casos en que ni el plásmido a transferir ni la cepa donadora de *E. coli* poseían la región *tra*, se llevó a cabo una conjugación triparental utilizando la cepa de *E. coli* HB101. Esta cepa está transformada con el plásmido pRK2013 que confiere las funciones de transferencia y la formación del *pili* conjugativo. Para llevar a cabo la conjugación las diferentes cepas se cultivaron en 5 ml de LB a la temperatura adecuada, durante 16 horas en agitación, excepto aquella cepa de *E. coli* capaz de formar *pili* conjugativo, que se cultivó de manera estática. Transcurrido este tiempo, las bacterias se recogieron por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con 5 ml de MgSO₄ 10 mM. Tras el último lavado, los sedimentos bacterianos se resuspendieron en 500 μ l de MgSO₄ 10 mM, y se sembraron 100 μ l de cada cepa que interviene en la conjugación en una placa de LB. Tras incubar a la temperatura apropiada bien para el plásmido, bien para la cepa receptora, durante 24 horas, el crecimiento bacteriano se recogió en PBS, se realizaron diluciones seriadas y se sembró en placas de medio selectivo que se incubaron

a la temperatura oportuna. En el caso de *K. pneumoniae*, se utilizaron placas de LB-Rif⁵⁰ suplementadas con el antibiótico o antibióticos marcadores del plásmido.

2.2.3 Construcción de mutantes

2.2.3.1 Construcción de mutantes por inserción

En las cepas de *K. pneumoniae* de origen clínico (**tabla 5**) se construyeron mutantes en el gen *lpxO* mediante inserción. Para la construcción de mutantes siguiendo esta estrategia se amplificó un fragmento interno del gen *lpxO* mediante PCR usando como molde el DNA genómico de cada una de las cepas a mutar junto con la pareja de cebadores KpnIntlpxO F1 y KpnIntlpxO R1 (**tabla 8**). El fragmento de DNA obtenido se clonó en el vector pGEMT-easy (Promega), se extrajo con EcoRI y se clonó en el sitio EcoRI del vector suicida pKNOCK-Km. Al obtener en *E. coli* el plásmido pKNOCK-Km-intlpxO, se realizó una conjugación en medio sólido para obtener los mutantes *lpxO* en cepas de *K. pneumoniae* de origen clínico. Dado que *K. pneumoniae* no posee la maquinaria $\text{red}\gamma\beta\alpha$ del fago λ , la única manera de obtener células resistentes a Km al transformar el plásmido pKNOCK-Km-intlpxO es que éste se integre en el cromosoma bacteriano mediante un evento de recombinación homóloga.

2.2.3.2 Construcción de mutantes por delección

Para la construcción de los mutantes *hfq*, *phoPQ* y *lpxO* en las cepas 52145 y/o 52145 Δwca_{k2} de *K. pneumoniae* se empleó la técnica resumida en la **figura 16**. Para empezar, se amplificaron mediante PCR ambos extremos del gen a mutar utilizando como molde el DNA genómico de la cepa 52145 y las parejas de cebadores UpF/UpR y DownF/DownR enumerados en la **tabla 8**. Después de purificar y cuantificar, mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, ambos fragmentos de DNA se realizó una reacción de polimerización en las siguientes condiciones: 3 minutos a 94°C, seguidos de 8 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 52°C y 1 minuto a 72°C además de 7 minutos a 72°C para la polimerización final. Para esta reacción se utilizaron 2.5 unidades de *FlexiGoTaq*[®] *polymerase* (Promega), 0.2 mM de dNTP's (Promega), 1 mM de MgCl₂ (Promega) y la misma cantidad de los fragmentos Up y Down. A continuación, esta reacción se utilizó como molde para la

amplificación final utilizando las parejas de cebadores UpF y DownR. El amplicón resultante, que contiene una diana interna para *Bam*HI, se clonó en el vector pGEM-T easy (Promega). En esta diana de restricción para la enzima *Bam*HI se clonó un *cassette* de resistencia a Km purificado después de su amplificación utilizando como molde el plásmido pKD4 y usando la polimerasa *Vent* junto con los cebadores *cassete*-F1 y *cassete*-R1.

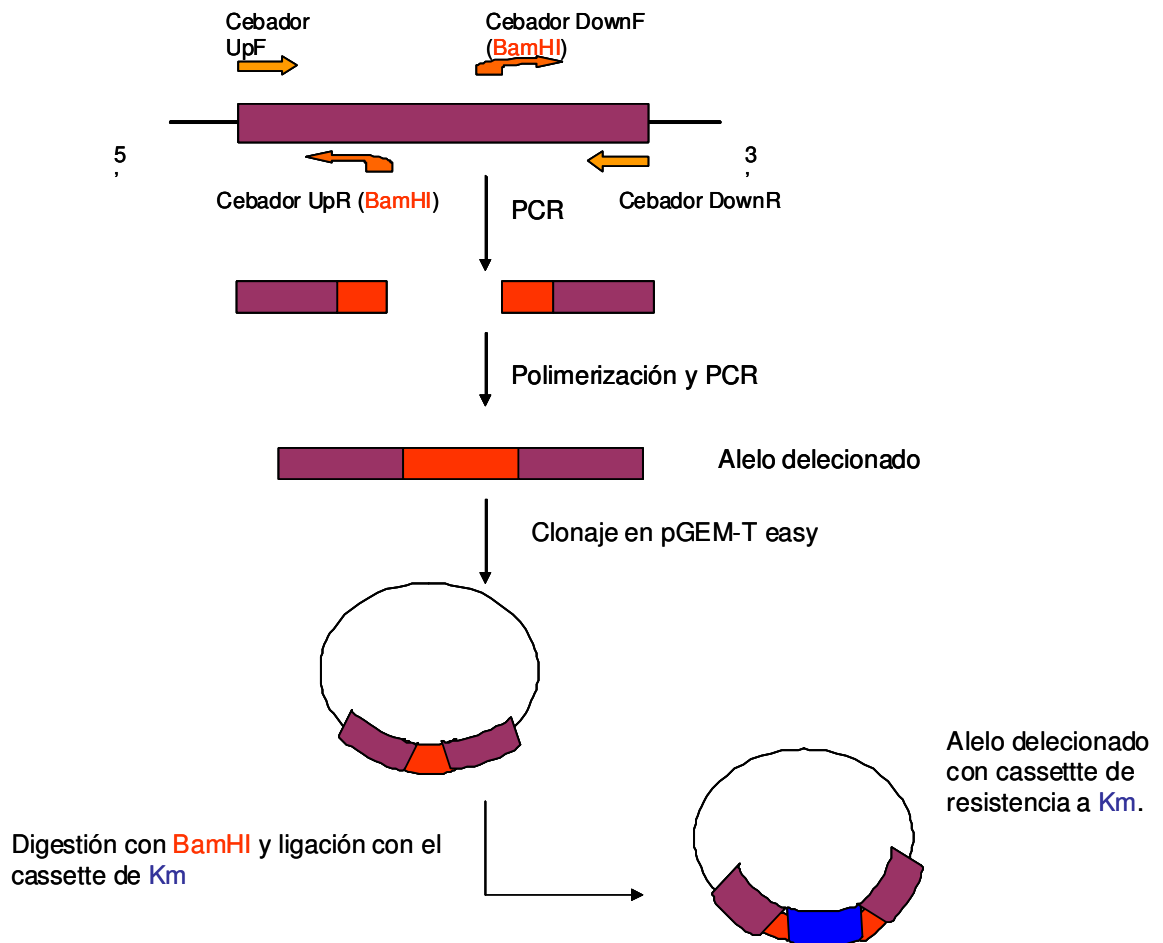


Figura 16: Esquema de la construcción de un alelo deleciónado.

Llegados a este punto, se llevaron a cabo dos estrategias distintas para conseguir la deleción del gen deseado: (i) inserción de DNA lineal (**figura 17**) o (ii) inserción de DNA plasmídico (**figura 18**).

(i) Inserción de DNA lineal:

Utilizando como molde el vector plasmídico obtenido, se amplificó por PCR el gen deleciónado, usando los primers UpF y DownR. 1 µg del producto resultante purificado se transformó por electroporación en la cepa 52145/pKOBEG-*sacB*. El plásmido pKOBEG-*sacB*, que tiene un origen de replicación termosensible, promueve la recombinación homóloga entre el cromosoma y fragmentos de DNA lineal si se induce la expresión de las recombinasas que codifica mediante la adición de arabinosa al 0.2%; además el gen *sacB* permite la eliminación del plásmido por selección en placas de LB0, descritas en el apartado 2.1. Aquellas bacterias capaces de crecer en placas con sacarosa son las que han perdido el plásmido. Para seleccionar las colonias con el alelo mutado, cada colonia aislada se sembró en LB-Cm y LB-Km y se incubó a 37°C. En aquellas colonias Cm^S y Km^R, la sustitución del alelo silvestre por el alelo mutado se comprobó mediante PCR.

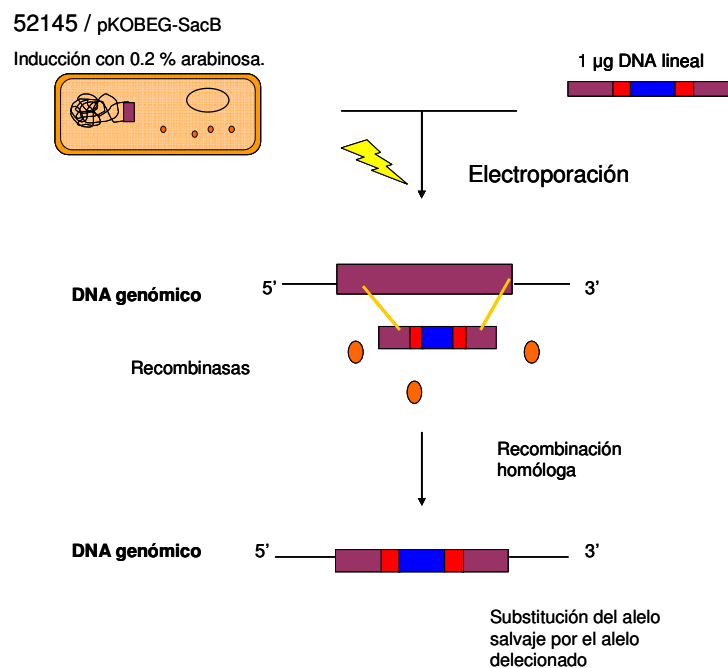


Figura 17: Esquema de mutación por deleción mediante inserción de DNA lineal.

(ii) Inserción de DNA plasmídico:

Partiendo del vector anteriormente generado, el gen deleciónado se extrajo mediante digestión de restricción. A continuación, este fragmento se clonó en el vector suicida pMAK*sacB*. pMAK*sacB* es un plásmido conjugativo que también tiene un origen de replicación sensible a la temperatura y que, además de disponer de un *cassette* de resistencia a Cm, también puede ser eliminado

mediante selección en placas de LB0 debido a la presencia del gen *sacB*. Dado que el plásmido sólo replica a temperaturas inferiores a 30°C, al incubar las bacterias a 42°C se fuerza una primera recombinación en la que obtenemos bacterias merodiploides resistentes a Cm y a Km. Al cultivar estas bacterias en placas con sacarosa al 10% y a 30°C se fuerza una segunda recombinación en la que, en general, se pierde el plásmido. En las colonias resistentes a sacarosa se pueden encontrar 3 genotipos distintos: reversión al alelo salvaje, obtención del alelo mutado y mutación espontánea de *sacB*. Para seleccionar las colonias con el alelo mutado, cada colonia aislada se sembró en LB-Cm y LB-Km y se incubó a 37°C. En aquellas colonias Cm^S y Km^R, la sustitución del alelo silvestre por el alelo mutado se comprobó mediante PCR.

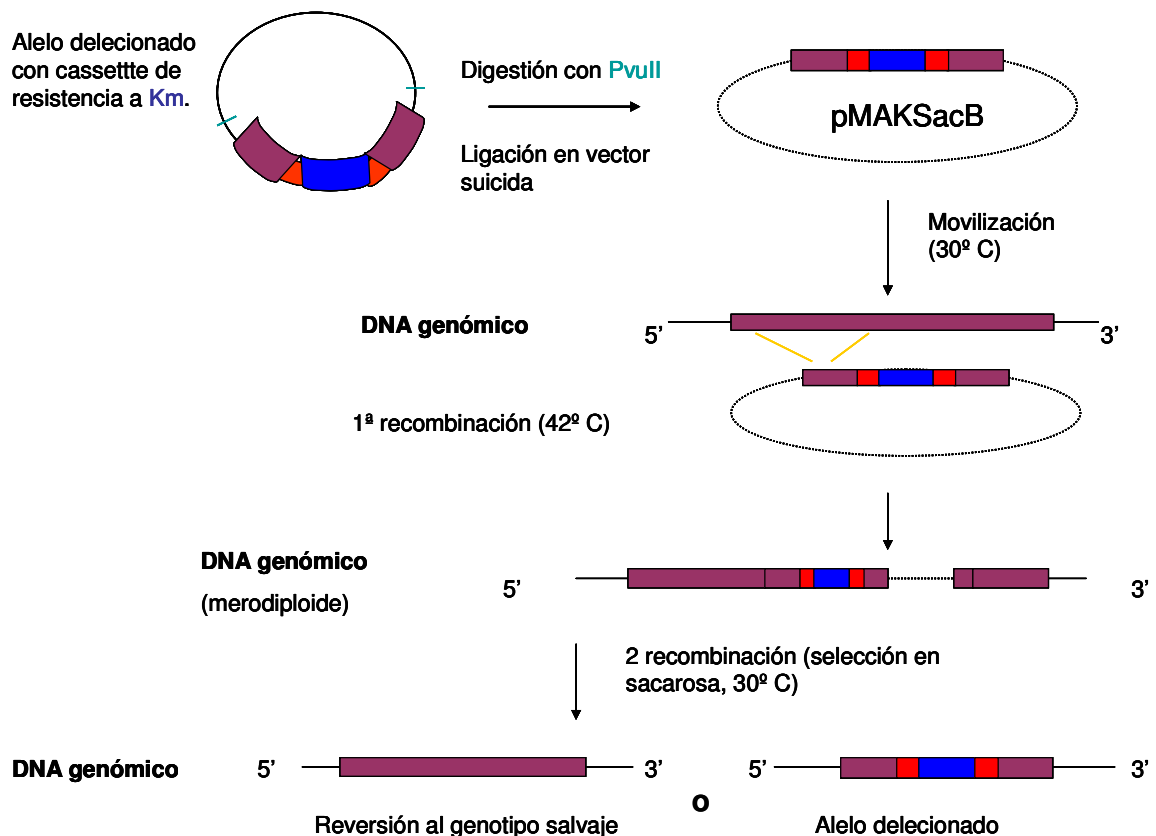


Figura 18: Esquema de mutación por delección mediante inserción de DNA plasmídico.

2.2.3.3 Eliminación del cassette de Km

El cassette de resistencia a Km proviene del plásmido pKD4 está flanqueado por las secuencias FRT (del inglés FLP recognition target). Estas secuencias FRT son dianas de la recombinasa de levadura Fli y permiten la eliminación de la resistencia una vez se ha obtenido el mutante. Para eliminar este cassette es

necesario transformar en las cepas mutantes, mediante electroporación, el plásmido pFLP-2, que contiene un cassette de resistencia a Amp además de codificar para la recombinasa de levadura. Seleccionando aquellos transformantes que no crecen en Km pero sí en Amp se comprobó mediante PCR la pérdida del cassette de Km. Para eliminar el plásmido pFLP-2 de estos transformantes, se realizó una siembra en LB0 de una de las colonias. La pérdida del plásmido se verificó mediante comparación de su siembra en placas de LB-Amp y LB.

2.2.4 Complementación del mutante *hfq*

Para la complementación del mutante *hfq* se amplificó por PCR el gen *hfq* usando como molde el DNA de la cepa 52145. Para esta reacción de PCR se utilizó la polimerasa KOD HS y los pares de cebadores descritos en la **tabla 8** que abarcan tanto el gen *hfq* como 800 pb previos al gen. El fragmento de PCR obtenido, de unos 1200 pb, se purificó a partir de un gel de agarosa al 1%, se digirió con la enzima de restricción *Bam*HI y se clonó en el sitio *Bam*HI/*Scal* del vector pACYC177. El producto de esta ligación se transformó por choque térmico en células competentes de *E. coli* TOP10. Dado que pACYC177 no es un plásmido conjugativo, el plásmido pACYC_Kpnhfq, obtenido mediante extracción de DNA plasmídico, se transformó por electroporación en células electrocompetentes del mutante *hfq* de *K. pneumoniae*. Los transformantes se seleccionaron por su resistencia a Km. La presencia del plásmido se comprobó mediante extracción del DNA plasmídico y digestión con enzimas de restricción.

2.2.5 Construcción de fusiones transcripcionales *lucFF*

Las regiones promotoras de los genes *pagP*, *lpxO*, *rscC*, *yojN* y de los operones *CPS*, *phoP*, *pmrC* y *pmrH* se amplificaron por PCR utilizando DNA genómico de la cepa 52145 de *K. pneumoniae* como molde, las parejas de cebadores descritos en la **tabla 8** (diseñados con sitio de restricción para *Eco*RI) y las polimerasas *Vent* (New England Biolabs) o KOD HS (Novagen), pues son polimerasas con pauta de lectura y dan lugar a amplímeros con extremos romos. Los amplímeros obtenidos en cada caso se purificaron a partir de un gel de agarosa al 1%, se digirieron con la enzima de restricción *Eco*RI y se clonaron en el sitio *Eco*RI/*Sma*I del plásmido pGPL01. El vector pGPL01 es

un plásmido conjugativo que contiene el gen de la luciferasa sin promotor, confiere resistencia a ampicilina y tiene un origen de replicación R6K. Al construir las fusiones transcripcionales, la luciferasa queda bajo el control del promotor de *Klebsiella* clonado. Los diversos plásmidos obtenidos se transformaron mediante choque térmico en células competentes de *E. coli* (DH5 α - λ pir o Sy327 λ pir). Las diferentes fusiones transcripcionales se introdujeron en *K. pneumoniae* mediante conjugación triparental. Los transconjugantes se seleccionaron por su resistencia a rifampicina y a ampicilina. Dado que *Klebsiella* no posee la maquinaria necesaria para replicar este tipo de plásmidos, para que este vector se mantenga es necesario que se integre en el cromosoma por recombinación homóloga. La correcta inserción del vector se comprobó mediante PCR.

2.3 Medida de la actividad luciferasa

Los niveles de transcripción de los genes *pagP*, *lpxO*, *rscC*, *yojN* y de los operones *CPS*, *phoP*, *pmrC* y *pmrH* de *K. pneumoniae* se analizaron midiendo la actividad luciferasa en las cepas reporteras indicadas en el apartado anterior (2.2.5) en las que el gen *lucFF* se haya bajo el control de las regiones promotoras de cada uno de estos genes u operones.

La luminiscencia se midió con un luminómetro (*Lumat LB 9507* de *Berthold Technologies*). Los resultados se expresan en unidades relativas de luz/ufc.

2.3.1 Medida de la actividad luciferasa *in vitro*

Los cultivos en fase estacionaria del crecimiento (DO600 nm 1.6) se recogieron por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente y se ajustaron a una DO600 nm 1. A continuación, se mezclaron 100 μ l de esta suspensión bacteriana con 50 μ l de D-luciferina 1 mM (Synchem) en tampón citrato 100 mM a pH 5, y se midió la luminiscencia.

2.3.2 Medida de la actividad luciferasa *in vivo*

Para la medición de la actividad *in vivo* se inocularon ratones C57BL/6JOlaHsd (Harlan) y se procedió tal y como se detalla en el apartado 2.7.1. Los órganos homogenizados se usaron para determinar la carga bacteriana mediante siembra en placa y para medir la actividad luciferasa de cada fusión

transcripcional. La medición se realizó mezclando 100 µl del homogenizado con 100 µl de D-luciferina.

2.4 Extracción de proteínas de membrana externa

1.5 ml de cultivo bacteriano en fase exponencial de crecimiento se recogió mediante centrifugación. El sedimento se lavó con 1 ml de tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1mM ácido etilen-diamino tetraacético) y se resuspendió en 800 µl de la misma solución. A continuación, se lisaron las bacterias mediante 3 ciclos de 30" de sonicación seguido de 30" de reposo en hielo; usando un sonicador (BRANSON digital sonifier) con una micropunta de 1/8" diámetro y una amplitud del 10%. Seguidamente, las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 3000 rpm y se recogió el sobrenadante, fracción que contiene las membranas totales. A continuación, las membranas se recogieron mediante centrifugación a 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 400 µl de agua destilada y se añadió el mismo volumen de sarcosinato al 4%. Esta mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con lo que se consigue solubilizar la membrana bacteriana interna. Seguidamente la membrana externa se recogió mediante centrifugación a 13000 rpm durante 30 minutos. Esta membrana externa se resuspendió en 40 µl de agua a los que se añadió en mismo volumen de tampón de carga 2X (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 10% glicerol, 100 mM DTT, 0.02% azul de bromofenol). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (véase apartado 2.10) con una proporción de acrilamida:bisacrilamida del 12%. Las proteínas presentes en el gel se tiñeron con solución azul de Coomassie (0,25% azul bromofenol, 50% metanol y 10% ácido acético) durante 2 horas y a continuación se lavó aproximadamente durante 4 horas con solución desteñidora (10% metanol, 10% ácido acético).

2.5 Extracción de LPS para su análisis mediante SDS-PAGE

Para la extracción de LPS se siguió un método previamente descrito ²⁸³. Brevemente, las bacterias se cultivaron en tubos de 50 ml de capacidad con 10 ml de medio de cultivo, suplementado con antibióticos cuando fue necesario, durante 16 horas en agitación y a 37°C. Transcurrido este tiempo las bacterias se recogieron por centrifugación, 4000 rpm durante 20 minutos. Seguidamente,

el sedimento se ajustó en PBS a una $DO_{600\text{ nm}}$ 1.5. A continuación se tomaron 1.5 ml de esta suspensión bacteriana y se transfirieron a un tubo tipo Eppendorf® que se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos. El sedimento bacteriano se resuspendió en 80 µl de tampón de lisis (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 4% β-mercaptoetanol) y se incubó 10 minutos a 95°C. Tras atemperar las muestras, se añadieron 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml, Sigma-Aldrich) y se dejó actuar durante 1 hora a 60°C. Seguidamente se añadieron 150 µl de fenol previamente calentado a 70°C y se incubaron las muestras durante 15 minutos a 70°C, vorteadando cada 5 minutos. Para facilitar la separación de las fases fenólica y acuosa, las muestras se enfriaron en hielo y a continuación se centrifugaron a máxima velocidad durante 10 minutos. Se transfirió 100 µl de la fase superior acuosa a un tubo nuevo al que se añadió 1 ml de etanol para precipitar el LPS. Tras mezclar vigorosamente, se centrifugaron las muestras a máxima velocidad durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el precipitado, una vez seco, se resuspendió en 80 µl de tampón de carga 1X (Tris-HCl 62.5 mM pH6.8, 10% glicerol, 2.5% β-mercaptoetanol, 1% SDS, 0.01% azul de bromofenol). Las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 10-12%) (véase apartado **2.10**). El LPS presente en el gel se tiñó usando el kit *Pro-Q® Emerald 300 Lipopolysaccharide Gel Stain kit* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.6 Extracción y cuantificación de CPS

La extracción de CPS se realizó a partir de cultivos líquidos de las diferentes cepas de *K. pneumoniae* tras 16 horas de incubación. Tras recoger las células por centrifugación, los sedimentos bacterianos se resuspendieron en 500 µl de agua destilada. Esta suspensión se calentó a 68°C durante 2 minutos. A continuación se añadieron 500 µl de fenol, se mezcló con ayuda de un agitador tipo vórtex, y se incubó de nuevo a 68°C durante 30 minutos. Tras dejar enfriar las muestras en hielo, se añadieron 500 µl de cloroformo y se agitó enérgicamente con un vórtex. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 rpm para recuperar la fase acuosa. El CPS, presente en esta fase acuosa, se precipitó mediante la adición de 3 volúmenes

de etanol absoluto e incubación a -20°C durante unas 16 horas. El precipitado se recuperó por centrifugación a 13000 rpm durante 15 minutos y se resuspendió en 1 ml de agua destilada. Para conseguir la completa disolución del polisacárido capsular, las muestras se incubaron 48 horas a 4°C en agitación suave antes de proceder a su cuantificación.

Para estimar la cantidad de cápsula en las muestras se midió la concentración de ácido urónico en las mismas, ya que las cepas de *Klebsiella* de serotipo capsular K2 poseen ácido glucorónico en su CPS. Se utilizó un método con carbazol previamente descrito^{284 285}. De manera breve, 0.5 ml de las muestras se mezclaron con 3 ml de tetraborato sódico 0.025 M en ácido sulfúrico, se agitaron suavemente y se calentaron a 100°C durante 10 minutos. Tras dejar que las muestras se atemperasen, se añadieron 100 µl de carbazol 0.125% (p/v) en etanol absoluto, se agitaron de nuevo de manera suave y se volvieron a calentar a 100°C durante 15 minutos. Una vez atemperadas las muestras se midió la DO_{530 nm} de la solución y se comparó con una curva patrón de ácido D-glucorónico-γ-lactona (Sigma-Aldrich).

2.7 Infección en el modelo murino

Utilizamos el modelo murino para estudiar la virulencia de las cepas de *K. pneumoniae*, la medición de la actividad de las fusiones transcripcionales obtenidas y para obtener el lípido A que *K. pneumoniae* expresa *in vivo* sin necesidad de aislar la bacteria previamente. En todos los casos los animales fueron tratados de acuerdo con la convención europea para la protección de animales vertebrados usados con fines experimentales y otros propósitos científicos (Directiva del Consejo Europeo 86/609/EEC) y el protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de las Islas Baleares. Los ratones se anestesiaron con una mezcla de ketamina y xilazina (50 mg/kg, 5 mg/kg) previa a la inoculación bacteriana

2.7.1 Virulencia y medida de actividad luciferasa

Para estudiar la virulencia *in vivo* de las cepas de *K. pneumoniae* generadas, así como para medir la actividad luciferasa de las cepas reporteras (descritas en el apartado 2.3.2 y en la **tabla 6**) se utilizaron ratones hembra de 8-9 semanas de edad de la línea C57BL/6JOlaHsd (Harlan). El inóculo se realizó por vía intranasal usando 20 µl de una suspensión bacteriana de 10⁵ ufc/ml en

PBS. Los ratones control se inocularon con la misma cantidad de PBS estéril. Se usaron 5 ratones por condición. Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical, se diseccionaron los distintos tejidos (tráquea, pulmones, hígado y bazo) y se procesaron de forma distinta en función del análisis posterior. En el caso del análisis de expresión génica por RT-PCR, la mitad del pulmón fue rápidamente congelada en nitrógeno líquido y guardada a -80°C para la posterior purificación del RNA. La otra mitad del pulmón se procesó como el resto de tejidos para determinar la carga bacteriana. En este caso, los órganos se homogenizaron inmediatamente en PBS con un triturador "Ultra-Turrax T10 basic" (IKA), se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placas de LB-Rif⁵⁰. Las placas se incubaron a 37°C y al día siguiente se hizo el recuento y estimación de ufc/gramo de tejido.

2.7.2 Obtención del lípido A *in vivo*

Para la obtención del lípido A expresado *in vivo*, se inocularon por vía intranasal ratones hembra de la línea Hsd:ICR (CD-1, Harlan). En este caso la dosis del inóculo fue de 10^6 ufc/ml. A las 24 horas, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical o mediante anestesia (ketamina 100 mg/kg y xilazina 10 mg/kg en PBS) para obtener el lavado broncoalveolar (BAL). Brevemente, tras abrir la caja torácica mediante una pequeña sección del diafragma, a la altura del corazón para evitar perforar el pulmón, se expuso la traquea y se le realizó una incisión perpendicular a través de la que se introdujo un catéter de plástico de alrededor de 1mm de diámetro (B. Braun). Con una jeringa de 2 ml se introdujo 1 ml de PBS estéril en el pulmón y se volvió a recoger (proceso que se repitió 2 veces).

Para extraer el lípido A que *K. pneumoniae* expresa en el pulmón, se recogió tanto el BAL como el pulmón entero y se homogenizó. Además también se realizaron extracciones de lípido A en bazo e hígado. Para optimizar el aislamiento de lípido A, las extracciones se realizaron tanto a partir de muestras frescas como a partir de muestras liofilizadas y se compararon dos métodos distintos de extracción; por un lado la hidrólisis con ácido isobutírico e hidróxido de amonio (descrita en el apartado 2.8.1) y por otro lado una lisis con TRIzol[®] seguida de hidrólisis en condiciones ligeramente ácidas (descrita en el apartado 2.8.2).

2.8 Extracción y análisis de lípido A

Para extraer el lípido A se utilizaron 3 métodos distintos que se detallan a continuación. En todas las extracciones se incluyó la cepa de *E. coli* MG1655 cultivada a 37°C como control de extracción. En todos los casos, tras la extracción del lípido A, se analizaron las muestras mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

2.8.1 Extracción de lípido A mediante hidrólisis ácida

Este método se utilizó para obtener el lípido A a partir de cultivos bacterianos en la fase exponencial del crecimiento así como para obtener el lípido A que expresa *K. pneumoniae* durante una infección in vivo. En el caso de los cultivos bacterianos, la extracción se realizó a partir de sedimentos frescos. En el caso de las muestras procedentes del BAL o de homogenizado de órganos, la extracción se realizó tanto con muestras frescas como con muestras liofilizadas. Se utilizó un método descrito previamente²⁸⁶. De manera breve, se añadieron 400 µl de una mezcla 5:3 (v:v) de ácido isobutírico:hidróxido de amonio 1 M, por cada 10 mg de muestra. Esta mezcla se transfirió a tubos con tapón de rosca y se incubó 2 horas a 100°C agitando periódicamente mediante vórtex cada 15-20 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se dejaron enfriar en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 2000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante resultante fue transferido a un nuevo tubo, diluido en el mismo volumen de agua destilada y se secó mediante speed-vac (Thermo Fisher scientific). Seguidamente, los sedimentos se lavaron dos veces con 400 µl de metanol, centrifugando a 2000 x g durante 15 minutos. El lípido A resultante se solubilizó en 30-50 µl de una mezcla de cloroformo:metanol:agua (3:1,5:0,25)

2.8.2 Extracción de lípido A en condiciones ligeramente ácidas

Este método se utilizó para extraer el lípido A procedente del BAL así como de los órganos homogenizados, y se usaron tanto muestras frescas como muestras liofilizadas (apartado 2.7). Brevemente, las muestras se resuspendieron en 300 µl de TRIzol® Reagent (Ambion) y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 30 µl de cloroformo a cada muestra, se agitaron vigorosamente con un agitador tipo vórtex y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15

minutos. Tras centrifugar durante 10 minutos a 12000 x g, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se reservó. A la fase fenólica se le añadieron 100 µl de agua, se agitó mediante vórtex y se incubó nuevamente durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar, se combinaron ambas fases acuosas, que contienen el LPS, y se secaron mediante speed-vac. Una vez secas, las muestras se resuspendieron en 500 µl de tampón de hidrólisis (acetato de sodio 12.5 mM, 1% SDS pH 4.5), se calentaron durante 1 hora a 100°C para separar el lípido A del polisacárido y se volvieron a secar mediante speed-vac. Para eliminar los restos de SDS se realizaron una serie de lavados. Primero un lavado con 100 µl de agua y 500 µl de etanol acidificado (etanol 95%, HCl 20 mM). El lípido A se recuperó mediante centrifugación a 2000 rpm durante 15 minutos, descartándose el sobrenadante. El precipitado se lavó 3 veces más añadiendo 500 µl de etanol 95% y centrifugando de la misma forma, descartando el sobrenadante. Finalmente, se dejó secar completamente el precipitado de lípido A y se solubilizó en una mezcla de cloroformo:metanol (3:1)^{287 288}.

2.8.3 Purificación de lípido A

Esta extracción se realizó para obtener lípido A libre de otras moléculas inmunógenas, como proteínas o ácidos nucleicos. Para evitar la co-purificación de CPS se utilizaron los mutantes descapsulados isogénicos. El lípido A obtenido mediante este método se utilizó para los experimentos de estimulación in vitro realizados con MH-S (apartado 2.9).

Para purificar el lípido A se realizó una extracción previa de LPS a partir de un cultivo bacteriano en 2 litros de medio de cultivo líquido. Tras centrifugar el cultivo, los sedimentos bacterianos se resuspendieron en agua destilada a razón de 100 ml de agua por cada 3 gramos de bacteria. A continuación se añadió 1 volumen de fenol previamente calentado a 66°C y se incubó durante 15 minutos a 66°C, agitando enérgicamente cada 5 minutos. Seguidamente, las muestras se dejaron enfriar en hielo para facilitar la separación de las fases. A continuación, las muestras se centrifugaron a 8000 x g durante 15 minutos a 4°C. El LPS presente en la fase acuosa, la superior, se precipitó añadiendo 4 volúmenes de una mezcla de metanol -1% metanol saturado con acetato sódico e incubando durante 12-16 horas a -20°C. El precipitado se recuperó

por centrifugación a 8000 x g, 15 minutos a 4°C. El sedimento resultante se resuspendió en agua y se dializó durante 24-48 horas en agua para eliminar los restos de metanol. Seguidamente, se recogió el LPS por centrifugación a 8000 x g durante 15 minutos a 4°C y se liofilizó.

El liofilizado se resuspendió en Tris-HCl 100 mM pH7, con 0.05% NaN₃, a razón de 1 ml de tampón cada 10 mg de LPS, para su tratamiento con nucleasas (50 µg/ml DNasa II, 50 µg/ml RNasa I, Sigma-Aldrich) a 37°C durante 16 horas. Seguidamente, se eliminaron las proteínas mediante digestión con 50 µg/ml de proteinasa K (Sigma-Aldrich) a 55°C durante 3 horas. La digestión con proteinasa K se repitió hasta 3 veces.

El LPS volvió a precipitarse añadiendo 4 volúmenes de una mezcla de metanol-1% metanol saturado con acetato sódico e incubando durante 12-16 horas a -20°C. El precipitado se recuperó por centrifugación a 8000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se resuspendió el precipitado en agua y se volvió a dializó para eliminar los restos de metanol. El dializado se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 6 horas a 4°C y el precipitado obtenido se resuspendió en agua y se liofilizó.

Se realizó un tratamiento adicional para eliminar las proteínas ligadas al LPS²⁸⁹. Brevemente, el LPS se resuspendió en tampón TEA-DOC (0.2% trietilamina, 0.5% deoxicolato sódico) a razón de 1 ml de tampón por cada 5 mg de LPS. Se añadió 1 volumen de fenol saturado en agua destilada y se agitó de manera vigorosa y frecuentemente durante 5 minutos. Para permitir que las fases fenólica y acuosa se separen adecuadamente, se dejaron reposar los tubos 5 minutos a temperatura ambiente seguido de 5 minutos en hielo; y posteriormente se centrifugaron durante 20 minutos a 8500 x g y 4°C. Se recuperó y reservó la fase acuosa, superior, y se añadió a la fase fenólica, inferior, 1 volumen de tampón TEA-DOC, se agitó nuevamente y se repitieron los pasos mencionados anteriormente, recuperando otra vez la fase acuosa. Después de juntar ambas fases acuosas, se realizó una segunda extracción fenólica. Finalmente, a la fase acuosa obtenida se le añadieron 3 volúmenes de etanol-acetato de sodio, se agitó y se incubó durante 16 horas a -20°C. Se recogió el precipitado por centrifugación a 8500 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó con sumo cuidado y el precipitado se lavó añadiendo etanol absoluto. Nuevamente, se recogió el LPS por centrifugación,

se resuspendió en agua pura, se sonicó, se dializó durante 16-24 horas en agua y se liofilizó. En este momento se comprobó la ausencia de ácidos nucleicos y proteínas mediante la medición de la DO (ratio 260/280) utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo-Scientific).

A continuación, y para obtener el lípido A ²⁸⁸, el LPS se disolvió en 500 µl de acetato de sodio 10 mM pH4.5 (ajustado con 4 M de HCl), 1% SDS y se sonicó hasta su completa disolución. Seguidamente se calentó a 100°C durante 1 hora. Las muestras se secaron en el *speed-vac*. El SDS se eliminó añadiendo a la muestra 100 µl de agua destilada y 500 µl de etanol acidificado (20 mM HCl en etanol absoluto) y centrifugando 10-15 minutos a 2000 x g. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado añadiendo etanol absoluto y centrifugando a 2000 x g durante 15 minutos. Este proceso que se repitió 2 veces. Finalmente la muestra fue liofilizada, obteniendo así un producto de color blanco y aspecto algodonoso que es el lípido A. Este lípido A se solubilizó en agua.

2.8.4 Análisis del lípido A mediante MALDI-TOF

Tras solubilizar el lípido A de cada muestra, se añadieron unos granos de la resina de intercambio iónico Dowex 50WX8-H⁺ (Sigma-Aldrich) y el espectro de masas se analizó mediante MALDI-TOF. Para ello, se depositó 1 µl de muestra sobre una placa de análisis y se cubrió con la misma cantidad de matriz (ácido cítrico 0.1 M saturado con 2',5'-ácido dihidroxibenzoico, Sigma-Aldrich). El análisis se realizó mediante la técnica de **espectrometría** de masas MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight*) utilizando el espectrómetro de masas Autoflex II MALDI-TOF (Bruker Corporation) en modo negativo y fijando un voltaje de aceleración iónica de 20 kV. Para la calibración del MALDI-TOF se utilizó una solución estandarizada de péptidos (Bruker Corporation). Cada espectro final es el resultado de la suma de 300 espectros distintos obtenidos de una misma preparación.

2.9 Cultivo de macrófagos alveolares de ratón

La línea celular de macrófagos alveolares de ratón MH-S (CRL-2019; ATCC) se utilizó como modelo *in vitro* de infecciones causadas por *K. pneumoniae*. Estos macrófagos alveolares de ratón, se mantuvieron en cultivo en frascos de poliestireno de 75 cm² (BioLite, Thermo Scientific), a 37°C en una atmósfera

saturada de humedad al 95% y 5% CO₂ en medio RPMI-1640 con L-glutamina (PAA; E15-840) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (Biowest), 20 mM HEPES (Biowest) y un 1% de un cóctel de antibióticos y antimicóticos (PAA) compuesto por penicilina (10000 u/ml), sulfato de estreptomicina (10 mg/ml) y anfotericina B (25 µg/ml). A este medio lo denominamos RPMI completo (C-RPMI). Para el subcultivo de las células, se descartó el medio de cultivo y los MH-S (adheridos en el frasco) se lavaron dos veces con PBS atemperado. A continuación se realizó un tratamiento con tripsina (Biowest) durante unos 5 minutos a 37°C, para despegar los MH-. Transcurrido este tiempo, se añadieron 10 ml de C-RPMI para detener la digestión y recoger los macrófagos. Después de centrifugar, 5 minutos a 1800 rpm, se añadieron unos mililitros de C-RPMI al sedimento celular para realizar el recuento de células. A partir de esta suspensión se sembraron los MH-S para realizar los experimentos y se mantuvo la línea en cultivo hasta un máximo de subcultivo 24.

Para los distintos experimentos realizados, salvo que se indique de otra forma, los MH-S se sembraron en placas de poliestireno de 24 pocillos (Cellstar), a razón de 5×10^5 MH-S por pocillo, y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 80%, momento en el que se realizaron los distintos ensayos.

2.9.1 Estimulación de macrófagos con lípido A para la detección de TNF α

Para determinar la secreción de TNF α por parte de los MH-S se sembraron 1×10^5 macrófagos/pocillo en placas de 96 pocillos con lo que al día siguiente se alcanzó una confluencia de cultivo de alrededor del 80%. En ese momento, se retiró el medio y se añadió medio C-RPMI con diferentes concentraciones (1 µg/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml y 1 ng/ml) de los diferentes lípidos A obtenidos mediante el protocolo descrito **en el apartado 2.8.3**. Transcurridas 16 h desde la adición de los distintos lípidos A se recogieron 160 µl del medio de cultivo y se centrifugó para eliminar detritus celulares. El sobrenadante obtenido se utilizó para determinar la cantidad de TNF α presente en el medio mediante inmunoensayo tipo ELISA usando el kit comercial "Mouse TNF-alpha Instant ELISA" (eBioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.9.2 Estimulación de macrófagos con lípido A para la obtención de extractos celulares para *western blot*

Los macrófagos fueron estimulados con los diferentes lípidos A a una concentración final de 100 ng/ml, en medio C-RPMI, durante 15, 30, 60 y 90 minutos, para analizar su efecto sobre la activación de distintas proteínas. En los tiempos indicados tras la estimulación con lípido A, las placas se depositaron en hielo y se realizaron 3 lavados con PBS frío. Tras retirar completamente el PBS, se añadieron 80 µl de tampón de carga 1X a cada pocillo. Los extractos celulares se recogieron con un raspador de células, a continuación se sonicaron durante 15 segundos para conseguir una lisis celular completa y reducir la viscosidad de las muestras y se hirvieron 10 minutos a 100°C para desnaturalizar completamente las proteínas. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis mediante SDS-PAGE y *western blot* (véase apartado 2.10).

2.9.3 Estimulación de macrófagos con lípido A para la visualización de translocación de p65 al núcleo

En este caso, previo a la siembra de los MH-S, se depositó en cada pocillo un cubreobjetos circular de borosilicato de 13 mm de diámetro (VWR international). Las estimulaciones se llevaron a cabo con una concentración final de 5 µg/ml de lípido A, diluido en medio de cultivo, durante 45 minutos. Seguidamente se realizaron 2 lavados con PBS y los cubreobjetos se fijaron durante 15 minutos con paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4% y se conservaron en 14 mM NH₄Cl (Panreac) disuelto en PBS a 4°C hasta la tinción. En el momento de la tinción, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS-0.1% saponina para permeabilizar las membranas celulares y, seguidamente, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con 40 µl del anticuerpo primario de conejo anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1/200 en una solución de PBS-0.1% saponina-10% suero de caballo (Jackson immunological) a la que además se le añadió Hoesch (Life technologies) a una dilución 1/2500. A continuación los cubreobjetos se lavaron de nuevo 3 veces con PBS-Saponina 0.1% y se incubaron durante 30 minutos con 40 µl del anticuerpo secundario de burro anti-conejo conjugado con el fluoróforo Rhodamin Red-X (Jackson immunological) diluido 1/100 en la misma solución anterior. Seguidamente, los cubreobjetos se lavaron de nuevo 3 veces con

PBS-0.1% saponina, una vez con agua y se procedió al montaje sobre portaobjetos usando el gel montador Prolong Gold antifade (Thermo Fisher Scientific). Los portaobjetos se conservaron a 4°C en la oscuridad hasta su análisis. Las muestras se analizaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM6000, tomando imágenes con una cámara Leica DFC350FX.

2.10 Western blot

Los extractos celulares obtenidos en el apartado **2.9.3** fueron sometidos a electroforesis en gel de SDS-10% poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes²⁹⁰ (Bio-Rad) usando un sistema Mini-protean® de Bio-Rad. Al ser sometidas a la electroforesis, las proteínas presentes en las muestras migran en el gel en función de su tamaño, a menor tamaño mayor migración, ya que todas las proteínas tienen la misma carga debido a la presencia del SDS. Tras la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando un sistema de transferencia semi-húmeda (Trans-Blot® SD semidry transfer cell de Bio-Rad) aplicando un voltaje de 10 V durante 35 minutos. A continuación la membrana se tiñó con la solución comercial Ponceau S (Sigma-Aldrich) para verificar la calidad de la transferencia. Una vez comprobada la correcta transferencia, la membrana se bloqueó durante al menos 1 hora con una solución de 4% de leche en polvo en TBS (50 mM Tris-base; 150 mM NaCl, pH 7.6) con 0.1% Tween-20. Para la detección de las distintas proteínas a analizar se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo a una dilución 1/1000 en tampón TBS con 0.1% Tween 20 y 5% albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich). Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-IkB α , anti-phospho-p38, anti-phospho-p44/42 y anti-phospho-JNK (Cell Signalling). Las incubaciones con el anticuerpo primario se llevaron a cabo durante toda la noche a 4°C en agitación suave, según las recomendaciones de la casa comercial. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Thermo Scientific) diluido 1/5000 en tampón TBS-4% leche en polvo. Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente.

Como control de carga se determinó la cantidad de tubulina presente en cada muestra. Para ello se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -tubulina

humana (Sigma-Aldrich) a una dilución 1/3000. Para la detección de estas bandas se utilizó un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Thermo Scientific) diluido 1/5000 en tampón TBS-4% leche en polvo. Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente.

En ambos casos, para visualizar la actividad de la peroxidasa de rábano picante se utilizó una solución casera de revelado con luminol y ácido cumárico consistente en las siguientes soluciones:

Solución 1: 2.5 mM luminol, 0.4 mM ácido p-cumárico, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5).

Solución 2: 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), H₂O₂.

Para el revelado de las membranas se combinaron ambas soluciones a razón 1:1. La mezcla se vertió entonces sobre la zona de la membrana donde se encontraban las proteínas de interés y se incubó durante 1 minuto en la oscuridad. A partir de ese momento se analizó la emisión de luz por parte de las membranas mediante el sistema de captura de imágenes por quimioluminiscencia GeneGnome XRQ (Syngene).

En algunos casos, fue necesario un paso de *stripping* de la membrana para eliminar los anticuerpos anteriormente usados y así reutilizar la membrana para determinar la cantidad de tubulina. Para el *stripping* se realizaron 2 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con tampón de *stripping* (Glicina 200 mM, 3.5 mM SDS, 0.01% Tween-20, ajustado a pH 2.2)

2.11 Ensayos de difusión radial

Para determinar la capacidad de unión de la colistina a los diferentes lípidos A obtenidos, así como a sus respectivas cepas parentales, se realizaron ensayos de unión de péptidos antimicrobianos y se utilizó *E. coli* como bacteria indicadora de la cantidad de péptido que ha quedado libre.

La cepa de *E. coli* TOP10, que se utilizó como indicadora, se recogió por centrifugación a 4000 rpm durante 10-20 minutos, en la fase exponencial del crecimiento y se resuspendió en PBS a una concentración de aproximadamente 10⁸ ufc/ml (DO_{540 nm} 0.3). A continuación se tomaron 180 µl de esta suspensión bacteriana y se inocularon en 30 ml de gel de **medio**

mínimo atemperado (1% de agarosa de baja densidad, SeaKem LE agarose; FMC, Rockland ME, en 2 mM de HEPES, pH 7.2 y 0.3 g/l de TSB, caldo de soja tripticaseína, Laboratorios Conda). Esta mezcla se vertió en placas de Petri cuadradas (10 cm²) y, cuando hubo solidificado, se excavaron pocillos de aproximadamente unos 2 mm de diámetro. Entretanto, un total de 10⁷ células de *K. pneumoniae* cultivadas tanto en LB como en VMM, o bien 5 µg de los respectivos lípidos A obtenidos, se incubaron durante 20 minutos a 37°C, en tubos tipo Eppendorf®, con polimixina B o colistina (**tabla 3**) a diferentes concentraciones. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron los tubos a máxima velocidad durante 10 minutos, se tomaron 10 µl del sobrenadante y se inocularon en cada pocillo. Este sobrenadante contiene los péptidos libres, mientras que los péptidos que estuviesen pegados a las bacterias o al lípido A quedarían en el precipitado. Las placas se incubaron durante 3 horas a 37°C para permitir la difusión de las gotas. Seguidamente se vertieron 30 ml de **medio rico** atemperado (1% agarosa de baja densidad, 6% TSB) sobre la primera capa de gel y, una vez polimerizado, se incubaron las placas a 37°C. Al día siguiente se midieron los halos de inhibición de crecimiento de *E. coli* y se expresó en unidades de difusión radial siguiendo la relación: 1mm=10 unidades. Los coeficientes de correlación y la concentración mínima inhibitoria (intersección con el eje X) se determinaron a partir de la curva de regresión donde el eje X corresponde al log₁₀ de la concentración de péptido antimicrobiano y el eje Y a las unidades de difusión radial.

2.12 Ensayos de supervivencia

2.12.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria 50

Los cultivos bacterianos en fase exponencial de crecimiento se recogieron mediante centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos. Se preparó una suspensión bacteriana de aproximadamente 10⁵ ufc/ml en medio LTM (del inglés *liquid test medium*) compuesto por un 1% de Caldo Soja Tripticaseína (TSB) en tampón fosfato dibásico 10mM pH 6.5, NaCl 10 mM. Se incubaron 5 µl de esta suspensión bacteriana con 25 µl de diferentes concentraciones de los distintos péptidos antimicrobianos (**tabla 3**) durante 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo de incubación, las bacterias se sembraron en placas

de LB agar que se incubaron a 37°C durante 24 horas para realizar el recuento de colonias y cálculo de la concentración inhibitoria 50% (CI₅₀) para cada cepa analizada. Esta CI₅₀ se determinó como aquella concentración que provoca una reducción del 50% de bacterias viables con respecto a las bacterias no expuestas al péptido.

Tabla 3: Péptidos antimicrobianos utilizados

AMP	Concentración stock	Casa comercial
Polimixina B	6000 U/mg	Sigma-Aldrich
Colistina	15000 U/mg	Sigma-Aldrich
HNP-1	ND	Sigma-Aldrich
BD-1	ND	Sigma-Aldrich
BD-2	ND	Sigma-Aldrich

2.12.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria 50 (CMI₅₀) mediante el método de microtitulación en caldo

Los cultivos bacterianos en fase exponencial se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en PBS a una concentración de 10⁶ ufc/ml. A continuación se añadieron 2 µl de la suspensión bacteriana a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Los pocillos de esta placa de microtitulación contenían 100 µl de una concentración decreciente del antibiótico a testar diluido en medio Mueller-Hinton (Conda-Pronadisa). A partir de una solución inicial del antibiótico a testar de µg/ml localizado en la primera fila, cada fila contigua contenía la mitad de la concentración que la fila previa hasta conseguir la concentración mínima de antibiótico deseada. En una de las filas de la placa se inocularon 2 µl de suspensión bacteriana al medio Mueller-Hinton sin antibiótico, como control de crecimiento; mientras que otra de las filas no se inoculó con la suspensión bacteriana ni contenía antibiótico, con lo que sirvió de control de esterilidad. La placa se incubó a 37°C durante 16 horas tras lo que se midió el crecimiento bacteriano midiendo la DO_{530nm}. La CMI₅₀ es la mínima concentración de antibiótico que reduce el crecimiento bacteriano un 50% o más respecto del cultivo bacteriano sin presencia de antibiótico.

2.13 Ensayos de permeabilidad de membrana

Las bacterias se cultivaron en medio VMM, a 37°C y en agitación continua durante 16 horas. Utilizamos este medio porque es en el que *K. pneumoniae* expresa el mismo lípido A que expresa *in vivo* en el pulmón. Tras recoger las bacterias mediante centrifugación, se preparó una suspensión bacteriana de 10⁸ ufc/ml en tampón HEPES 5 mM, pH 7.2 (Sigma-Aldrich). A continuación, se tomó 1 ml de la suspensión bacteriana y se añadió 1 µl de colistina (1 mg/ml, 15000 U/mg, Sigma-Aldrich) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 10 µl de 1-N-fenilnaftilamina 100 mM (1-NPN, Sigma-Aldrich) y se midió la captación de 1-NPN utilizando un fluorímetro “*Fluorescence Spectrometer LS55 (Perkin Elmer precisely)*” midiendo la intensidad de fluorescencia en el espectro de emisión desde 350 nm a 600 nm, con una excitación fija 320 nm, una anchura de rendija de 3 nm y una velocidad de 1500 nm/minuto. Este 1-NPN es un compuesto que emite fluorescencia de forma leve en ambientes acuosos mientras que en ambientes hidrofóbicos aumenta su emisión de fluorescencia. Por tanto, un aumento en la emisión de fluorescencia de este compuesto en nuestras muestras nos da una idea de la permeabilidad de las membranas bacterianas al paso del 1-NPN.

2.14 Cuantificación de la expresión génica

Para el análisis de la expresión génica se realizaron extracciones de RNA a partir de cultivos bacterianos o de órganos de ratones infectados. El RNA obtenido en ambos casos se analizó con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo-Scientific) para determinar la pureza y calcular la concentración y se mantuvo a -80°C hasta el análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

2.14.1 Extracción de RNA de tejido

Para la extracción de RNA a partir de muestras de los distintos órganos de ratón se pesó cada órgano y se homogenizó en 1ml TRIzol[®] Reagent (Ambion). Se realizó un paso previo de purificación con cloroformo y 2-propanol. A continuación, se repurificó el RNA total utilizando el “Nucleospin RNAII kit” (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante que incluye un tratamiento con DNasa en columna.

2.14.2 Extracción de RNA bacteriano

Las extracciones de RNA bacteriano se realizaron a partir de cultivos en la fase exponencial del crecimiento. Para detener el metabolismo del RNA y estabilizarlo, a los 5 ml de cultivo se añadieron 500 μ l de una mezcla de etanol:fenol (19:1) enfriado en hielo. Para partir de la misma cantidad de bacterias, los cultivos se centrifugaron y se ajustaron a una $DO_{600\text{ nm}1}$ (10^9 ufc/ml). Se tomó 1 ml de esta suspensión bacteriana y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Seguidamente, y para optimizar la lisis bacteriana, los sedimentos bacterianos se resuspendieron en 400 μ l de tampón de lisis Miller (0.02 M de acetato de sodio, 0.5% SDS, 1 mM EDTA, pH 5.5) y se incubaron a 65°C durante 10 minutos. A partir de este momento se continuó la extracción usando el “Nucleospin RNAII kit” (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.14.3 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

La cuantificación de los niveles de mRNA se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Para obtener el cDNA que sirve de molde para la PCR cuantitativa se retrotranscribieron 2 μ g de RNA usando *random hexamer primers* (Ref. S0142; *Fermentas*) y la “M-MLV Reverse transcriptase” (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando el RNA a transcribir fue de origen eucariota se añadieron, además, *Oligo(dT)18 primer* (Ref. S0132, *Thermo Scientific*) para enriquecer la retrotranscripción del mRNA.

Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en un iQ5 real-time PCR instrument (BioRad®) con la Master Mix “KappaSYBR Fast qPCR Kit” (*Kapa Biosystems*) y los pares de cebadores descritos en la **tabla 8**. Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ l utilizando 100 ng del cDNA. Para la amplificación se utilizó el siguiente protocolo:

3 minutos a 95°C (activación de la polimerasa)
15 segundos a 95°C } x 45 ciclos
30 segundos a 60°C }

Seguidamente, se realizó una curva de fusión para comprobar la especificidad de los cebadores y los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1.5-2% para comprobar que el tamaño del amplímero era el correcto.

El aumento relativo de un mRNA determinado se calculó en base a su ciclo umbral (Ct, *cycle threshold*,) con respecto al Ct del mRNA de un gen *housekeeping* (descritos en la tabla 8). El ciclo umbral es aquél en el que el lector empieza a detectar un incremento significativo de la fluorescencia respecto a la señal base, y es inversamente proporcional a la cantidad de cDNA presente en la muestra. Se utilizó el método simplificado de la doble diferencia de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) para calcular el incremento de expresión de un determinado gen. Este método consiste en calcular, para cada muestra, la diferencia entre el Ct para el mRNA gen *housekeeping* y el Ct para el mRNA del gen a estudiar; y se compara esta diferencia obtenida en las muestras tratadas (o problema) con la obtenida en muestras control. Finalmente, el incremento relativo de expresión con el que se expresan los valores es el resultado de elevar 2 al valor que hemos obtenido.

2.15 Estadística

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. La igualdad de los resultados se contrastó a partir de un análisis de la varianza (ANOVA) o mediante el test *t* de Student de dos colas, empleando el programa informático GraphPad Prism versión 4. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de P era menor de 0.05.

Resultados

3. Papel de Hfq en la regulación de las modificaciones del lípido A

3.1 Efecto de la delección de *hfq* en el lípido A de *K. pneumoniae*

Como se ha descrito en la introducción, un mutante *hfq* puede presentar defectos de crecimiento en medios de cultivo estándar²¹⁰. Para poder estudiar el efecto de la delección de *hfq* en la estructura del lípido A de *K. pneumoniae* en la misma fase del crecimiento que la cepa salvaje, se analizó el crecimiento del mutante *hfq* comparándolo con el de la cepa silvestre de *K. pneumoniae* (**figura 19**). Ambas cepas se comportaron de forma similar sin diferencias significativas ni en el tiempo de duplicación ni en la densidad celular observada al final del cultivo en las condiciones estudiadas.

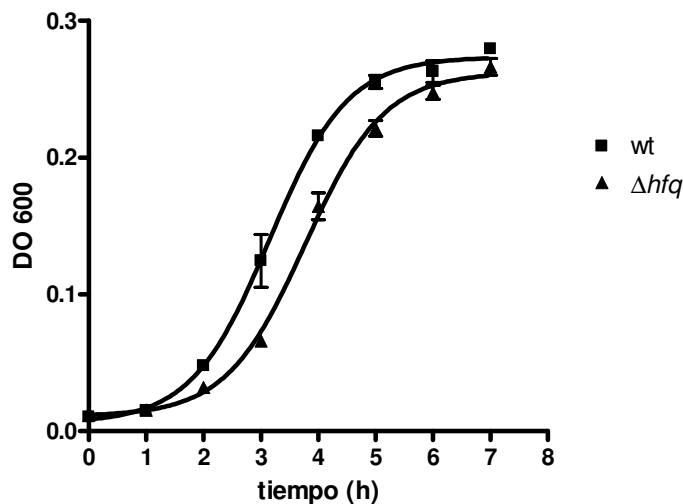


Figura 19: Análisis del crecimiento de la cepa silvestre (wt) y del mutante 52 Δhfq de *K. pneumoniae*, cultivadas en LB a 37°C.

Una vez comprobado que el crecimiento del mutante *hfq* no está drásticamente alterado en estas condiciones de cultivo, analizamos su lípido A y lo comparamos con el de la cepa silvestre de *K. pneumoniae*. Las extracciones de lípido A se realizaron a partir de bacterias cultivadas en LB, a 37°C, en la fase exponencial del crecimiento y se analizaron mediante espectrometría de masas. Los espectros obtenidos se muestran en la **figura 20 A y B**. Ambas cepas expresan un patrón similar en la que la especie mayoritaria (m/z 1824) es un lípido A hexaacilado formado por dos glucosaminas, dos fosfatos, cuatro 3-OH-C₁₄ como ácidos grasos principales y dos cadenas de miristato (C_{14:0})

como acilaciones secundarias. Además del pico principal, en ambos espectros aparecen claramente los picos característicos correspondientes a la adición de una molécula de aminoarabinosa (m/z 1955), y a la adición de una cadena de palmitato (m/z 2036). Concretamente, el pico de m/z 1955 se corresponde con la adición de aminoarabinosa (m/z 131) sobre la molécula de m/z 1824 y el pico de m/z 2036, se corresponde con la adición de una cadena de palmitato ($C_{16:0}$, m/z 239) sobre la molécula de m/z 1797 (que también es hexaacilada y posee laureato, C_{12} , y miristato, C_{14} , como acilaciones secundarias) dando como resultado una molécula de lípido A heptaacilada.

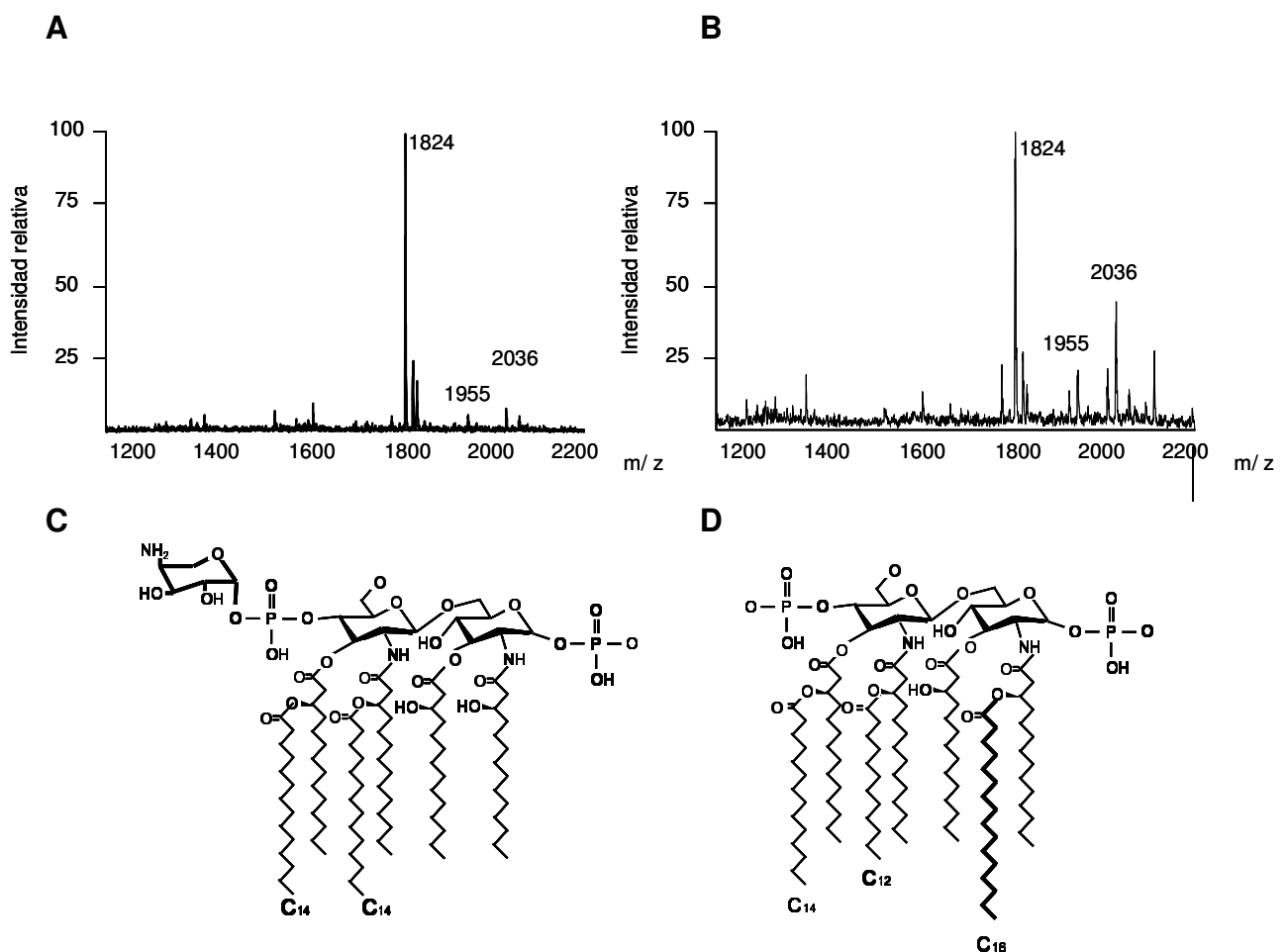


Figura 20: Espectros de los lípidos A de *K. pneumoniae* 52145 (A) y de 52 Δ hfq (B) cultivadas en LB, obtenidos mediante MALDI-TOF. Los resultados son representativos de tres extracciones independientes. (C) Estructura propuesta de la especie de lípido A de m/z 1955. (D) Estructura propuesta de la estructura de lípido A de m/z 2036.

Al comparar ambos espectros, comprobamos como en el espectro de la cepa $52\Delta hfq$ se aprecia un aumento relativo de las especies heptaaciladas del lípido A (m/z 2036) con respecto al lípido A que presenta la cepa silvestre. Este aumento en el grado de acilación en el mutante hfq de *K. pneumoniae* es comparable a los resultados obtenidos al estudiar el lípido A que presenta un mutante hfq de *Y. enterocolitica*¹²¹.

A continuación, y con el fin de comprobar si la expresión episómica de hfq restauraba el patrón de acilación, transformamos el plásmido pACYC177_Kpnhfq en el mutante $52\Delta hfq$ y analizamos su lípido A. Como vemos en la **figura 21**, la complementación restaura el patrón de acilación, y la forma mayoritaria vuelve a ser la forma hexaacilada característica de *K. pneumoniae* (m/z 1824).

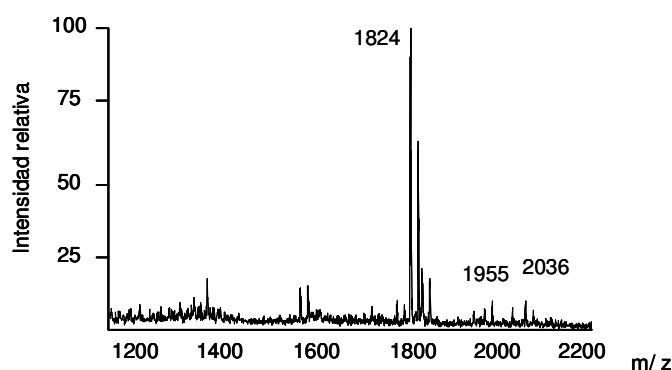


Figura 21: Espectro del lípido A de *K. pneumoniae* $52\Delta hfq$ complementada con pACYC177_Kpnhfq, cultivada en LB y obtenido mediante MALDI-TOF. Los resultados son representativos de 3 extracciones independientes.

3.2 Efecto de la delección de hfq en el lípido A de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Después de comprobar el efecto de la mutación hfq sobre el lípido A de *K. pneumoniae*, y para estudiar si este efecto es similar en otras enterobacterias, caracterizamos el efecto de la delección de hfq en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. En primer lugar se examinó el efecto de la mutación en el crecimiento de esta bacteria. Como se puede comprobar en la **figura 22**, el mutante hfq de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium presenta un crecimiento menor con respecto a la cepa silvestre. A pesar de ello, y como se puede observar en la **figura 22**, ambas cepas tienen la misma tasa de duplicación durante la fase exponencial de crecimiento. Para poder comparar la

estructura del lípido A de ambas cepas en la misma fase de crecimiento, decidimos realizar los análisis en plena fase de crecimiento exponencial.

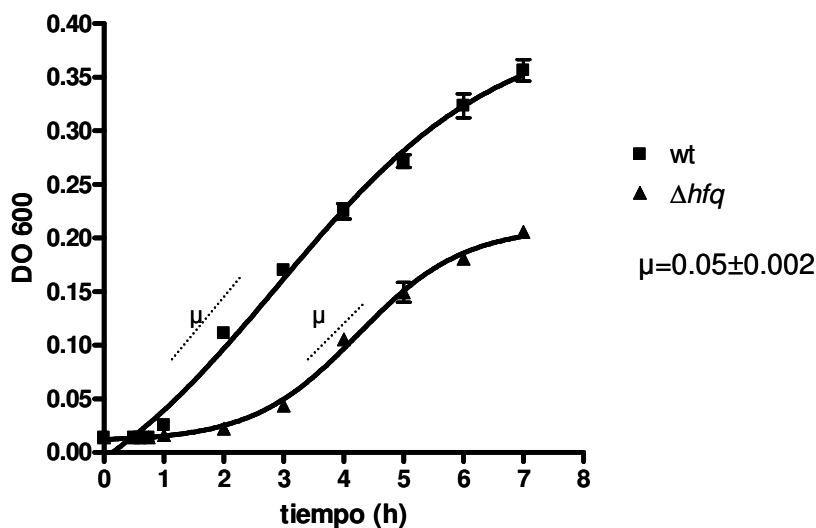


Figura 22: Análisis del crecimiento de la cepa salvaje (wt) y del mutante *hfq* de *S. Typhimurium*, cultivadas en LB a 37°C. μ Tasa de duplicación de ambas cepas durante la fase exponencial.

El lípido A de la cepa silvestre de *S. Typhimurium* (**figura 23A y 23C**) es, predominantemente, hexaacilado (m/z 1797). Este lípido A consiste en un disacárido de glucosamina fosforilado en las posiciones 1 y 4', posee 4 cadenas principales de 3-OH-C_{14:0}, un C_{12:0} y un C_{14:0}, en 2' y 3' respectivamente, como acilaciones secundarias. Además del pico principal, el espectro muestra claramente un pico (m/z 2036) que se corresponde con la masa que resulta de la adición de palmitato como séptimo ácido graso a la estructura mayoritaria. De manera similar a lo que ocurre en *K. pneumoniae* y a lo observado con anterioridad en el caso de *Y. enterocolitica*, el mutante *hfq* de *S. Typhimurium*, presenta un mayor grado de heptaacilación (m/z 2036) en comparación a la cepa silvestre (**figura 23B y 23D**).

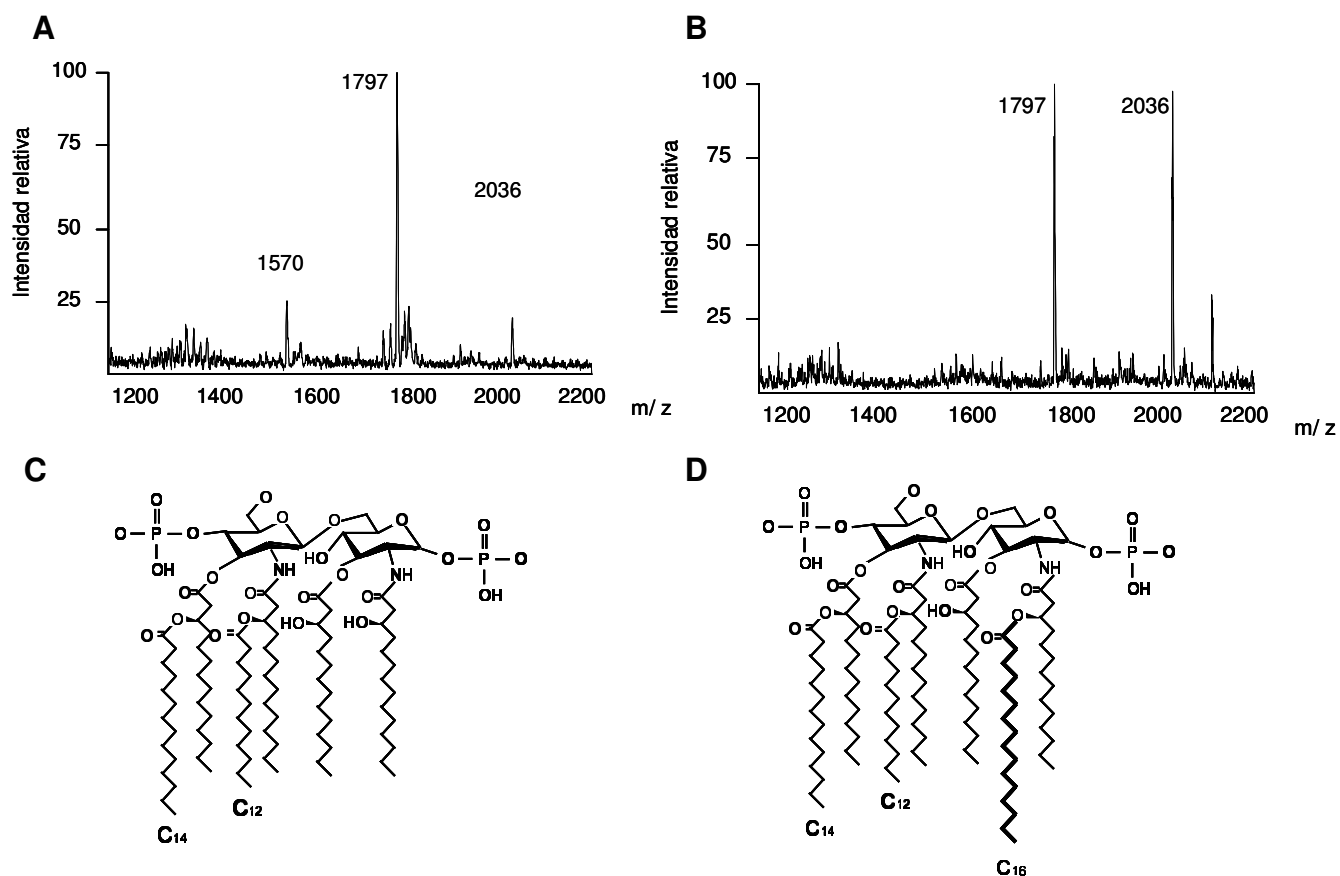


Figura 23: Espectros de los lípidos A de *S. Typhimurium* (A) y del mutante *hfq* (B) cultivadas en LB, obtenidos mediante MALDI-TOF. Los resultados son representativos de tres extracciones independientes. Estructuras propuestas de las especies de lípido A mayoritarias halladas en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* (m/z1797) (C) y del mutante isogénico *hfq* (m/z 2036) (D).

3.3 Análisis del papel de Hfq en la regulación de la remodelación del lípido A

El lípido A del mutante *hfq* presenta un mayor grado de heptaacilación debido a la adición de una molécula de palmitato tanto en *S. Typhimurium* como en *K. pneumoniae*. Como se ha indicado en la introducción, la adición de palmitato al lípido A está regulada por la enzima PagP, por lo que nos preguntamos si la expresión de la enzima responsable de esta modificación estaba alterada en el fondo genético de los mutantes *hfq* de *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica* y *S. Typhimurium*.

En primer lugar, estudiamos el efecto de la delección de *hfq* en la expresión de *pagP*, cuyo producto génico es el responsable de la adición de palmitato al

lípidos A. En la **figura 24** se muestran los datos obtenidos mediante RT-qPCR para las tres enterobacterias estudiadas y sus respectivos mutantes isogénicos. Como puede verse, la expresión de *pagP* está aumentada en el fondo genético de los mutantes *hfq*.

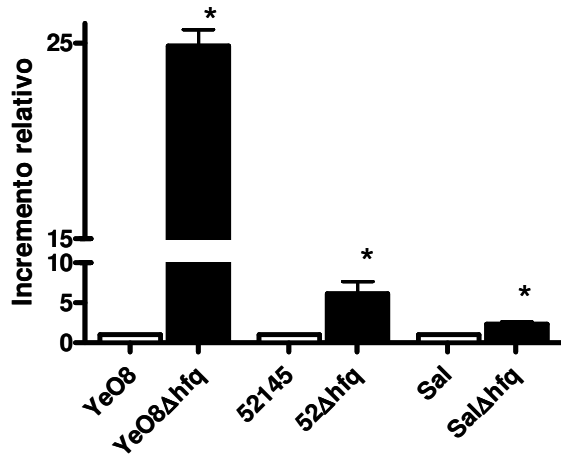


Figura 24: Análisis de la expresión de *pagP* mediante RT-qPCR. Los resultados se muestran como incremento relativo de la expresión. * indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa salvaje (Test *t de Student*). *Y. enterocolitica* cultivada a 21°C.

A continuación analizamos la transcripción de *pagP* mediante la fusión transcripcional *pagP::lucFF* en *K. pneumoniae*. Sorprendentemente, y como se puede ver en la **figura 25**, no encontramos diferencias significativas entre la cepa salvaje y el mutante *52Δhfq*.

A

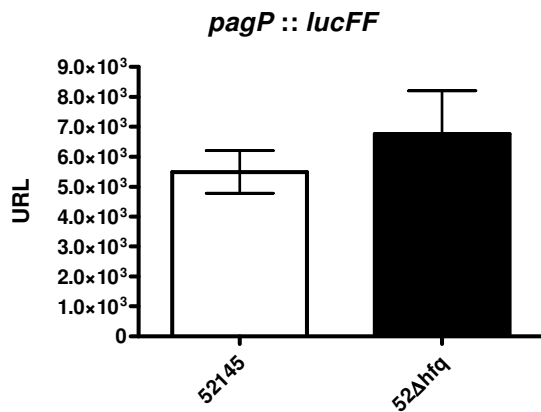


Figura 25: (A) Análisis de la expresión de *pagP* en la cepa salvaje (blanco) y en el mutante *52Δhfq* (negro). Los datos representan la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. (Test *t* de *Student* de dos colas).

Seguidamente, dado que la expresión de *pagP* está controlada por el TCS PhoPQ, analizamos su expresión en las tres enterobacterias en cuestión. Los resultados se muestran en la **figura 26**. Como podemos ver, la expresión de este sistema se encuentra aumentada en el fondo genético de los mutantes *hfq*.

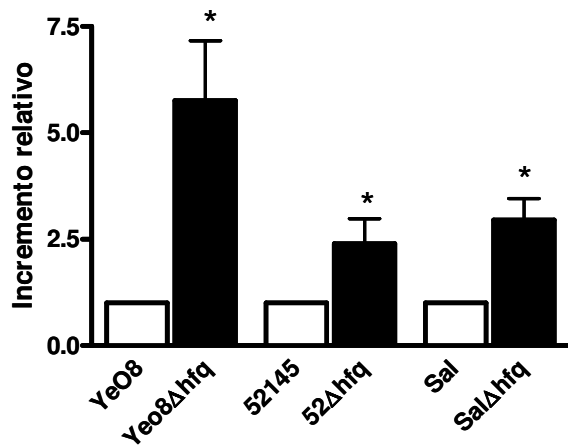


Figura 26: Resultados de qRT-PCR expresados como aumento relativo de la expresión. * indica una diferencia estadísticamente significativa (* $P < 0.05$ test *t* de *Student*). *Y. enterocolitica* cultivada a 21°C.

A continuación analizamos la actividad transcripcional de la fusión *phoP::lucFF* en *K. pneumoniae*. Como vemos en la **figura 27** la expresión de *phoP* se encuentra aumentada en el mutante *52Δhfq* con respecto a la cepa silvestre.

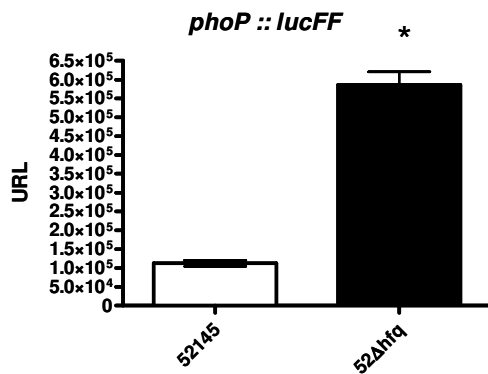


Figura 27: Análisis de la expresión de *phoP* en la cepa salvaje (blanco) y en el mutante 52Δ*hfq* (negro). Los datos representan la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. * indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa salvaje.

En conjunto estos resultados nos indican que Hfq regula de manera negativa la expresión de *phoP*.

Seguidamente, decidimos analizar la expresión de *lpxO* y *pmrH*, que son genes dependientes de PhoPQ responsables de cambios en la estructura del lípido A. Para estudiar la implicación de Hfq en la modulación de la transcripción de *lpxO*, transformamos la fusión transcripcional *lpxO::lucFF* tanto en la cepa silvestre como en el mutante 52Δ*hfq* y medimos la actividad en ambos fondos genéticos. Como se muestra en la **figura 28**, hay un aumento significativo de la expresión de *lpxO* en el fondo genético del mutante *hfq*. Curiosamente, mediante espectrometría de masas, no apreciamos un aumento de especies consistentes con la adición de grupos hidroxilo en el lípido A (m/z 1840, **figura 20B**).

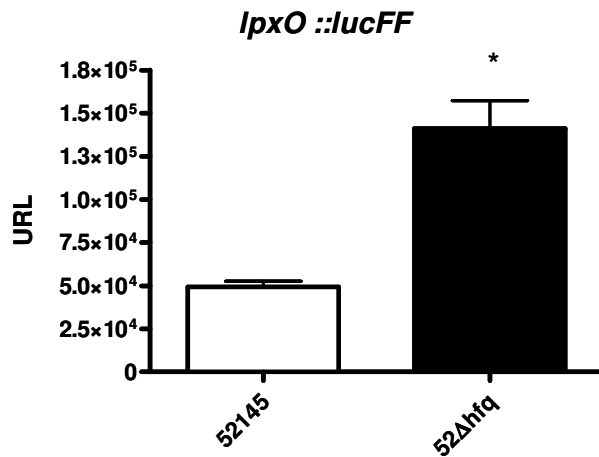


Figura 28: Análisis de la expresión de *lpxO* en la cepa salvaje (blanco) y en el mutante 52Δhfq (negro). Los datos representan la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. * indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa salvaje.

En *K. pneumoniae* se ha demostrado la implicación de PhoPQ en la expresión del operón que controla la adición de aminoarabinosa en el lípido A, por este motivo medimos la actividad de la fusión transcripcional *pmrH::lucFF* en ambos fondos genéticos y comprobamos que, efectivamente había un ligero aumento, aunque significativo, de la expresión de *pmrH* en el mutante 52Δhfq (**figura 29**).

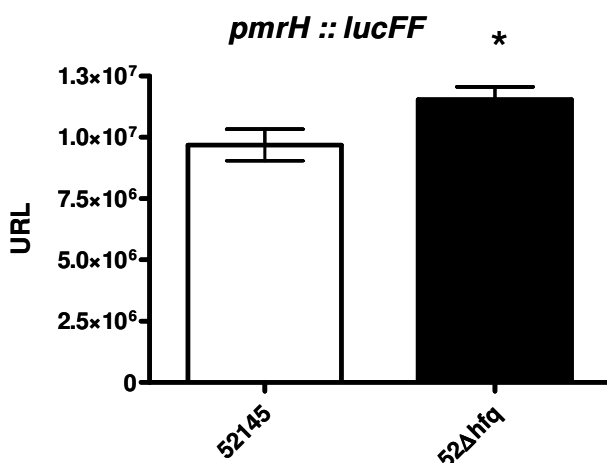


Figura 29: Análisis de la expresión de *pmrH* en la cepa salvaje (blanco) y en el mutante 52Δhfq (negro). Los datos representan la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. * indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa salvaje.

Una vez analizado el efecto de la delección *hfq* sobre el sistema PhoPQ y los genes que éste regula, nos planteamos si Hfq participa en la regulación de la expresión de otros TCS que también están implicados en regulación de las modificaciones del lípido A. Para comenzar transformamos la fusión transcripcional *pmrC::lucFF* en la cepa salvaje y en el mutante *52Δhfq* y medimos la expresión del operón *pmrCAB*, responsable de la adición de pEtN y L-Ara4N al lípido A. En los resultados que se muestran en la **figura 30** no se observan diferencias significativas entre ambas cepas en cuanto a la expresión de *pmrC*.

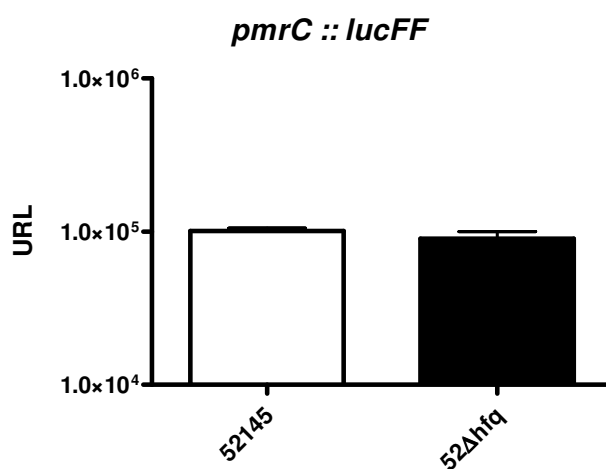


Figura 30: Análisis de la expresión de *pmrC* en la cepa salvaje (blanco) y en el mutante *52Δhfq* (negro). Los datos representan la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. (Test *t* de *Student* de dos colas).

El hecho de no encontrar diferencias significativas entre ambas cepas en cuanto a la expresión de *pmrCAB* nos indica que Hfq no participa en su regulación.

A continuación, examinamos el papel de Hfq en la regulación del sistema RcsCDB, que está implicado en multitud de procesos celulares, entre ellos la regulación de la expresión de cápsula. Para ello transformamos las fusiones transcripcionales *rscC::lucFF* y *yojN::lucFF* en las cepas 52145 y *52Δhfq* y cuantificamos la actividad de dichas fusiones. Comprobamos que en el caso del mutante *hfq*, la expresión de ambos componentes del sistema está aumentada con respecto a la cepa salvaje (**figura 31A** y **31B**), cultivada en las mismas condiciones. Estos resultados indican que Hfq ejerce sobre el sistema RcsCDB una regulación negativa.

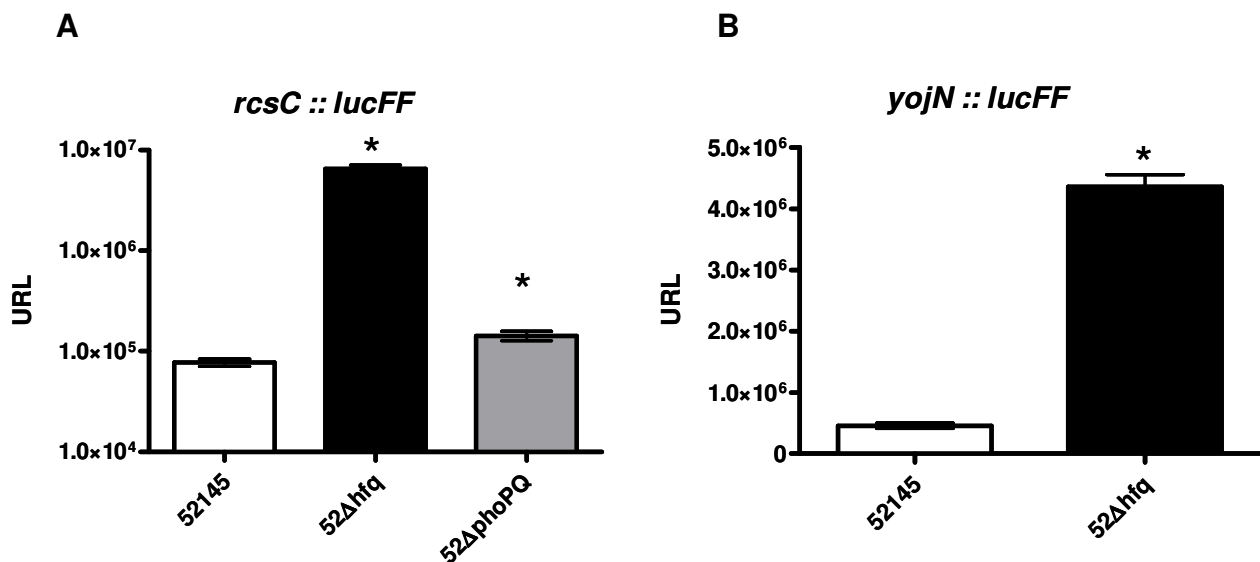


Figura 31: Análisis de la expresión de *rcsC* (A) y de *yojN* (*rcsD*) (B) en la cepa salvaje (blanco), en el mutante 52Δ*hfq* (negro) y en el mutante 52Δ*phoPQ* (gris, sólo para *rcsC*). Los datos representan la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. * indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa salvaje.

En vista de los resultados obtenidos nos planteamos si la sobreexpresión del sistema RcsCBD se traduciría en una sobreexpresión de cápsula. Para ello se midió tanto la cantidad de cápsula como la expresión de la fusión transcripcional del operón de cápsula *cps*::*lucFF*. Como se observa en la **figura 32**, tanto la cantidad de cápsula como la expresión del operón capsular en el mutante *hfq* fueron significativamente inferiores en comparación con la cepa silvestre. Estos datos indican que Hfq actúa como regulador positivo en la expresión de los genes necesarios para la síntesis del CPS.

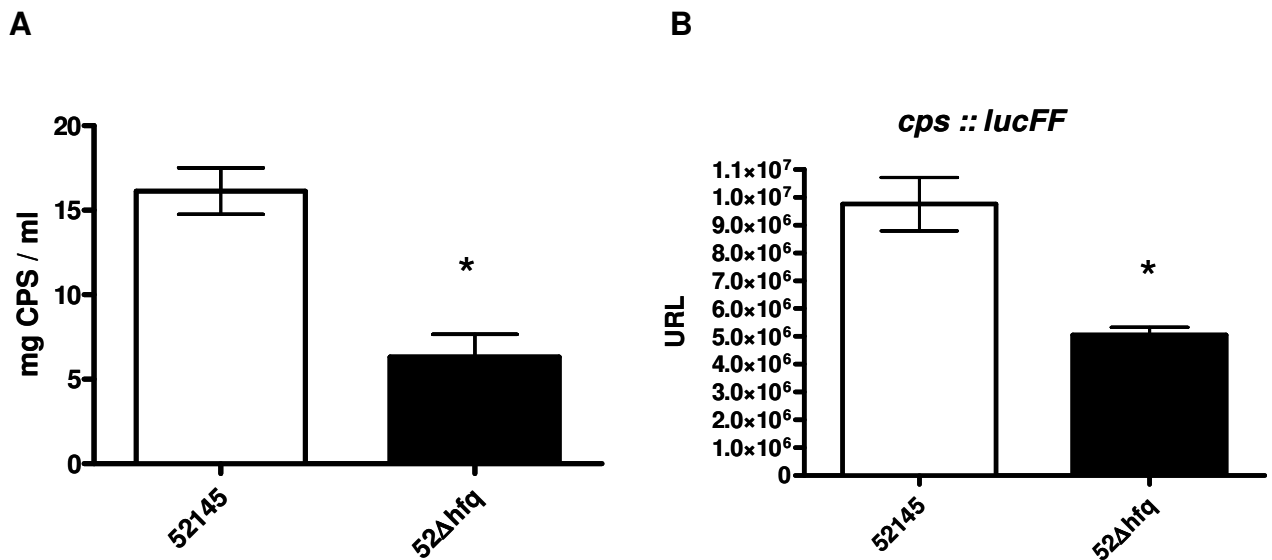


Figura 32: Cuantificación del polisacárido capsular (A) y análisis de la expresión del operón *cps* (B) en la cepa silvestre (blanco) y en el mutante *hfq* (negro). Los datos representan la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. * indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de *Student* de dos colas) con respecto a la cepa salvaje.

3.5 Estudio de la capacidad inmunoestimuladora del lípido A heptaacilado de *K. pneumoniae*

Teniendo en cuenta que el mutante *hfq* presenta, como se ha comentado en la introducción, deficiencias en la virulencia y que además presenta un lípido A con mayor grado de acilación, nos planteamos analizar si la diferencia en el grado de heptaacilación del lípido A tiene algún efecto en la capacidad de inducir respuestas inflamatorias *in vitro*, en macrófagos alveolares de ratón (MH-S).

Para ello estimulamos MH-S con el lípido A purificado a partir de la cepa silvestre o del mutante *hfq*, y analizamos tanto la activación de la vía de señalización de NF-κB (analizando la degradación de IκBα) como la activación por fosforilación de las MAP quinasas p38, p44/42 y JNK (**figura 33**).

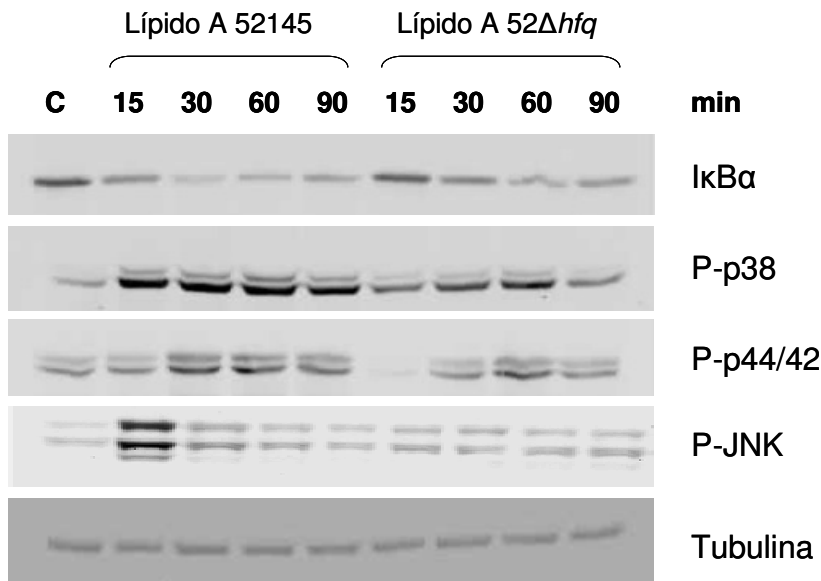


Figura 33: Estudio temporal de la degradación de IκBα y de la activación de MAP quinasas implicadas en la respuesta inflamatoria, en MH-S estimulados con el lípido A de la cepa salvaje o del mutante 52Δhfq ambos cultivados en LB. Los Inmunoblots son representativos de al menos tres experimentos independientes.

La estructura del lípido A presente en la cepa silvestre induce la activación de NF-κB en macrófagos MHS. Para que esto ocurra, la proteína IκBα tiene que degradarse para que la subunidad p65 pueda translocarse al núcleo e induzca la transcripción de genes inflamatorios. Esta degradación de IκBα en los MH-S estimulados con el lípido A de la cepa silvestre es evidente ya a los 15 minutos post-estimulación; con un máximo a los 30 minutos y aún se mantiene a los 90 minutos post-estimulación. En cambio, en los MH-S estimulados con el lípido A del mutante 52Δhfq la activación de NF-κB es más leve. La degradación de IκBα se ve retrasada en el tiempo desde la estimulación con el lípido A y no es tan pronunciada como en el caso del lípido A de la cepa silvestre. En ambos casos la degradación de IκBα sigue siendo evidente tras 90 minutos de contacto con el lípido A, aunque la degradación es menor en los MH-S estimulados con el lípido A del mutante 52Δhfq.

En el caso de las distintas MAP quinasas, el lípido A de la cepa 52145 también induce una activación de estas distintas vías, mientras que el lípido A obtenido a partir del mutante 52Δhfq no las induce o lo hace de una forma más leve. En el caso de la proteína p38, el lípido A de la cepa 52145 induce su activación ya

a los 15 minutos de estimulación y aun sigue activada 90 minutos después. Por otro lado, el lípido A de la cepa *52Δhfq* aunque también induce la activación de p38, ésta es mucho menor y tras 90 minutos de contacto vuelve a niveles iniciales.

Observamos una dinámica similar al estudiar la activación de la MAP quinasa p44/42. Mientras que el lípido A de la cepa salvaje es capaz de inducir su activación a partir de los 30 minutos y aún se mantiene 90 minutos después, el lípido A de la cepa *52Δhfq* induce una activación más tardía, de menor proporción y menos duradera en el tiempo. Incluso parece observarse cierta inhibición de la fosforilación de p44/42 a los 15 minutos de estimulación con el lípido A de la cepa *52Δhfq* y pasados 90 minutos los niveles de p44/42 fosforilada son similares a los de las muestras control.

Por último, en relación a la vía de señalización de JNK, se observa un pico de activación (fosforilación) en MH-S tras ser estimulados con el lípido A de la cepa 52145 y estos valores vuelven al nivel de las muestras control tras 60-90 minutos de la estimulación. Mientras que en el caso de la cepa *52Δhfq* esta activación es prácticamente inexistente.

4. Caracterización del Lípido A de *K. pneumoniae* in vivo

Con el fin de analizar la estructura de lípido A que expresa *K. pneumoniae* durante una infección sin tener que pasar por un paso de enriquecimiento *in vitro*, inoculamos ratones por vía intranasal con la cepa silvestre 52145. A las 24 horas post infección, sacrificamos los ratones y recogimos el lavado broncoalveolar (BAL, *bronchoalveolar lavage*) y el pulmón. La cantidad de bacterias recuperadas de ambas muestras resultó ser similar (del orden de 10^7). La extracción de lípido A se realizó tanto a partir de muestras frescas como de muestras liofilizadas de pulmón y de BAL. De manera paralela, se testaron dos métodos: hidrólisis con hidróxido de amonio y ácido isobutírico o extracción con TRIzol[®] seguida de hidrólisis en condiciones ligeramente ácidas (véase apartado 2.8); para optimizar la extracción del lípido A. El análisis del lípido A mediante MALDI-TOF reveló la misma estructura tanto a partir del BAL como a partir del homogenizado de pulmón, independientemente del método de extracción empleado y de si la muestra empleada era fresca o liofilizada.

En la **figura 34A** se muestran los espectros del lípido A que presenta *K. pneumoniae* directamente recuperado a partir del BAL, sin necesidad de pasar la muestra por un medio de cultivo, como después de su aislamiento en medio LB sólido (**figura 34B**). En el espectro del lípido A obtenido directamente a partir del BAL podemos observar que las especies más abundantes son las de m/z 1840 y m/z 1866 (**figura 34A**).

Por otro lado, la estructura que presenta *K. pneumoniae* después de su aislamiento en placa es distinta a la encontrada directamente del BAL (**figura 34B**). En este caso, los picos mayoritarios son los de m/z 1824 y m/z 1840 (representado en la **figura 34D**) y con menor intensidad, aunque presente, el pico de m/z 1866.

El tercer espectro representado en la **figura 34C**, corresponde a la estructura que presenta *K. pneumoniae* tras otro pase adicional en una placa de LB. En este caso, este espectro presenta una estructura de m/z 1824 como la más abundante y es idéntica a la que tradicionalmente se ha descrito en *K. pneumoniae* cuando se cultiva *in vitro* en condiciones de laboratorio.

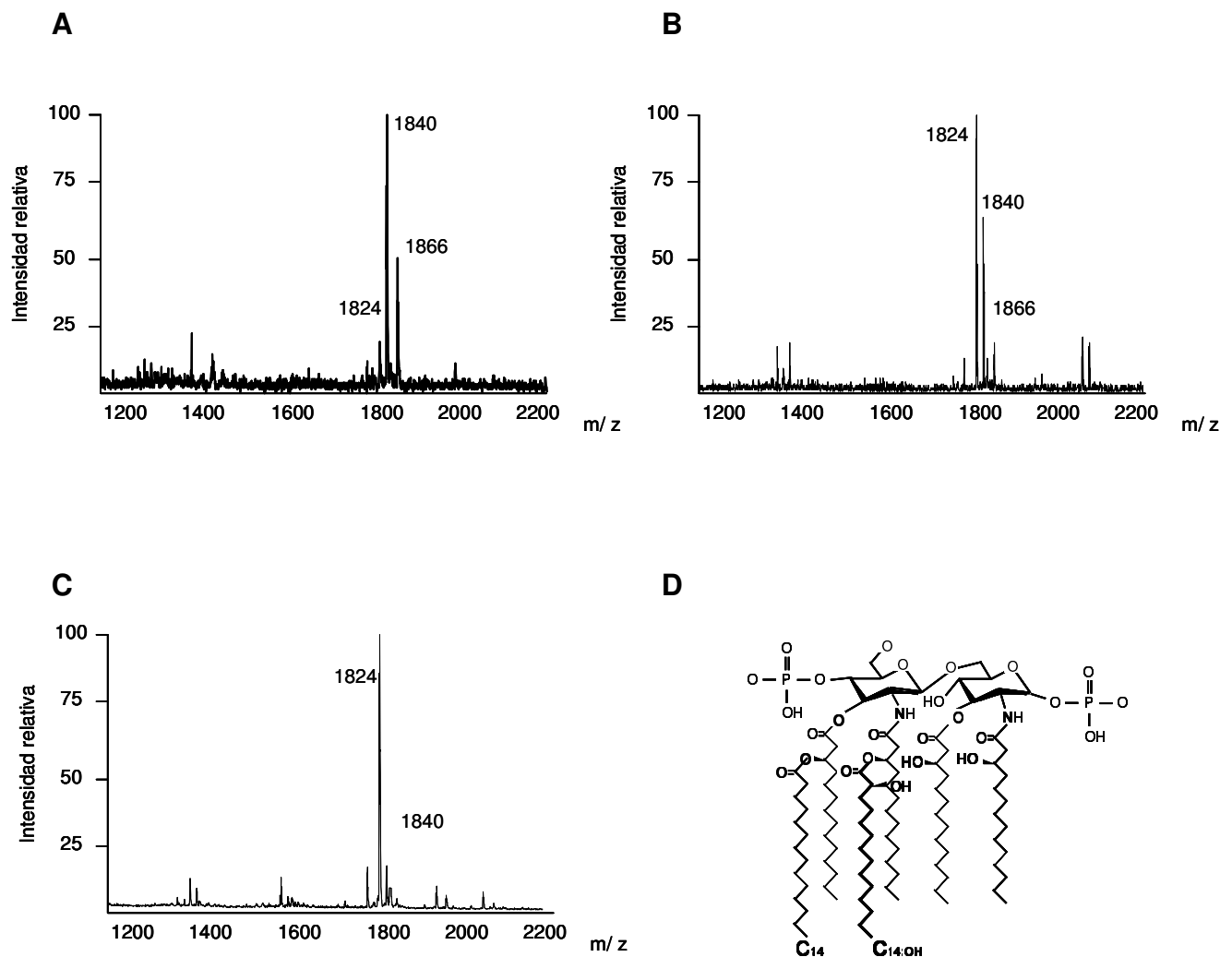


Figura 34: Espectros del lípido A de *K. pneumoniae* obtenidos de (A) BAL, (B) bacterias aisladas de pulmón en LB agar (C) tras un pase adicional en LB agar. (D) Estructura de lípido A propuesta para la especie de m/z 1840. Los resultados son representativos de, al menos, 3 extracciones independientes.

Siguiendo como modelo el lípido A descrito tradicionalmente para *Klebsiella* spp, pudimos identificar los distintos picos encontrados en los espectros que se representan en la **figura 34**. El pico de m/z 1824 (**figura 34C**) corresponde a una estructura de lípido A hexaacilado formado por dos glucosaminas, dos fosfatos, cuatro 3-OH-C₁₄ como ácidos grasos principales y dos cadenas de miristato (C_{14:0}) como acilaciones secundarias de estos ácidos grasos. La estructura mayoritaria en las **figuras 34A y 34D** (m/z 1840), se corresponde con un lípido A hexaacilado similar al descrito anteriormente pero con la sustitución de la cadena de miristato en posición 2' por una de 2-hidroximiristato.

El pico de m/z 1866, también corresponde a una estructura hexaacilada (**figura 34A**) con presencia de 2-hidroximiristato, pero que está desprovista del ácido graso secundario en posición 3' (C_{14:0}) y posee una molécula de palmitato (C_{16:0}, m/z 239) unida, mediante enlace éster, a la cadena de hidroximiristato en posición 2' ⁷³.

Resumiendo, al analizar el lípido A que presenta *K. pneumoniae in vivo* durante el transcurso de una infección pulmonar en ratón, comprobamos que su estructura difiere de la que habitualmente presenta cuando crece en condiciones normales de laboratorio. Concretamente, expresa un lípido A hexaacilado en el que el ácido graso secundario en posición 2' se encuentra hidroxilada. Además, esta estructura es dinámica y revierte a la forma “típica” cuando la bacteria crece en condiciones óptimas de cultivo y lejos del ataque del sistema inmune del huésped.

4.1 Caracterización de *lpxO*

La 2-hidroxilación del lípido A ha sido descrita en otras bacterias como *S. Typhimurium* ¹⁰⁹, *B. bronchiseptica* ¹¹⁰ o *P. aeruginosa* ²⁹¹. Como se ha comentado en la introducción, la enzima responsable de la 2-hidroxilación de los ácidos grasos del lípido A es *LpxO*. Para determinar si *LpxO* es la responsable del patrón que observamos durante una infección pulmonar, construimos un mutante *lpxO* en la cepa 52145, de ahora en adelante *52ΔlpxO*, y analizamos su lípido A tanto *in vitro* como *in vivo*, así como su capacidad de producir neumonía.

En primer lugar analizamos el lípido A de la cepa *52ΔlpxO* cultivada en LB (**figura 35A**). Esta cepa presenta una estructura en la que el pico mayoritario (m/z 1824) corresponde a una especie de lípido A hexaacilada, característica de *K. pneumoniae*. La forma 2-hidroxilada, presente cuando la cepa silvestre crece en LB, se recuperará al complementar el mutante *52ΔlpxO* con el plásmido pTM/*lpxO* (**figura 35B**).

A continuación, analizamos la estructura del lípido A que presenta el mutante *52ΔlpxO* durante una infección pulmonar en ratón. En este caso, sí encontramos diferencias entre la cepa silvestre y el mutante. En el lípido A del mutante *52ΔlpxO* predominan los picos de m/z 1824 y m/z 1850 (**figura 35C**). Esta estructura es similar a la que presenta la cepa silvestre de *K. pneumoniae*

durante una infección pulmonar salvo que carece de las formas 2-hidroxiladas que dan lugar a los picos m/z 1840 y m/z 1866 descritos en el apartado anterior. Concretamente, el pico de m/z 1850 se corresponde con la adición de palmitato a una molécula de lípido A que carece de la acilación secundaria en posición 3' y que presenta un grupo miristato ($C_{14:0}$) en posición 2' (**figura 35D**).

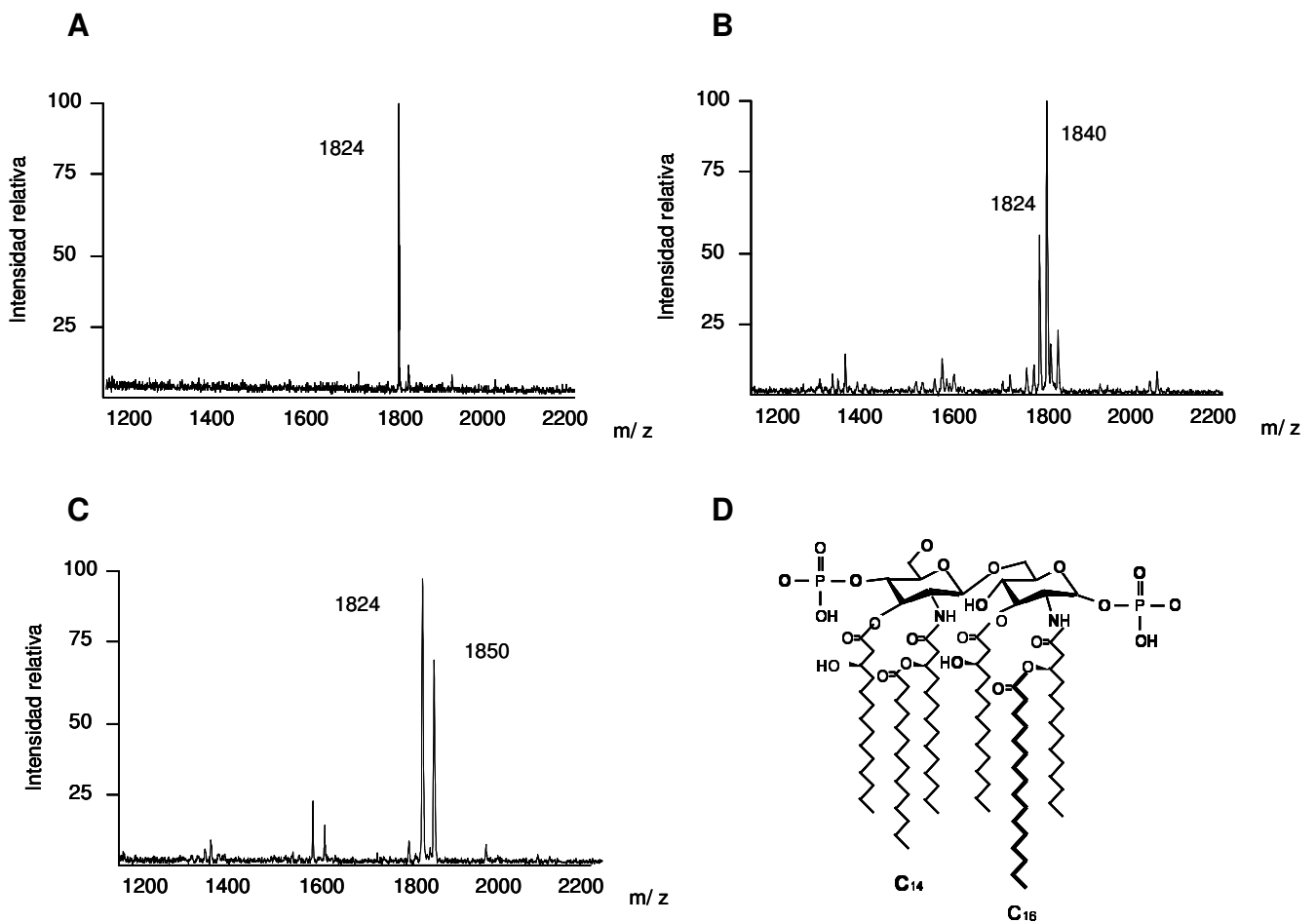


Figura 35: Lípido A de la cepa $52\Delta/pxO$ cultivada en LB (A), del mutante $52\Delta/pxO$ complementado cultivado en LB (B) y durante una infección en pulmón, obtenido a partir del BAL (C). Estructura propuesta de la especie de lípido A de m/z 1850 (D). Los resultados son representativos de, al menos, 3 extracciones independientes.

4.1.1 Papel de *lpxO* en la virulencia de *K. pneumoniae*

Como encontramos diferencias en el lípido A expresado durante una infección pulmonar entre la cepa salvaje y el mutante $52\Delta/pxO$, decidimos analizar si la delección de *lpxO* tenía efectos en la virulencia. Para ello inoculamos las cepas 52145 y $52\Delta/pxO$ en ratones por vía intranasal. A continuación determinamos la

carga bacteriana en traquea, pulmón y bazo a las 24 y a las 72 horas post-infección (**figura 36**) y la respuesta inflamatoria del huésped midiendo la expresión de *tnfa* y de la quimioquina *kc* (**figura 37**).

La carga bacteriana del mutante $52\Delta/pxO$ fue menor en pulmón, con respecto a la cepa silvestre tanto a 24 horas como a 72 horas post inoculación. En cambio, en bazo no observamos diferencias significativas entre las cepas en ninguno de los tiempos analizados.

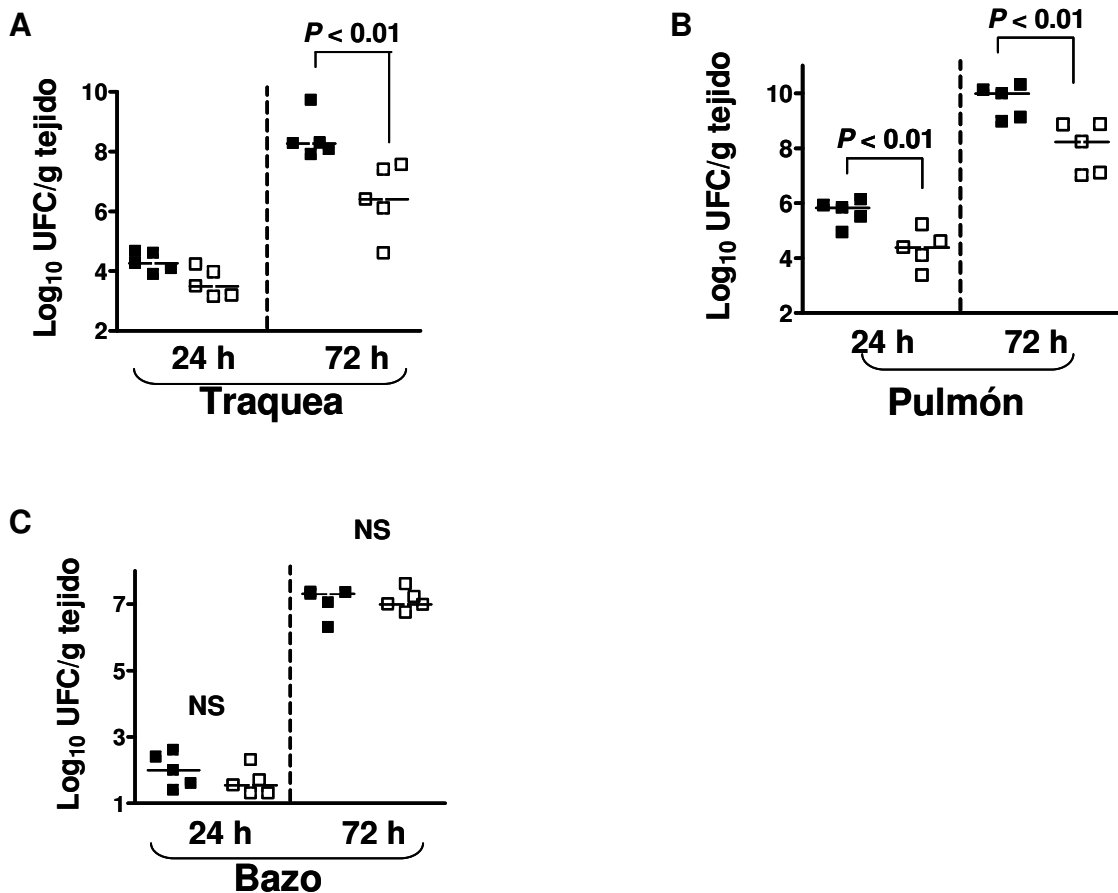


Figura 36: Virulencia del mutante $52\Delta/pxO$. Carga bacteriana, a 24 y 72 horas post infección, en traquea (A), pulmón (B) y bazo (C). Los resultados se expresan en logaritmo de ufc por gramo de tejido (52145 ■ , $52\Delta/pxO$ □). Test *t* de Student de dos colas. NS No significativo.

Mediante qRT-PCR, medimos los niveles de *tnfa* y de la quimioquina *kc* en pulmón a las 12 y 24 horas post-infección. El nivel de *tnfa* fue superior en los pulmones de los ratones infectados con la cepa $52\Delta/pxO$ que en los infectados con la cepa silvestre (**figura 37A**), en los dos tiempos analizados. Por otro lado,

los niveles de *kc* fueron significativamente más altos en los pulmones de los ratones infectados con la cepa $52\Delta/p\alpha O$ tras 24 horas (**figura 37B**).

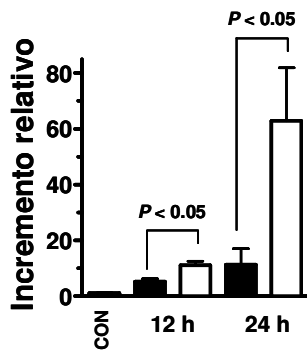
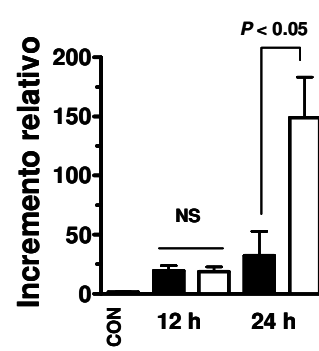
A**B**

Figura 37: Niveles de expresión de *tnfa* (A) y de *kc* (B) en pulmones de ratones infectados con *K. pneumoniae* (52145 ■, 52Δ/pxO □), o no infectados (CON) a 12 y 24 horas post infección. Test *t* de Student de dos colas. NS No significativo.

Cabe añadir además, que el lípido A que *K. pneumoniae* expresa en el bazo carece de la especie de lípido A de m/z 1866 y que las formas mayoritarias que encontramos son las de m/z 1797, m/z 1824 y m/z 1840 (**Figura 38**).

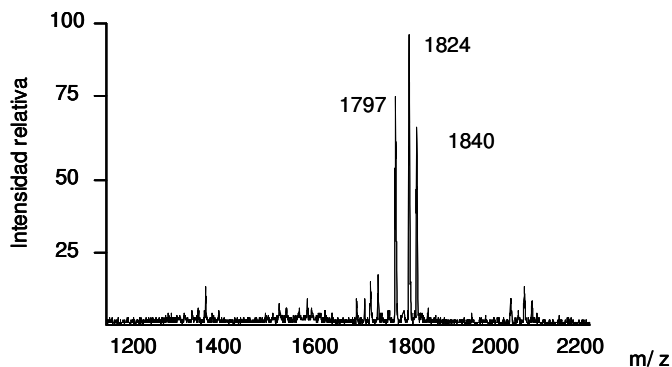


Figura 38: Lípido A de la cepa salvaje 52145 *in vivo* en el bazo a 24 horas post infección. Los resultados son representativos de, al menos, 3 extracciones independientes.

En conjunto, estos resultados nos indican que el lípido A que *K. pneumoniae* expresa en el pulmón está modificado por la enzima LpxO. La modificación que LpxO lleva a cabo es importante para la supervivencia de la bacteria en el pulmón, ya que la carga bacteriana es menor en el tracto respiratorio de los ratones infectados con la cepa 52Δ/pxO en ambos tiempos analizados. Además, el mutante 52Δ/pxO induce una mayor respuesta inflamatoria que la cepa silvestre.

4.2 Medios de cultivo *in vitro* para reproducir la estructura expresada por *K. pneumoniae* en el pulmón

Como se ha descrito en la introducción, las bacterias Gram negativas tienen la capacidad de variar su lípido A como respuesta a los estímulos que detectan en el ambiente. Por ello, probamos una serie de medios de cultivo para encontrar aquél en el que *K. pneumoniae* expresara *in vitro* un lípido A con un patrón igual al que expresa *in vivo* en el pulmón. Se probaron medios de cultivo en los que se queló el hierro, medios mínimos con diferentes fuentes de carbono, nitrógeno, rangos de pH y concentraciones de magnesio. En la **tabla 4** se detallan los medios de cultivo probados, los iones observados y la estructura de lípido A propuesta.

Como se observa en la **figura 39A** y en la **tabla 4**, *K. pneumoniae* cultivada a 37°C en caldo M9 ajustado a un pH 4,5 (de ahora en adelante **VMM**) presenta la misma estructura de lípido A que durante una infección pulmonar en ratón (**figura 39B**), cuyas masas principales son m/z 1840 y m/z 1866 (**figuras 39 C** y **D**, respectivamente).

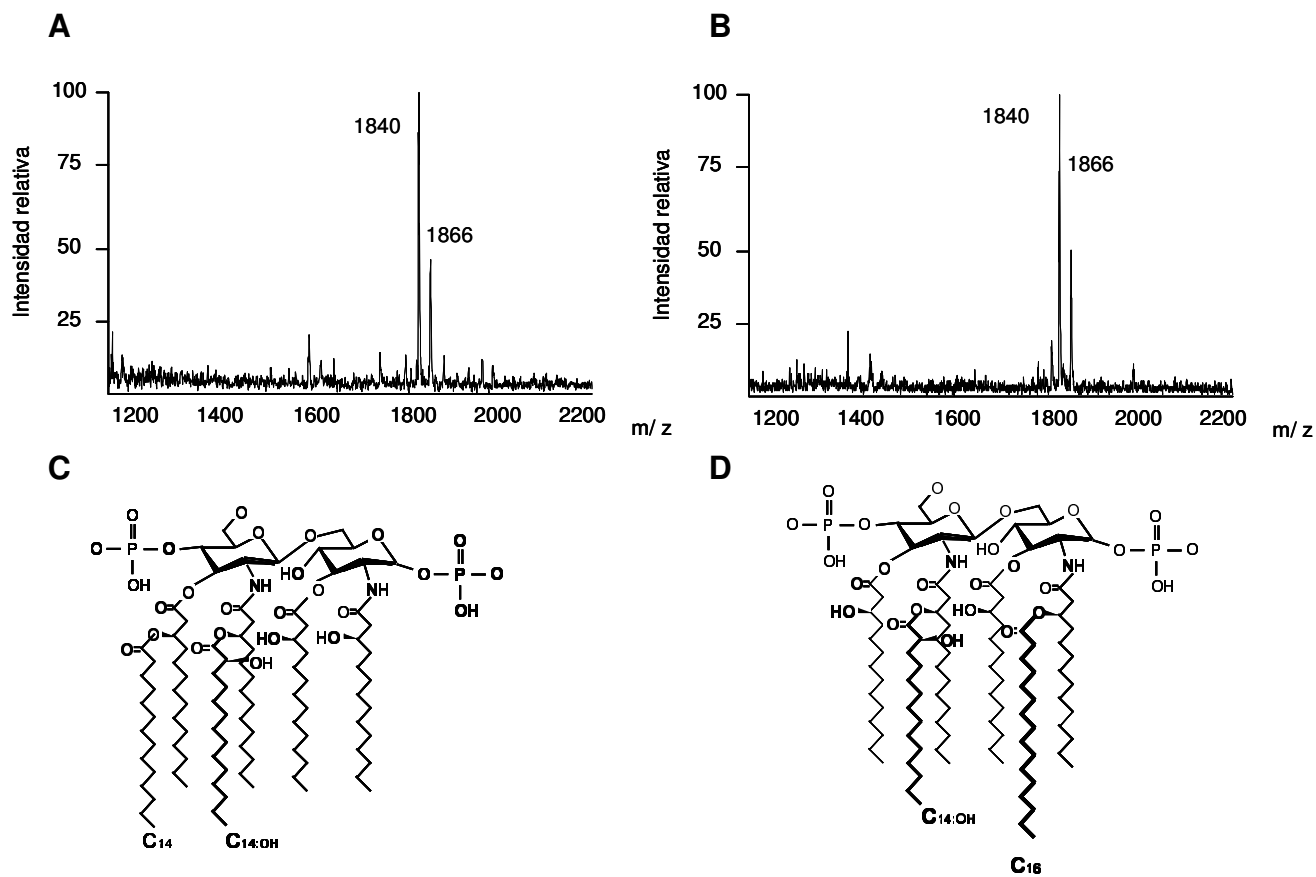


Figura 39: Estructura del lípido A de la cepa silvestre cultivada en medio VMM (A) y durante una infección en el pulmón obtenido a partir del BAL (B). Estructura del lípido A propuesta para la especie de m/z 1840 (C) y m/z 1866 (D). Los resultados son representativos de 3 extracciones independientes.

Tabla 4: Resumen de los medios utilizados, las especies de lípido A presentes y su composición. En negrita se resaltan los picos más abundantes.

Medio de cultivo	Iones observados(m/z)	Grado de acilación	Estructura propuesta
LB +2,2'-Dypiridil	1404	Tetraacilado	4x C14:0(3-OH), 2P
	1824	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 2x C14:0, 2P
	1850	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C16:0, 2P
	1955	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 2x C14:0, 1x Ara4N, 2P
	2063	Heptaacilado	4x C14:0(3-OH), 2x C14:0, 1x C16:0, 2P
^a N minimal medium pH 7.5 (10 mM MgSO ₄)	1360	Tetraacilado	3x C14:0(3-OH), 1x C12:0, 2P
	1797	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C12:0, 2P
	2036	Heptaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C12:0, 1x C16:0, 2P
^a N minimal medium pH 7.5 (5 mM MgSO ₄)	1360	Tetraacilado	3x C14:0(3-OH), 1x C12:0, 2P
	1797	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C12:0, 2P
	2036	Heptaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C12:0, 1x C16:0, 2P
^a N minimal medium pH 7.5 (10 μM MgSO ₄)	1797	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C12:0, 2P
	1824	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 2x C14:0, 2P
	1928	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C12:0, 1x Ara4N, 2P
	2036	Heptaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C12:0, 1x C16:0, 2P
	2063	Heptaacilado	4x C14:0(3-OH), 2x C14:0, 1x C16:0, 2P
RPMI	1824	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 2x C14:0, 2P
RPMI+SBF	1388	Tetraacilado	3x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 2P
	1797	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C12:0, 2P
	1824	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 2x C14:0, 2P
^b M9 Hepes pH 7	1797	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C12:0, 2P
	1824	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 2x C14:0, 2P
	1850	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C16:0, 2P
^b M9 Hepes pH 6.5	1824	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 2x C14:0, 2P
	1840	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C14:0(2-OH), 2P
	1850	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C16:0, 2P
	1866	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0(2-OH), 1x C16:0, 2P
	1797	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C12:0, 2P
^b M9 Hepes pH 6	1824	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 2x C14:0, 2P
	1850	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C16:0, 2P

^b M9 MES pH5.5	1797	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C12:0, 2P
	1824	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 2x C14:0, 2P
	1840	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C14:0(2-OH), 2P
	1850	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C16:0, 2P
^b M9 MES pH 5	1824	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 2x C14:0, 2P
	1840	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C14:0(2-OH), 2P
	1850	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C16:0, 2P
	1866	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0(2-OH), 1x C16:0, 2P
^b M9 MES pH 4.5 §	1840	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C14:0(2-OH), 2P
	1866	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0(2-OH), 1x C16:0, 2P
^b M9 MES pH 4	1840	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C14:0(2-OH), 2P
	1866	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0(2-OH), 1x C16:0, 2P
^b M9 MES pH 3.5	1797	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C12:0, 2P
	1824	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 2x C14:0, 2P
^b M9 MES pH 3	1797	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 1x C14:0, 1x C12:0, 2P
	1824	Hexaacilado	4x C14:0(3-OH), 2x C14:0, 2P

a La fuente de carbono es glicerol

b La fuente de carbono es glucosa

§ de hora en adelante VMM

4.3 Regulación de la expresión de *lpxO*

Como se ha comentado en la introducción, los sistemas de transducción de señales PhoPQ, PmrAB y RcsFCDB controlan la expresión de los genes necesarios para la remodelación del lípido A. Para determinar si alguno de estos sistemas regula la expresión de *lpxO*, transformamos la fusión transcripcional *lpxO::lucFF* en la cepa 52145 y en los mutantes *52ΔphoPQ*, *52ΔpmrAB* y *52ΔrcsB*. Con las cepas reporteras obtenidas, medimos la actividad luciferasa *in vitro* e *in vivo*.

In vitro, la expresión de *lpxO* no varió en el mutante *pmrAB* con respecto a la cepa silvestre, mientras que fue menor en el fondo genético del mutante *phoPQ* y claramente superior en el caso del mutante *rcsB* (**figura 40A**).

Para comprobar cual de estos sistemas regula la expresión de *lpxO in vivo*, inoculamos, por vía intranasal, estas cepas reporteras en ratones y medimos la actividad luciferasa de la fusión *lpxO::lucFF* en pulmones homogenizados, a 24 horas post inoculación (**figura 40B**). De la misma manera que ocurre *in vitro* en LB, la expresión de *lpxO* no varió en el mutante *pmrAB*, fue menor en el mutante *phoPQ* y superior en el mutante *rcsB* con respecto a la cepa silvestre. En conjunto, estos datos sugieren que la regulación de *lpxO* depende, en parte, del sistema de dos componentes PhoPQ. Además, en ambas condiciones *lpxO* se encuentra sobreexpresado en el fondo genético del mutante *rcsB*.

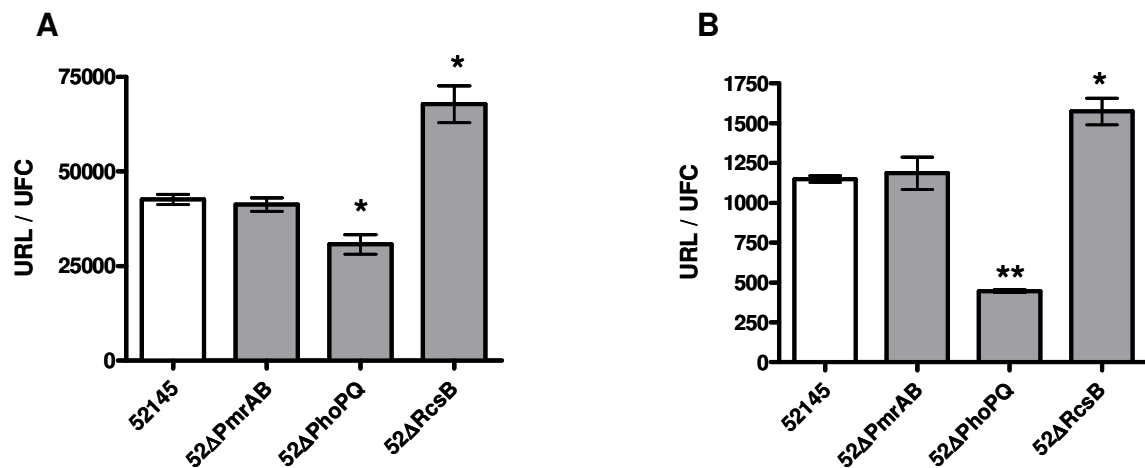


Figura 40: Análisis de la expresión de *lpxO* en la cepa salvaje y en los mutantes *52ΔpmrAB*, *52ΔphoPQ* y *52ΔrcsB* *in vitro* cultivadas en LB (A) e *in vivo* a partir de homogenizados de pulmón (B). Los datos en A representan la media y la desviación estándar de 5 experimentos independientes. Los datos en B representan la media y la desviación estándar de 5 muestras independientes. * indica una diferencia estadísticamente significativa (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa salvaje.

A continuación analizamos el lípido A que presentan los mutantes *52ΔphoPQ*, *52ΔpmrAB* y *52ΔrcsB* *in vivo* durante una infección pulmonar en ratón (**figura 41**), confirmando los resultados obtenidos al analizar la regulación de *lpxO*. Hay que destacar que, como se observa en la **figura 41A**, el mutante *52ΔphoPQ* carece de las especies de lípido A modificadas con palmitato, es decir m/z 1866, ni posee especies heptaaciladas.

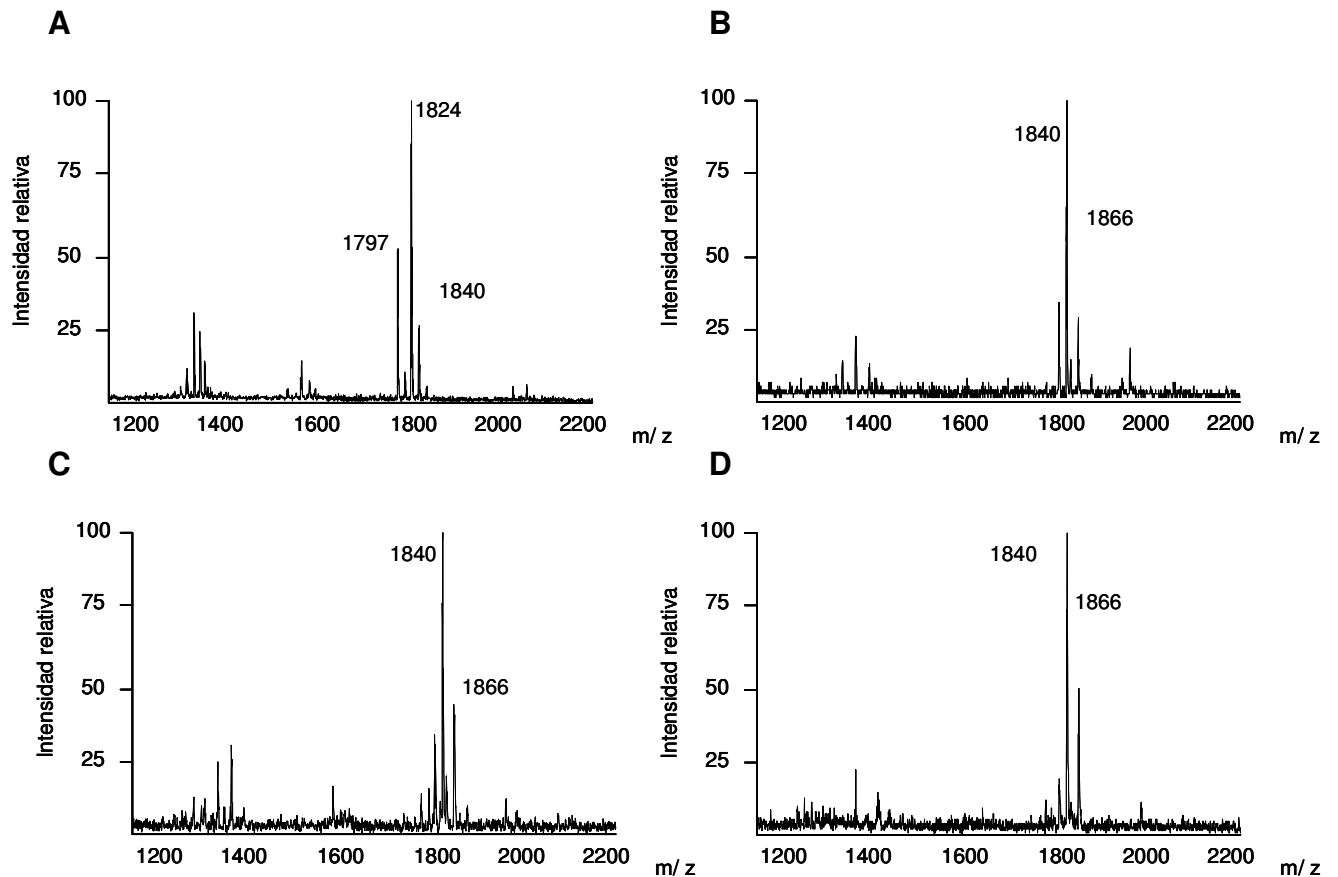


Figura 41: Lípido A de los mutantes $52\Delta phoPQ$ (A) $52\Delta pmrAB$ (B), $rcsB$ (C) y de la cepa silvestre (D) obtenidos a partir de BAL. Los resultados son representativos de, al menos, tres extracciones independientes.

Adicionalmente, medimos la expresión de la fusión transcripcional $lpxO::lucFF$ al cultivar la cepa silvestre y el mutante $52\Delta phoPQ$ en medio VMM. En la **figura 42** se observa que la expresión de $lpxO$ se ve aumentada cuando la bacteria crece en VMM. En el fondo genético del mutante $52\Delta phoPQ$, se observa un ligero, aunque significativo, aumento de la expresión de $lpxO$ cuando éste crece en VMM. Por otro lado, no se observan diferencias significativas en la expresión de $lpxO$ entre la cepa silvestre y el mutante $52\Delta phoPQ$ cuando ambas son cultivadas en LB. Finalmente, cuando tanto la cepa salvaje como el mutante $52\Delta phoPQ$ crecen en medio VMM, observamos que la expresión de $lpxO$ es significativamente menor en el fondo genético del mutante $52\Delta phoPQ$.

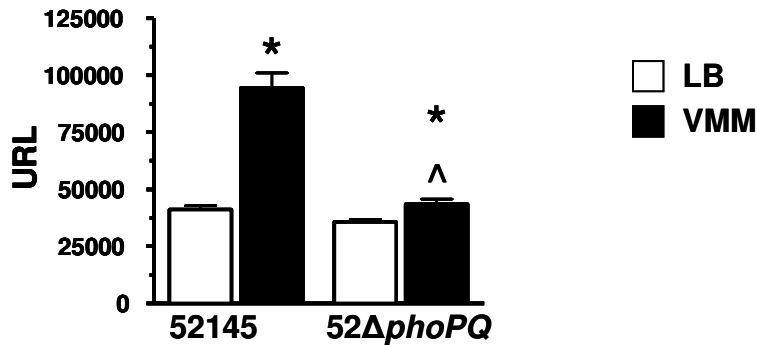


Figura 42: Análisis de la expresión de *lpxO* en medio LB y en medio VMM. Los datos representan la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. * indica una diferencia estadísticamente significativa (* $P < 0.05$, test *t* de *Student* de dos colas) con respecto al cultivo en LB. ^ indica una diferencia significativa (^ $P < 0.05$, test *t* de *Student* de dos colas) con respecto a la cepa salvaje cultivada en LB.

A continuación, medimos la expresión de la fusión transcripcional *phoP::lucFF* en la cepa silvestre y en el mutante *52ΔphoPQ* en medio LB y VMM (**figura 43**). La expresión de *phoP* aumenta en medio VMM, en ambos fondos genéticos. La expresión de *phoP* fue significativamente mayor en la cepa silvestre, con respecto al mutante *52ΔphoPQ* cuando ambas crecen en medio VMM, mientras que no encontramos diferencias cuando ambas crecen en LB.

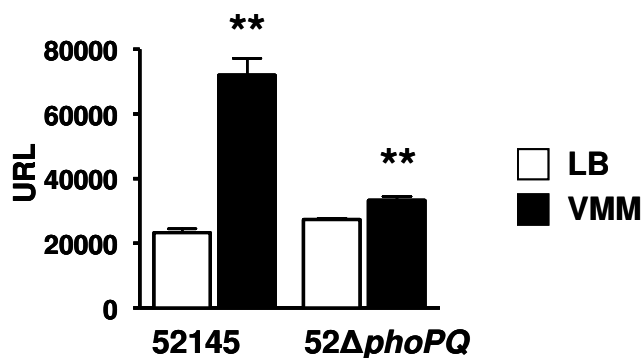


Figura 43: Análisis de la expresión de *phoP* en medio LB y en medio VMM. Los datos representan la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. ** indica una diferencia estadísticamente significativa (** $P < 0.01$, test *t* de *Student* de dos colas) con respecto al cultivo en LB.

En conjunto, estos resultados indican que el aumento de *lpxO* en el pulmón es, en gran parte, dependiente del sistema de dos componentes PhoPQ.

4.4 Papel del 2-hidroximiristato en la modulación de la respuesta inmune

Para determinar si la estructura de lípido A que *K. pneumoniae* expresa durante una infección, en el pulmón de ratón, juega algún papel en la modulación de la respuesta inmune, analizamos su capacidad para inducir respuestas inflamatorias en macrófagos alveolares de ratón (MH-S). Para ello, realizamos extracciones de lípido A de los mutantes isogénicos descapsulados de la cepa salvaje y del mutante $52\Delta/pxO$ a partir de cultivos, en LB o en VMM, utilizando una concentración final de lípido A de 100 ng/ml para estimular los MH-S y recogiendo los extractos celulares a distintos tiempos post-desafío.

Utilizamos los mutantes descapsulados de estas dos cepas para evitar interferencias debidas a la capsula en el proceso de extracción y posterior estimulación de las células MH-S. En la **figura 44** se muestra la estructura del lípido A del mutante descapsulado de la cepa silvestre obtenido en los distintos medios. La estructura del mutante descapsulado de la cepa silvestre presenta la misma estructura de lípido A que la cepa silvestre en cada uno de los medios. Tampoco hubo diferencias entre el lípido A de la cepa $52\Delta/pxO$ y de su mutante descapsulado.

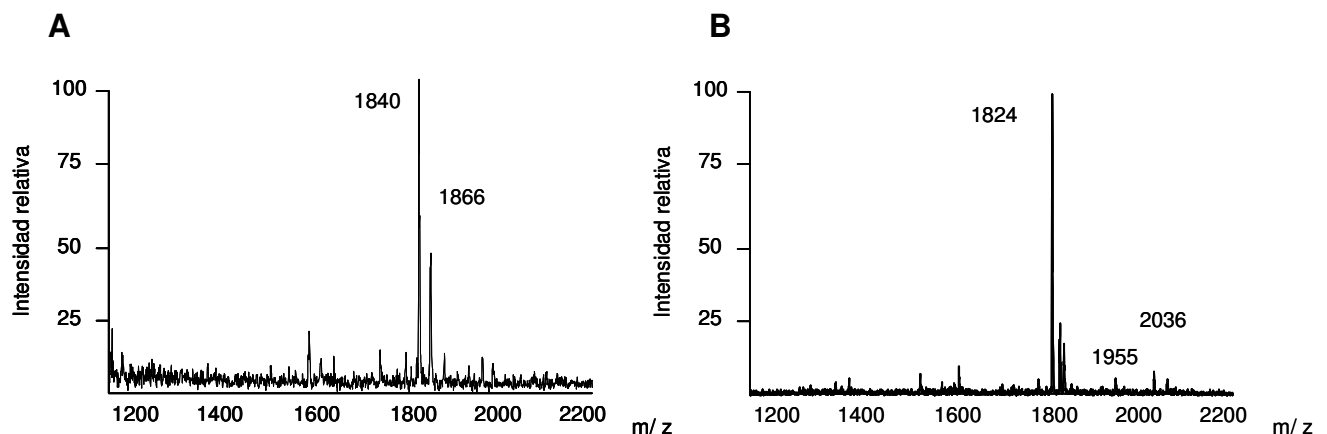


Figura 44: Estructura del lípido A del mutante descapsulado $52\Delta/wca_{k2}$ cultivado en VMM (A) y en LB (B). Los resultados son representativos de 3 extracciones independientes.

4.4.1 Activación de la vía de NFκB

En la **figura 45** observamos como IκBα se encuentra degradado casi en su totalidad en las células estimuladas con los lípidos WT*LB y Δ*pxO**VMM. En cambio, en los macrófagos estimulados con el lípido WT*VMM la degradación de IκBα es menos aparente.

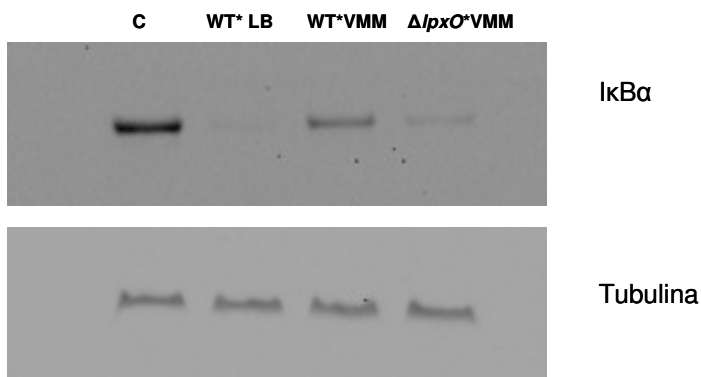


Figura 45: Degradación de IκBα en MH-S tras 15 minutos de estimulación con los diferentes lípidos A.

A continuación, analizamos esta degradación a lo largo del tiempo estimulando los MH-S durante 90 minutos y recogiendo muestra a los 15, 30, 60 y 90 minutos de contacto con los lípidos A de la cepa silvestre cultivada en los distintos medios (**figura 46**).

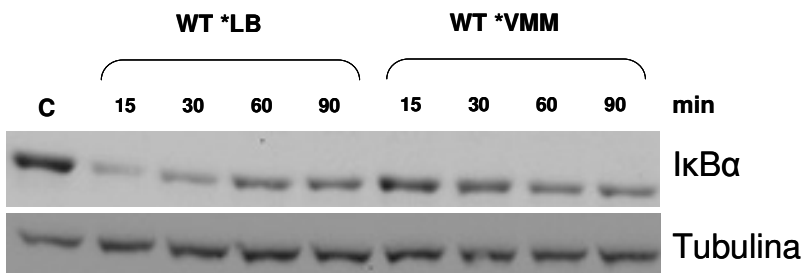


Figura 46: Degradación de IκBα en MH-S tras 15, 30, 60 y 90 minutos de estimulación con los lípidos WT*LB y WT*VMM.

Como observamos en la **figura 46**, en los macrófagos estimulados con el lípido A WT*VMM, la degradación de IκBα empieza a ser evidente a los 30 minutos post desafío, en cambio en los MH-S estimulados con el lípido A WT*LB esta degradación se observa ya a los 15 minutos de estimulación. En ambos casos

parece que los niveles de I κ B α se estabilizan tras 1 hora de contacto con ambos lípidos A.

A la degradación de I κ B α le sigue la translocación de la subunidad p65 al núcleo. Todos los lípidos A obtenidos inducen la translocación de p65 al núcleo, sin embargo, como vemos en la **figura 47A y B**, el porcentaje de translocación es menor en aquellas células estimuladas con el lípido A WT*VMM. Por otro lado, no observamos diferencias de translocalación de p65 en los MH-S estimulados con los lípidos A WT*LB y Δ lpxO*VMM.

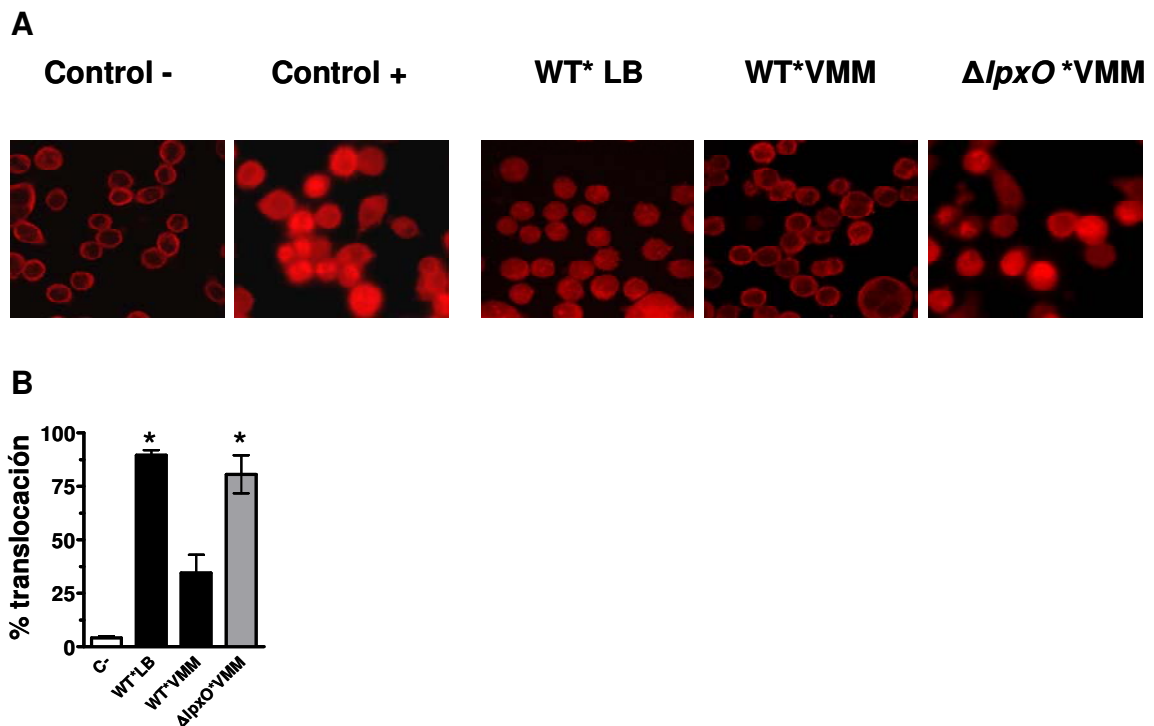


Figura 47: (A) Visualización de la translocación de la subunidad p65 de NF κ B al núcleo en MH-S sin estimular (C-) o estimulados con LPS de *E. coli* (C+), lípido A de la cepa salvaje cultivada en LB (WT*LB) o en VMM (WT*VMM) y con lípido A del mutante 52 Δ lpxO (Δ lpxO*VMM). (B) Porcentaje de núcleos positivos para la translocación de p65. * indica una diferencia estadísticamente significativa (*P<0.05, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa salvaje cultivada en VMM.

4.4.2 Activación de las vías MAPKs

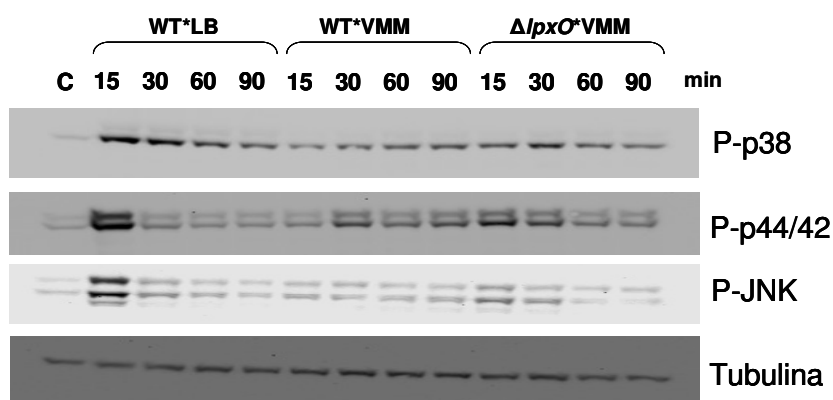


Figura 48: Estudio temporal de la activación de distintas MAP quinzas implicadas en la respuesta inflamatoria.

Como vemos en la **figura 48**, el lípido A WT*LB induce la activación de las 3 quinzas estudiadas a los 15 minutos post desafío. Más aún, la activación de p38 es evidente hasta los 90 minutos de contacto. En los macrófagos tratados con el lípido A WT*VMM se da activación de p38 y de p44/42 pero ocurre más tarde y es más débil que la que observamos cuando tratamos las células con el lípido A WT*LB. El lípido A Δ/pxO *VMM también induce la activación de las 3 quinzas en tiempos cortos de estimulación y en el caso de las quinzas p38 y p44/42, esta activación sigue siendo evidente aún tras 90 minutos de estimulación. Por otro lado, la activación de JNK en las células estimuladas con los lípidos A WT*VMM y Δ/pxO *VMM fue menor que en aquellas células tratadas con el lípido A WT*LB.

4.4.3 Secreción de TNF α

Finalmente, analizamos la capacidad de los lípidos obtenidos para estimular la secreción de TNF α . Tras estimular los macrófagos durante 16 horas con los diferentes lípidos obtenidos, cuantificamos la secreción de TNF α mediante ELISA. Como se observa en la **figura 49**, el lípido A WT*LB indujo una elevada secreción de TNF α en ambas concentraciones testadas. La secreción de TNF α en macrófagos estimulados con los lípidos A *VMM sólo fue detectable cuando estimulamos las células con una concentración final de 100 ng/ml. El

lípidos A WT*VMM resultó ser menos inmunoestimulador que el lípidos A $\Delta lpxO$ *VMM y que el WT*LB. No apreciamos que la diferencia en la secreción de TNF α fuera estadísticamente significativa entre las células estimuladas con el lípidos WT*LB y las desafiadas con el $lpxO$ *VMM utilizando una concentración de 100 ng/ml.

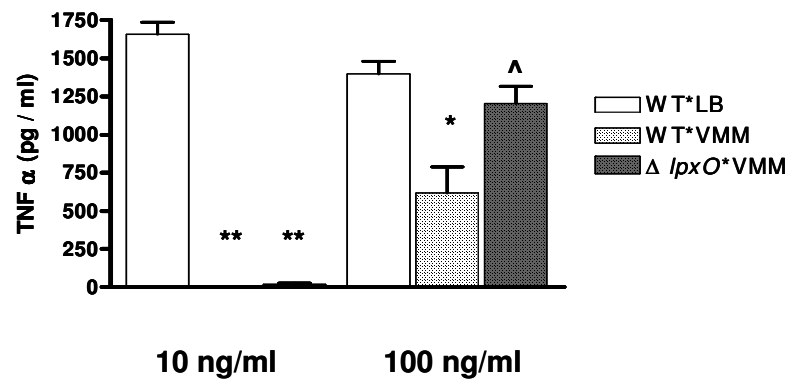


Figura 49: Cuantificación, mediante ELISA, de la secreción de TNF α en MH-S tras ser estimulados con dos concentraciones diferentes de los lípidos A obtenidos. * indica una diferencia estadísticamente significativa (*P < 0.01, **P < 0.001, análisis de varianza de una cola ANOVA) con respecto al lípidos WT*LB. (^P < 0.05, análisis de varianza de una cola ANOVA, con respecto al lípidos WT*VMM).

Resumiendo, el lípidos A que *K. pneumoniae* expresa *in vivo* en el pulmón, resultó ser menos inflamatorio que el lípidos A que expresa en medios de cultivo convencionales, ya que induce una menor degradación de I κ B α , una menor activación de MAP quinasas, menor translocación de la subunidad p65 a núcleo y menor secreción de TNF α .

4.5 LpxO y resistencia a AMPs

Es sabido que las modificaciones del lípidos A confieren resistencia frente ciertos tipos de AMPs. Además, la resistencia a AMPs se correlaciona con la virulencia de la bacteria. Para estudiar la implicación de la 2-hidroxilación en la resistencia a AMPs, realizamos ensayos de supervivencia frente a β -defensina 1 y 2 (BD-1 y BD-2) y HNP-1, ya que son defensinas naturales, polimixina B (PxB), pues es el AMP que se utiliza como modelo de acción bactericida²⁵⁶, y

colistina por que es uno de los pocos antibióticos disponibles para tratar infecciones de *K. pneumoniae* multiresistentes.

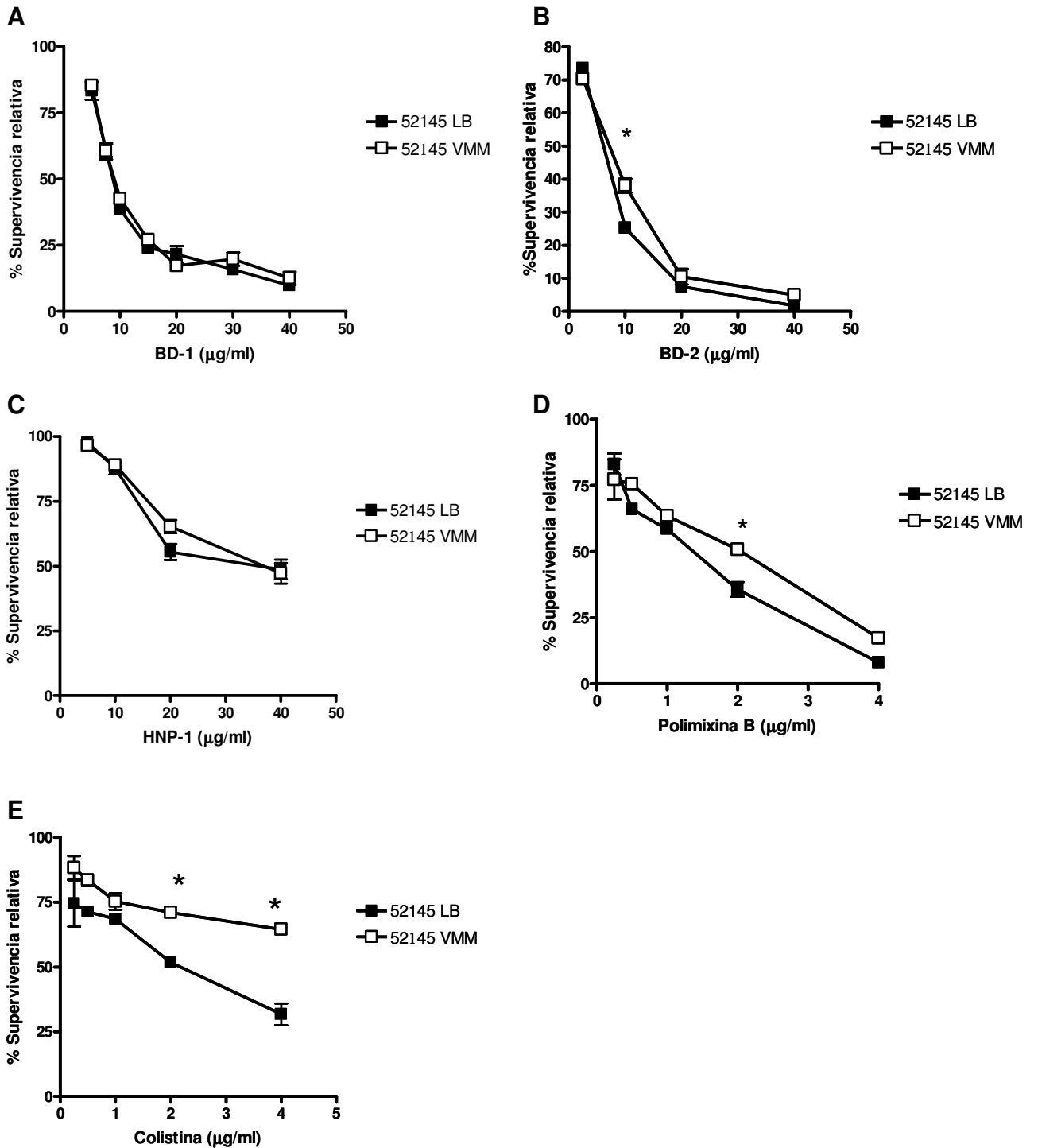


Figura 50: Resistencia frente a AMPs. La cepa 52145 se cultivó tanto en medio LB como en medio VMM. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Como vemos en la **figura 50**, al cultivar las bacterias en medio VMM se aumenta la supervivencia frente a BD-2, PxB y colistina.

Sin embargo, como hemos visto en el apartado **4.3**, cuando *K. pneumoniae* crece en medio VMM además de la expresión de *lpxO* también se aumenta la expresión de *phoP* por lo que no podemos decir que la resistencia a estos AMPs sea debida tan sólo a la actividad de LpxO. Para elucidar entonces si la 2-hidroxilación es importante para la supervivencia de la bacteria frente a AMPs, analizamos la resistencia de las cepas $52\Delta phoPQ$, $52\Delta lpxO$, $52\Delta phoP\Delta lpxO$ y de la cepa salvaje frente a diferentes AMPs. En los ensayos de supervivencia frente a PxB (**figura 51A**) no hubo diferencias significativas entre la cepa silvestre y el mutante $52\Delta lpxO$. Por otro lado, la supervivencia del mutante $52\Delta phoPQ$ y la del doble mutante $52\Delta phoPQ\Delta lpxO$ sí se vio afectada en presencia de PxB. En cambio, para las defensinas hBD-1 y hBD-2, para HNP-1 así como para la colistina, las diferencias en la supervivencia entre la cepa 52145 y $52\Delta lpxO$, sí resultaron ser significativas (**figura 51B-E**) por lo que podemos afirmar que la modificación que LpxO promueve juega un papel importante en la resistencia de la bacteria frente a estos AMPs. Además, la delección de *phoPQ* afecta de una manera drástica la sensibilidad de *K. pneumoniae* pues la supervivencia tanto del mutante simple como del mutante $52\Delta phoPQ\Delta lpxO$, se vio muy reducida en todos los AMPs testados.

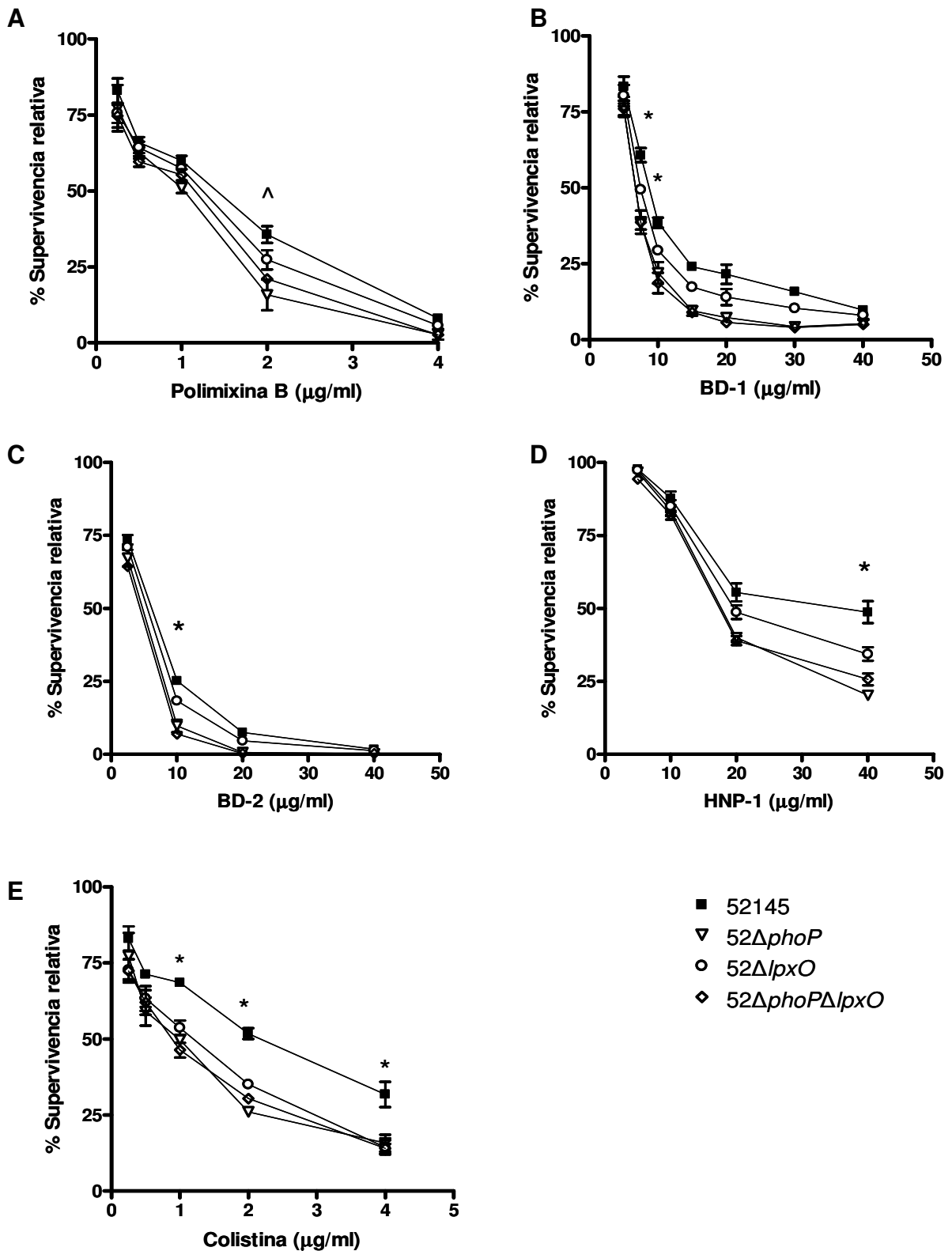


Figura 51: Ensayos de sensibilidad frente a AMPs, PxB (A), hBD-1 (B), hBD-2 (C), HNP-1 (D) y colistina (E). ^ indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$, análisis de varianza de dos colas ANOVA) entre la cepa salvaje y el mutante 52ΔphoP. * indica un diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, análisis de varianza de dos colas ANOVA) entre la cepa salvaje y el mutante 52ΔpxO.

Finalmente, determinamos la CMI_{50} frente a colistina de las cepas 52145, $52\Delta lpxO$ y $52\Delta phoPQ$ usando el método de microtitulación en placa descrito en el apartado 2.15. En la **figura 52**, que se muestra a continuación, podemos ver que el mutante $52\Delta lpxO$ es más sensible que el mutante $52\Delta phoPQ$ y que la cepa salvaje a bajas concentraciones de colistina. Aunque ambos mutantes presentan una CMI_{50} similar, una vez superada esta concentración el mutante $52\Delta phoPQ$ es el que resulta ser más sensible de los dos.

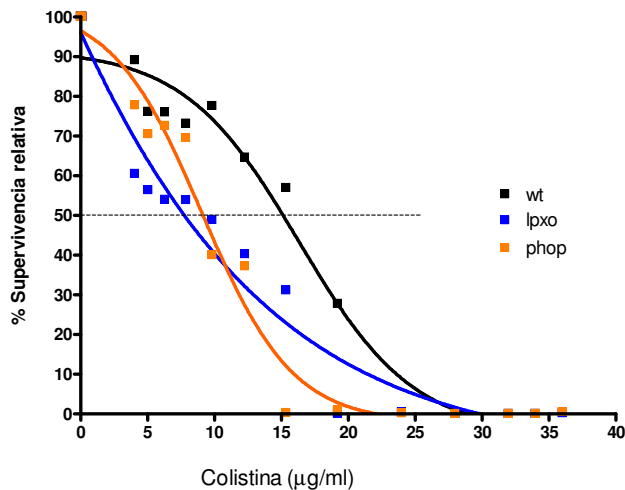


Figura 52: Determinación de la CMI_{50} de la cepa 52145 (wt), del mutante $52\Delta lpxO$ (lpxO) y $52\Delta phoPQ$ (phoP).

Como se ha comentado en la introducción, la exposición a determinados AMPs activa los sistemas de dos componentes y promueve las modificaciones del lípido A. Para estudiar si la exposición a colistina activa la expresión de *phoP* y/o de *lpxO*, medimos la actividad luciferasa de las cepas reporteras cuando éstas se enfrentan a diferentes concentraciones de colistina (**figura 53**).

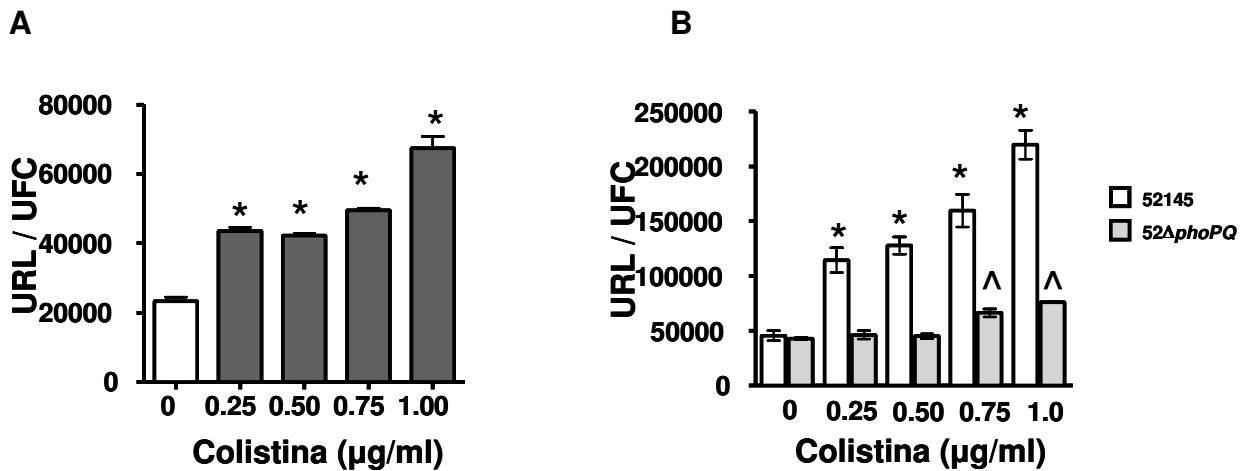


Figura 53: (A) Análisis de la expresión de *phoPQ* en la cepa 52145 enfrentada a concentraciones crecientes de colistina. (B) Análisis de la expresión de *lpxO* en la cepa silvestre y en el mutante 52Δ*phoPQ* expuestas a concentraciones crecientes de colistina. Los datos muestran la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. * Indica una diferencia estadísticamente significativa en la cepa silvestre con respecto al control sin tratar con colistina, ^ indica una diferencia estadísticamente significativa en el mutante *phoPQ*, con respecto al control sin tratar con colistina ($P < 0.01$, Test *t* de Student).

Como podemos observar en la **figura 53A y B**, tanto la expresión de *phoP* como la expresión de *lpxO* se ve aumentada cuando la bacteria se enfrenta a colistina. El hecho de que la expresión de *lpxO* también aumente en el fondo genético del mutante 52Δ*phoPQ* cuando se enfrenta a colistina, aunque no de una manera tan drástica, nos sugiere que la expresión de *lpxO* depende en gran parte de PhoPQ, aunque podría haber otros factores implicados en su regulación. Este aumento de expresión de *lpxO* se traduce en un aumento de las formas de lípido A 2-hidroxiladas (m/z 1840 y m/z 1866), y podemos observar un patrón similar al que la bacteria expresa *in vivo* (**figura 54**).

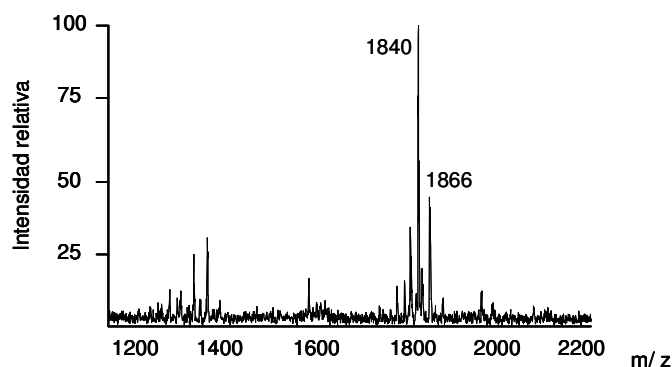


Figura 54: (A) Estructura del lípido A de *K. pneumoniae* 52145 cultivada en presencia de colistina. Los resultados son representativos de tres extracciones independientes.

En conjunto, estos datos nos indican que la 2-hidroxilación mediada por LpxO es un mecanismo de remodelación del lípido A que media resistencia a colistina. Además, la expresión de *lpxO* es en gran parte PhoPQ dependiente.

4.5 LpxO y resistencia a colistina en cepas clínicas

La colistina es uno de los pocos tratamientos disponibles para lidiar contra las infecciones de cepas multiresistentes a los antibióticos. Sin embargo, cada vez es más frecuente aislar cepas resistentes a la colistina.

Analizamos, mediante MALDI-TOF, los lípidos A extraídos de cepas clínicas multiresistentes y sensibles a colistina y el de cepas clínicas multiresistentes y resistentes a colistina (**figura 55**). Las cepas multiresistentes pero sensibles a colistina expresan un lípido A similar al de la cepa 52145 cultivada en LB (**figura 55A**). En cambio, en el lípido A de las cepas multiresistentes y resistentes a colistina aparecen, además del pico de m/z 1824, los picos de m/z 1840 y m/z 1866 (**figura 55B**), es decir las formas 2-hidroxiladas. Los picos de m/z 1971 y m/z 1997 se corresponden con la adición de aminoarabinosa (m/z 131) a las formas de m/z 1840 y m/z 1866, respectivamente.

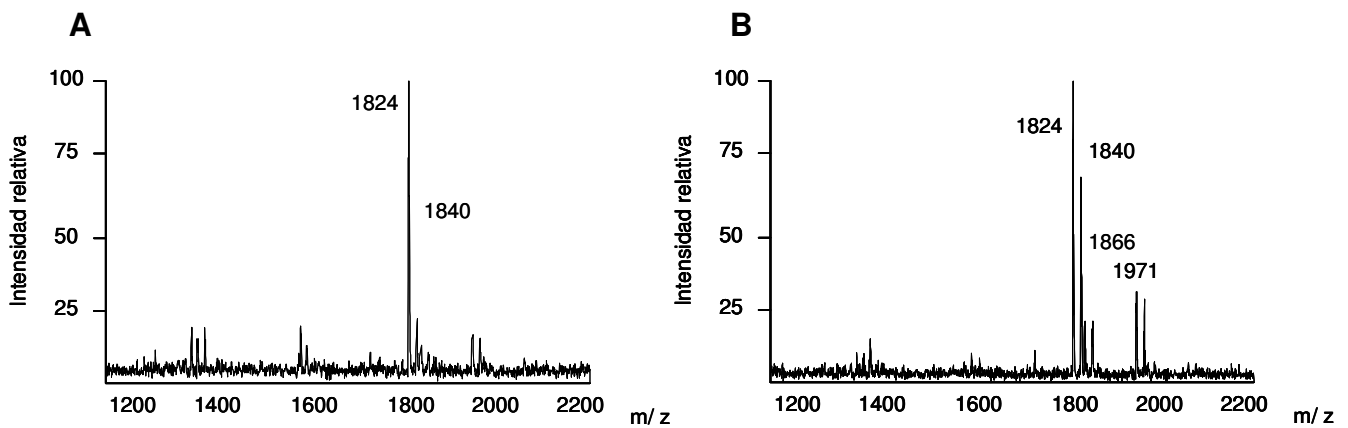


Figura 55: Lípido A de cepas de *K. pneumoniae* multiresistentes de origen clínico. (A) *K. pneumoniae* sensible a colistina. (B) *K. pneumoniae* resistente a colistina. Los resultados son representativos de tres extracciones independientes.

Seguidamente, construimos mutantes *lpxO* por inserción en las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a colistina y analizamos su estructura de lípido A y su resistencia a colistina. En la **figura 56** observamos el lípido A que presentan los mutantes *lpxO* en estas cepas multiresistentes.

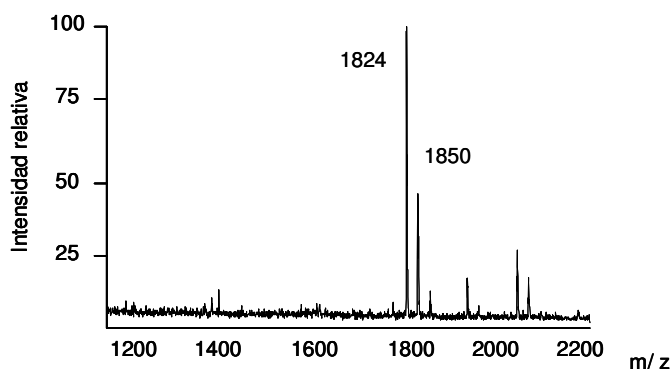


Figura 56: Lípido A de las cepas de *K. pneumoniae* multiresistentes y resistentes a colistina con *lpxO* mutado. Los resultados son representativos de, 3 extracciones independientes.

Los mutantes *lpxO* de estas cepas clínicas resistentes a colistina presentan un lípido A en el que predominan los iones m/z 1824 y m/z 1850.

Mediante ensayos de difusión radial calculamos la CMI de colistina que presentan estas cepas multiresistentes y sus respectivos mutantes *lpxO* isogénicos. En la **tabla 5**, se resumen los resultados obtenidos y podemos

comprobar cómo la inactivación de *lpxO* en las cepas resistentes a colistina hace que la CMI a dicho AMP sea hasta 4 veces menor que con un *lpxO* funcional.

Tabla 5: Aislados clínicos de *K. pneumoniae* multiresistentes y CMIs a colistina

Aislado clínico	Origen	Resistencia Colistina	CMI Colistina ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	CMI Colistina ($\mu\text{g} / \text{ml}$) $\Delta lpxO$
Kpn 1	Espuito	+	7.47	1.76
Kpn 2	Aspirado traqueal	+	9.48	2
Kpn 3	Aspirado traqueal	+	59.15	2.089
Kpn 4	Espuito	+	18.49	1.15
Kpn 5	Axila	+	7.75	1.244
Kpn 6	Aspirado traqueal	+	24.94	1.218
Kpn 7	Orina	+	13.33	1.53
Kpn 21	Orina	-	<1	ND
Kpn 22	Sangre	-	<1	ND
Kpn 24	Orina	-	<1	ND
Kpn 25	Pie	-	<1	ND
Kpn 26	Herida	-	<1	ND
Kpn 27	BAL	-	<1	ND
Kpn 28	Tejido	-	<1	ND

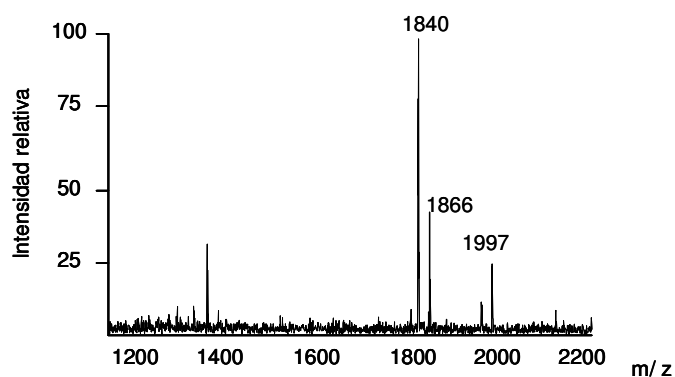


Figura 57: Estructura del lípido A de *K. pneumoniae* multiresistente y resistente a colistina, cultivada en presencia de colistina. Los resultados son representativos de 3 extracciones independientes.

En la **figura 57** se muestra el lípido A de un aislado clínico multiresistente y resistente a colistina cultivado en colistina. Como podemos ver, hay un aumento de las formas del lípido A 2-hidroxiadas (m/z 1840 y m/z 1866), al igual que ocurre con la cepa 52145 cuando se cultiva en presencia de colistina (**figura 54**). En conjunto, estos datos nos indican que la 2-hidroxiación del

lípidos A es un mecanismo de resistencia a colistina adoptado por las cepas de origen clínico.

4.6 Mecánica de la resistencia a colistina

Como se ha comentado en el apartado **1.6.2.2** de la introducción, los AMPs interactúan con las cargas negativas del lípido A, neutralizándolas, y a continuación se crean poros por los cuales los AMPs atraviesan la membrana. Para determinar si la 2-hidroxilación interfiere en la capacidad de unión de la colistina al lípido A, incubamos los lípidos A a testar con diferentes concentraciones de colistina. Seguidamente, utilizamos los sobrenadantes de estas muestras para determinar la CMI a colistina de una bacteria indicadora, en este caso *E. coli*. La idea de este ensayo es que cuánto mayor sea la interacción entre el lípido A y la colistina, menor será la cantidad de colistina libre en el sobrenadante y, por tanto, mayor será el incremento de CMI a colistina. De manera paralela, realizamos el mismo ensayo utilizando la bacteria entera cultivada en las distintas condiciones y utilizando, como en el caso anterior, *E. coli* como bacteria indicadora.

En la **figura 58** se muestran los resultados obtenidos y se expresan como la diferencia de la CMI a colistina respecto a la cepa silvestre (wt) cultivada en LB. La CMI se vio aumentada al incubarse la colistina tanto con el lípido A purificado como con la bacteria viva. La CMI observada tanto para el lípido A WT*VMM como para la cepa salvaje cultivada en dicho medio, fue menor que la obtenida con el lípido A Δ/pxO *VMM y la obtenida para $52\Delta/pxO$ cultivada en VMM, lo cual indica que la colistina tiene más afinidad por un lípido A que no está hidroxilado. Observamos además que la CMI de colistina aumenta drásticamente cuando usamos como “trampa” la cepa $52\Delta/pxO$ cultivada en LB, cuyo lípido A consiste en una forma hexaacilada de m/z 1824 (**figura 35A**).

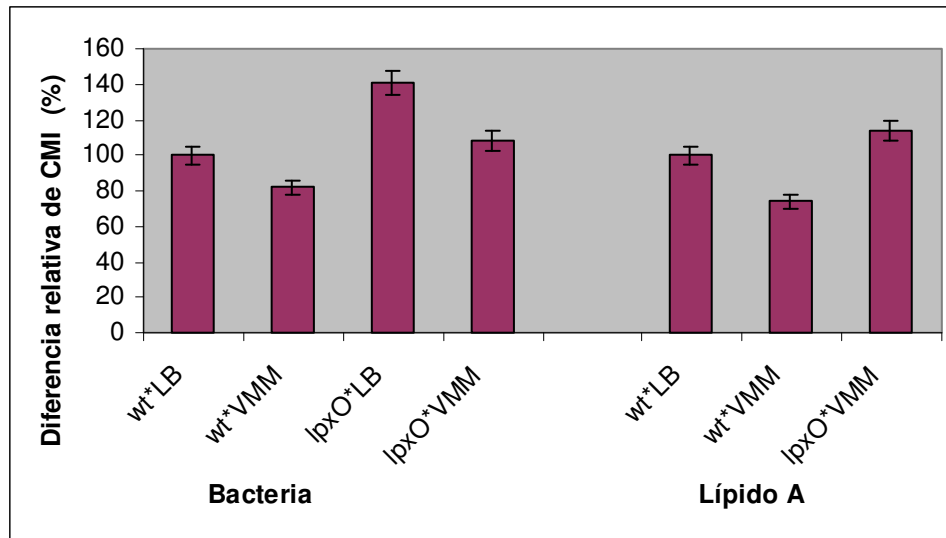


Figura 58: Incremento relativo de la CMI de *E. coli* a colistina. En el eje de las coordenadas se indica la procedencia de las muestras.

Para finalizar, quisimos determinar si la 2-hidroxilación juega algún papel en la permeabilidad de la membrana externa realizando ensayos de permeabilidad a 1-NPN usando la cepa silvestre y el mutante $52\Delta/lpxO$ cultivados en medio VMM y desafiando las células con colistina. El 1-NPN emite fluorescencia cuando se encuentra en ambientes hidrofóbicos por tanto, un aumento de fluorescencia nos indica una mayor permeabilidad de la membrana. Como se aprecia en la **figura 59**, el 1-NPN emite más fluorescencia cuando se incubaba con el mutante $52\Delta/lpxO$ que cuando se incubaba en presencia de la cepa salvaje, cuando ambos han sido desafiados con colistina (concentración final 1 $\mu\text{g/ml}$).

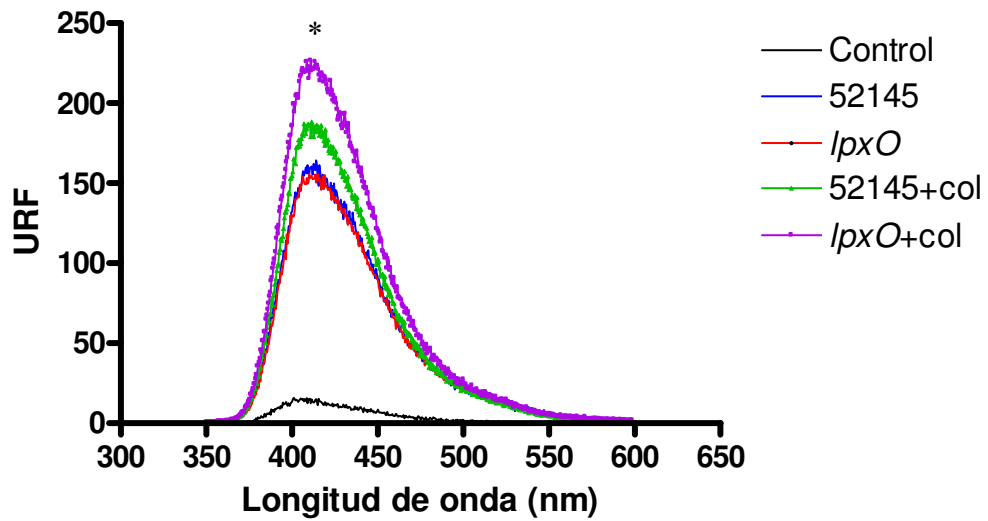


Figura 59: Ensayos de permeabilidad de membrana a 1-NPN. * Indica una diferencia estadísticamente significativa entre la cepa salvaje y el mutante $52\Delta/lpxO$ tratados con colistina ($P < 0.001$, análisis de varianza de una cola ANOVA).

Estos datos nos indican que la 2-hidroxilación crea una membrana por la cual la colistina tiene menor afinidad y además reduce la permeabilidad de la membrana externa a este AMP.

Discusión

Discusión

Al comienzo de este trabajo, era conocido que las especies patógenas que presentan una delección en el gen *hfq* presentan una virulencia atenuada con respecto a su respectiva cepa parental debido a la desregulación de la expresión de factores de virulencia, generalmente regulados por TCS^{211 212 213 214 215 216 217 218}. Por otro lado, un trabajo previo de nuestro grupo había puesto de manifiesto que Hfq regula la expresión de modificaciones en el lípido A de *Yersinia enterocolitica*¹²¹. Estos dos puntos hicieron que nos planteásemos como primer objetivo de esta Tesis estudiar la relación entre la estructura del lípido A que presentan las cepas patógenas con el gen *hfq* deleccionado y la respuesta que esta estructura provoca en el sistema inmune innato del huésped. Este planteamiento inicial se fue transformando con el paso del tiempo y gracias a los resultados obtenidos, en lo que al final se ha convertido en el hilo conductor de este trabajo y que nos ha permitido plantearnos el objetivo final de esta Tesis que no es otro que estudiar la relación directa entre los cambios en la estructura del lípido A que presenta *K. pneumoniae* durante una infección y la respuesta que provoca por parte del sistema inmune innato del huésped.

En las 3 enterobacterias estudiadas, *Y. enterocolitica*, *S. Typhimurium* y *K. pneumoniae*, comprobamos que la delección de *hfq* cambia la acilación secundaria del lípido A. Concretamente, la delección de *hfq* resulta en un aumento de las especies heptaaciladas del lípido A como consecuencia de la adición de un grupo palmitato como séptimo ácido graso en posición 2 tanto en *K. pneumoniae*, en *S. Typhimurium* como en *Y. enterocolitica* cultivada a 21°C. Como se ha resumido en la introducción (apartado **1.3.1.3**), el gen *pagP* codifica la aciltransferasa responsable de la adición de palmitato al lípido A, por lo que nos planteamos estudiar el nivel de activación de este gen en los mutantes *hfq*. Mediante análisis de qRT-PCR, y usando muestras de RNA de las tres especies obtenidas en la fase exponencial del crecimiento, hemos demostrado que la expresión de *pagP* está aumentada en el fondo genético de cada uno de los mutantes *hfq* estudiados. Del mismo modo, también hemos demostrado que, al igual que pasa con la expresión de *pagP*, la expresión de su regulador positivo *phoP* también está aumentada, por lo que es razonable

pensar que el incremento observado en la expresión de *pagP* puede ser debido directamente al aumento de expresión de *phoP*. Trabajos recientes han puesto de manifiesto la estrecha y compleja relación existente entre Hfq y PhoP mediante la identificación de MicA y GcvB, dos sRNA que actúan sobre PhoP en *E. coli*, alterando de distinta manera la expresión del regulón PhoPQ²⁹². Es tentador pensar que el efecto de Hfq sobre *pagP* vía *phoP* observado en las tres especies estudiadas puede deberse a la acción de uno de estos sRNA, aunque en este momento no lo podemos asegurar.

El análisis mediante espectrometría de masas del lípido A de *K. pneumoniae* mostró que, a parte del claro aumento de la heptaacilación observada debido a la delección de *hfq*, el mutante también presentaba un aumento de aminoarabinosa. PhoP, además de regular la adición de palmitato al lípido A, está implicado en la regulación de otras modificaciones como son la adición de aminoarabinosa o la 2-hidroxilación. Ésto nos llevó a plantearnos si, al igual que habíamos observado para el gen *pagP*, la expresión de los genes responsables de la adición de aminoarabinosa o de la 2-hidroxilación podían estar alterados en el mutante *hfq*. Los resultados obtenidos mediante el uso de fusiones transcripcionales muestran claramente cómo en el mutante *hfq* hay un incremento tanto en la expresión de *pmrH* como de *lpxO*. El aumento observado en *pmrH* se corresponde con el ligero aumento observado mediante espectrometría de masas del lípido A, cosa que no ocurre con el aumento en la expresión de *lpxO* y la hidroxilación observada en el lípido A de la cepa silvestre y el mutante *hfq*. Esta discrepancia creemos que es debida a las diferencias en la resolución de las distintas técnicas empleadas. Mientras el análisis genético de la expresión nos puede identificar variaciones leves en los niveles de expresión de un gen, el estudio mediante MALDI-TOF necesita de mayores diferencias para ser visualmente llamativo.

Una vez analizado el efecto de Hfq en la estructura del lípido A vía PhoP, quisimos analizar el efecto de la delección de *hfq* sobre los sistemas PmrAB y RcsCDB ya que se han identificado como relevantes para la regulación de la estructura del lípido A en *K pneumoniae*. Los resultados muestran cómo en este fondo genético, la expresión de *pmrCAB* no se encuentra afectada pero sí la del sistema *rscCDB*, que se encuentra aumentada.

Un trabajo previo de nuestro grupo estudió la implicación de cada uno de estos tres sistemas en la modulación del lípido A de *K. pneumoniae*⁷⁴. Este trabajo mostró que la adición de aminoarabinosa puede deberse a un aumento tanto en la expresión de *phoPQ* como en la expresión de *pmrCAB*. El hecho de que en el mutante *hfq* no veamos activación del operón *pmrCAB* indica que el incremento de aminoarabinosa observado en el lípido A del mutante *hfq* se deba únicamente al incremento en la expresión de *phoPQ* y no de *pmrCAB*.

En ese mismo trabajo se puso de manifiesto una regulación íntima entre RcsCDB y PhoPQ. Al activarse el sistema PhoPQ, se promueve la transcripción del sistema *rcsCDB*, mientras que Rcs reprime la transcripción de *phoPQ*. Por ello, es lógico pensar que el aumento que encontramos en la expresión de *rcsCDB* en el mutante *hfq* se debe a que la expresión de *phoPQ* está incrementada en este fondo genético. Fue llamativo encontrar que, a pesar de que el sistema *rcsCDB* se encuentre sobreexpresado, tanto la expresión del operón de cápsula como la síntesis del polisacárido capsular, que generalmente se han ligado a este sistema, se ven reducidas en el fondo genético del mutante. En este momento sólo podemos especular sobre este hecho, aunque podemos atribuir esta discrepancia al carácter pleiotrópico del gen *hfq*.

Una vez analizado el efecto de Hfq en la estructura del lípido A en distintas *Enterobacteriaceae*, y con tal de abordar la segunda parte de la cuestión que nos habíamos planteado inicialmente, quisimos estudiar el efecto que esta estructura tiene sobre la respuesta del sistema inmune innato del huésped.

Para ello comparamos la inducción de la respuesta inflamatoria del lípido A de un mutante *hfq* de *K. pneumoniae* con la respuesta inducida por el lípido A de la cepa silvestre, analizando la activación de la vía de señalización de NFκB y la activación de las MAP quinasas.

Para estudiar la activación de NFκB analizamos la degradación de IκBα, ya que la activación de NFκB necesita de la degradación de IκBα que libera la subunidad p65, de tal manera que esta pueda translocarse al núcleo y así inducir la transcripción de genes inflamatorios. Los resultados obtenidos muestran cómo ambos lípidos A inducen la degradación de IκBα, aunque la degradación es menor cuando el lípido A usado es el del mutante *hfq*.

Al analizar las distintas MAP quinasas obtuvimos resultados similares, mientras el lípido A de la cepa silvestre induce la activación de las tres vías de MAP quinasas de una forma significativa, el lípido A del mutante *hfq* lo hace de una forma mucho más leve y con un lapso de tiempo más largo. Conjuntamente, los resultados de la activación de la vía del NFκB y de las vías de las MAP quinasas muestran que el lípido A del mutante *hfq* de *K. pneumoniae* induce una menor respuesta inflamatoria en MH-S que el lípido A de la cepa silvestre. Estos resultados nos permiten afirmar que el mayor grado de acilación del lípido A por la adición de un grupo palmitato hace que sea menos inmunoestimulador.

Dado que la inflamación es una de las primeras respuestas del sistema inmunitario ante una infección, y que las especies con el gen *hfq* mutado presentan generalmente una virulencia atenuada, estos resultados parecen indicar que la deficiencia en virulencia de estas cepas es independiente de la respuesta inflamatoria inicial que provocan, o bien que se debe a un conjunto de efectos cuyo balance final resulta en una menor virulencia.

Estos resultados nos hicieron replantear el enfoque del trabajo para esclarecer la relación entre la estructura del lípido A que presenta *K. pneumoniae* durante una infección y la respuesta que provoca por parte del sistema inmune innato. Por ello decidimos dar un paso más allá y averiguar cómo es en realidad la estructura del lípido A que presenta *K. pneumoniae in vivo* durante una infección. Aunque esta cuestión parezca muy obvia, al inicio de esta Tesis no había ningún trabajo que investigara la posibilidad de que el lípido A que presenta una bacteria durante una infección fuera distinto del que expresa en condiciones de cultivo de laboratorio. Quizás, uno de los motivos es la dificultad técnica para realizar este tipo de análisis. Por ello, el primer objetivo que nos planteamos fue optimizar el método de extracción del lípido A para evitar el paso de aislamiento bacteriano y posibles interferencias debidas al crecimiento en medios ricos de cultivo. Los resultados que presentamos en esta Tesis doctoral demuestran que hemos conseguido extraer el lípido A que *K. pneumoniae* expresa durante una infección sin necesidad de aislarla previamente. Con esta metodología hemos visto que *K. pneumoniae* expresa en el pulmón un lípido A diferente al que expresa cuando crece en medios tradicionales de laboratorio. Además, las estructuras mayoritarias que

encontramos en el pulmón siguen presentes en el lípido A de bacterias aisladas en placa, aunque en menor abundancia, y se pierden casi por completo tras otro pase adicional en LB. Esto nos demuestra la plasticidad de la molécula del lípido A y la importancia de caracterizar esta estructura *in vivo*. Las especies de lípido A que mayoritariamente expresa *K. pneumoniae* en el pulmón son hexaaciladas (m/z 1840 y m/z 1866) y se caracterizan por la presencia de una cadena de 2-hidroxi miristato (C_{14:0}, 2-OH) esterificando el ácido graso en posición 2'. A pesar de que ambas especies tienen el mismo número de ácidos grasos, difieren en la posición y en la longitud de las cadenas. En este punto cabe destacar que la estructura de lípido A presente en el pulmón es diferente a la estructura que *K. pneumoniae* expresa cuando se encuentra en el bazo, lo que pone de manifiesto la capacidad de *K. pneumoniae* de modificar su lípido A en función del ambiente en el que se encuentra.

En este momento nos planteamos la posibilidad de conseguir unas condiciones de cultivo en las que *K. pneumoniae* expresara un lípido A igual al que expresa durante una infección pulmonar. Aunque por el momento no conocemos cuáles son las señales que *K. pneumoniae* detecta en el pulmón para expresar esta estructura de lípido A, conseguimos unas condiciones de cultivo, VMM, en las que *K. pneumoniae* expresa ese mismo lípido A. Los resultados obtenidos, mediante MALDI-TOF, de la estructura de lípido A que expresa *K. pneumoniae* cultivada en las distintas condiciones demuestran que el lípido A es una molécula con elevada plasticidad cuya estructura responde a las condiciones cambiantes del medio.

Una vez identificadas las modificaciones que presenta el lípido A de *K. pneumoniae* durante una infección pulmonar, quisimos determinar la regulación de los genes responsables de estas modificaciones y su implicación en la respuesta inmune innata del huésped. En primer lugar identificamos los genes *lpxO* y *pagP* como los principales responsables de las modificaciones del lípido A encontradas.

Los resultados obtenidos al estudiar la estructura del lípido A del mutante 52Δ*lpxO* claramente nos demuestran que este es el gen responsable de la 2-hidroxilación del lípido A, tanto *in vivo* como *in vitro*. El análisis de la actividad de la fusión transcripcional *lpxO::lucFF* en la cepa 52145 y en los mutantes isogénicos 52Δ*pmrAB*, 52Δ*phoPQ* y 52Δ*rscB* muestra que la regulación de

lpxO es independiente de PmrA y dependiente de PhoP, tanto *in vitro* como *in vivo*. Señalar que, en el fondo genético del mutante 52Δ*rscB*, la expresión de *lpxO* se encuentra aumentada. Como hemos comentado anteriormente, hay una estrecha relación entre los sistemas PhoPQ y RcsCDB. En *K. pneumoniae* RcsB reprime la expresión de *phoP*. Aunque desconocemos los mecanismos de dicha inhibición, podemos especular que al faltar el regulador RcsB, no se reprima la expresión de *phoPQ* a través de RpoS, como ocurre en *S. Typhimurium*¹⁹³. De la misma manera, la expresión de *pagP* es directamente dependiente de PhoP, tanto *in vitro* como *in vivo*. Todos estos datos nos indican que las modificaciones del lípido A de *K. pneumoniae* durante una infección pulmonar no dependen del sistema PmrAB y son dependientes del sistema PhoPQ.

Una vez identificada la estructura del lípido A *in vivo* y los genes implicados en su regulación, estudiamos la respuesta inflamatoria que provoca esta estructura.

Los resultados de activación de las vías MAP quinasas y NFκB indican que el lípido A que expresa *K. pneumoniae in vivo* en el pulmón tiene menor capacidad inmunogénica que el que la bacteria expresa cuando crece en LB. La respuesta inflamatoria que observamos al estimular con el lípido A de mutante 52Δ*lpxO in vivo* nos indica que la atenuación observada al utilizar el lípido A de la cepa salvaje *in vivo* se debe, en gran parte, a la presencia del 2-hidroxiiristato. Estos resultados concuerdan con la menor expresión de *tnfa* y *kc* que observamos en los pulmones de ratones infectados con la cepa silvestre en comparación con el mutante 52Δ*lpxO*. De igual manera, los recuentos bacterianos en la infección de ratón apoyan la importancia de *lpxO* en la supervivencia de *K. pneumoniae* en el pulmón.

A pesar de haber identificado el efecto de la 2-hidroxilación en la atenuación de la respuesta inflamatoria, en este momento no podemos afirmar que la modulación de la respuesta inmune observada se deba únicamente a esta modificación. En este sentido se ha visto que la distribución de los ácidos grasos en el disacárido de glucosamina y la conformación que adoptan las moléculas de lípido A (cilíndrica o cónica, agregados) definen el nivel de reconocimiento por parte del complejo TLR4-MD-2^{294 295}. Es lógico que a una

determinada estructura de lípido A le corresponda una determinada conformación tridimensional.

Apoyando esta hipótesis, la estructura del lípido A *in vivo* presentará una conformación tridimensional marcada por las formas m/z 1840 y m/z 1866 que se corresponden con una distribución asimétrica de los ácidos grasos (4+2) y a una distribución simétrica (3+3) respectivamente. Mientras que la conformación tridimensional del lípido A *in vitro* se corresponde con una distribución asimétrica (4+2), dependiente de la forma m/z 1824.

Para verificar esta idea habría que realizar estimulaciones con cada una de las especies de lípido A encontradas por separado, es decir m/z 1824, 1840 y 1866, analizando su estructura tridimensional y la respuesta que induce cada una de ellas.

A continuación, y debido a que las modificaciones del lípido A participan en la resistencia frente a AMPs^{75 121 74}, nos propusimos estudiar el papel de las modificaciones presentes en el lípido A *in vivo* en la resistencia frente a AMPs. Los experimentos de supervivencia realizados con la cepa 52145 previamente cultivada en LB o en medio VMM nos indican que, efectivamente, la estructura de lípido A expresada *in vivo* aumenta la resistencia de la bacteria frente a AMPs. Estos mismos experimentos nos indican que LpxO media resistencia frente a HNP-1, β -defensinas y colistina.

El alarmante aumento de infecciones causadas por cepas multiresistentes a los antibióticos hace que los resultados obtenidos cobren mayor importancia ya que la colistina se considera el último recurso efectivo para el tratamiento de estas infecciones. Esto nos llevó a analizar si LpxO podría estar mediando resistencia a colistina en cepas de origen clínico. Para ello comparamos el lípido A de cepas de *K. pneumoniae* multiresistentes a los antibióticos con el lípido A de cepas de *K. pneumoniae* también multiresistentes y resistentes además a colistina. Los resultados obtenidos demuestran claramente que la 2-hidroxilación del lípido A es un mecanismo, hasta ahora desconocido, de resistencia frente a colistina. Nuestros resultados indican que el incremento de resistencia a colistina mediado por LpxO es debido a que la 2-hidroxilación dificulta la unión de la colistina al lípido A y crea una membrana menos permeable.

Conclusiones

Conclusiones

1. En *K. pneumoniae*, *S. Typhimurium* y *Y. enterocolitica* O8 cultivada a 21°C, se observa una mayor heptaacilación del lípido A asociada a la delección de *hfq*.
2. En las *Enterobacteriaceae* estudiadas, Hfq es un regulador negativo de la expresión del sistema *phoPQ*.
3. En *K. pneumoniae*, Hfq regula de manera negativa la expresión de *rcsFCDB*.
4. El lípido A del mutante *hfq* de *K. pneumoniae* induce una menor respuesta inflamatoria que el lípido A de la cepa silvestre.
5. *K. pneumoniae* expresa un lípido A diferente en función del órgano que está infectando.
6. Durante una infección pulmonar, *K. pneumoniae* expresa mayoritariamente dos especies de lípido A hexaaciladas que se caracterizan por la presencia de una cadena de 2-hidroxi miristato como acilación secundaria en 2'. Una de las especies presenta 4 ácidos grasos primarios, una cadena de miristato y una cadena de 2-hidroxi miristato como ácidos grasos secundarios. La segunda especie presenta los mismos ácidos grasos primarios, 2-hidroxi miristato y palmitato como acilaciones secundarias.
7. El gen responsable de la 2-hidroxiación en *K. pneumoniae* es *lpxO*.
8. La expresión de *lpxO* en *K. pneumoniae* está regulada por el sistema de dos componentes PhoPQ tanto *in vitro* como *in vivo*.
9. La expresión de *lpxO* es importante para la supervivencia de *K. pneumoniae* en el pulmón.
10. Un mutante *lpxO* de *K. pneumoniae* induce una respuesta inflamatoria mayor que la cepa salvaje durante una infección de pulmón.
10. El lípido A que expresa *K. pneumoniae* en el pulmón induce una menor respuesta inflamatoria que el lípido A que expresa *in vitro*.
11. LpxO, junto con el TCS PhoPQ, participan en la resistencia de *K. pneumoniae* frente a β -defensinas, HNP-1 y colistina.
12. La exposición a colistina en *K. pneumoniae* aumenta la expresión de *phoPQ* y de *lpxO*.
13. La 2-hidroxiación del lípido A en *K. pneumoniae* dificulta la unión de colistina a la membrana externa de la bacteria, aumentando su impermeabilidad frente a colistina.

Anexos

Anexo

Tabla 6: Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

Cepa	Características	Referencia
52145	Aislado clínico; Serotipo O1:K2; Rif^r .	37 296
52Δ<i>lpxO</i>	Mutante por delección en el gen <i>lpxO</i> . Rif^r .	Este trabajo
52Δ<i>hfq</i>	Mutante por delección en el gen <i>hfq</i> . Rif^r .	Este trabajo
52Δ<i>phoPQ</i>	Mutante por inserción de un GB en en operón <i>phoPQ</i> . Rif^r Km^r .	74
52Δ<i>hfq</i>Δ<i>phoPQ</i>	Mutante por inserción de un GB en el operón <i>phoPQ</i> sobre la cepa 52Δ <i>hfq</i> . Rif^r Km^r .	Este trabajo
52Δ<i>pmrAB</i>	Mutante en el sistema PmrAB por delección. Rif^r .	74
52Δ<i>rcsB</i>	Mutante por delección en el gen <i>rcsB</i> . Rif^r .	74
52Δ<i>wca</i>_{K2}	Mutante en el gen <i>manC</i> del grupo génico <i>wca</i> , no expresa polisacárido capsular. Rif^r .	47
52Δ<i>wca</i>_{K2}Δ<i>lpxO</i>	Mutante por delección en el gen <i>lpxO</i> de la cepa 52Δ <i>wca</i> _{K2} . Rif^r .	Este trabajo
52Δ<i>hfq</i> / pACYC_Kpnhfq	Mutante <i>hfq</i> complementado.	Este trabajo
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Cepa silvestre de <i>Salmonella</i>	ATTC 14028
MA7791	Mutante por inserción en <i>hfq</i> de <i>S. Typhimurium</i>	297
TOP10	<i>E. coli</i>	Invitrogen
C600	<i>E. coli</i>	298
Sy327 λ pir	<i>E. coli</i>	
HB101	<i>E. coli</i>	299
MG1655	<i>E. coli</i>	300
52Δ<i>lpxO</i> / pTM100_ <i>lpxO</i>	Mutante <i>lpxO</i> complementado	Este trabajo

Tabla 7 : Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Características	Referencia
pGPL01	Plásmido de medio número de copia, origen de replicación R6K, <i>mob+</i> (mobilizable mediante conjugación), Amp ^R . Contiene el gen <i>lucFF</i> sin su promotor. Utilizado para la construcción de plásmidos reporteros mediante la fusión transcripcional entre el promotor del gen a estudiar y <i>lucFF</i> .	89
pGPL01_KpnProCPS	Fusión transcripcional ProCPS:: <i>lucFF</i> para medir transcripción del operón de cápsula	74
pGPL01_KpnProphoP	Fusión transcripcional ProphoP:: <i>lucFF</i> para medir la transcripción de <i>phoP</i> .	74
pGPL01_KpnPropagP	Fusión transcripcional PropagP:: <i>lucFF</i> para medir la transcripción de <i>pagP</i> .	74
pGPL01_KpnPropmrH	Fusión transcripcional PropmrH:: <i>lucFF</i> para medir la transcripción del operón <i>pmrH</i> .	74
pGPL01_KpnPropmrC	Fusión transcripcional PropmrC:: <i>lucFF</i> para medir la transcripción de <i>pmrC</i> .	Este trabajo
pGPL01_KpnProrcsC	Fusión transcripcional ProrcsC:: <i>lucFF</i> para medir la transcripción de <i>rcsC</i> .	74
pGPL01_KpnProyojN	Fusión transcripcional ProyojN:: <i>lucFF</i> para medir la transcripción de <i>yojN</i> .	74
pGPL01_KpnProlpxO	Fusión transcripcional ProlpxO:: <i>lucFF</i> para medir la transcripción de <i>lpxO</i> .	Este trabajo
pMAKSacB	Plásmido suicida con origen de replicación termosensible, oriT para movilización mediante conjugación, Cm ^R . Utilizado para la obtención de mutantes mediante doble recombinación homóloga. Se elimina mediante selección con sacarosa.	301
pMAKPhoPQGB	Fragmento <i>phoPQGB</i> clonado en el sitio <i>SmaI</i> de pMAKSACB para la obtención de mutantes en el gen <i>phoPQ</i> de <i>K. pneumoniae</i> . Cm ^R Km ^R .	74
pACYC177	Plásmido de bajo número de copia con origen de replicación p15A. Amp ^R Km ^R .	Japanese National Institute of genetics
pACYC177_Kpnhfq	Fragmento <i>hfq</i> de <i>K. pneumoniae</i> , incluyendo su región promotora, clonado en el sitio BamHI / Scal de pACYC177. Km ^R . Vector para la complementación del mutante 52Δ <i>hfq</i> .	Este trabajo
pKOBEG-SacB	Plásmido con origen de replicación termosensible que promueve la recombinación homóloga entre el cromosoma y DNA lineal. Cm ^R .	302
pKNOCK_Km	Plásmido con origen de replicación R6K, utilizado para la construcción de mutantes por inserción. Km ^R .	Biotechniques
pKD4	Ori _y , Km ^R , Amp ^R . El <i>cassette</i> de Km se encuentra flanqueado por secuencias FRT.	303
pGEM-T easy	Vector para el clonaje de productos de PCR obtenidos con <i>Taq</i> polimerasa. Amp ^R .	Promega
pUC-4K	Amp ^R , Km ^R .	Pharmacia

pFLP2	Plásmido que codifica FLP para eliminar <i>cassettes</i> flanqueados por secuencias FRT.	304
pTM100	Plásmido movilizable, de medio número de copia, derivado de pACYC184, usado en estudios de complementación, Cm ^R , Tet ^R .	305
pTM100_<i>lpxO</i>	Fragmento <i>lpxO</i> de <i>K. pneumoniae</i> , incluyendo su región promotora, clonado en el sitio <i>Scal</i> del plásmido pTM100. Vector para la complementación del mutante 52Δ <i>lpxO</i> .	Este trabajo

Tabla 8: Cebadores utilizados en este trabajo

Cebador	Secuencia 5'-3'	Uso	Longitud del amplicón
K2ProcpsF	^a GgaattcCTGCTGGGACAAATTGCCACC	Amplificación de la región promotora del operón CPS para la construcción del plásmido reportero	1.2 Kb
K2ProcpsR	AGATGGATGACCCCGCGATC		
ProPhoPF	^B gggtaccctCTTCATCCGGCAGGCCGAG	Amplificación de la región promotora del gen <i>phoP</i> para la construcción del plásmido reportero.	554 pb
ProPhoPR	^a GgaattccGGCCGCCGAAGAAGGCTTCG		
Pro52145PagPF3	^a GaattcATTACCATTACCGGGAACA	Amplificación de la región promotora del gen <i>pagP</i> para la construcción del plásmido reportero	810 pb
Pro52145PagPR3	TTCCGGACACCAATAACCAT		
PkpnpmrHF	^a GgaattccGCGATGCCGGCCCGGCTAC	Amplificación de la región promotora del operón <i>pmrH</i> para la construcción del plásmido reportero	693 bp
PkpnpmrHR	GGTACCGTCGCATGACGGTTGCCGGTC		
KpnPropmrCF2	^a GgaattcATCCCGATGTCAGAACAACC	Amplificación de la región promotora del gen <i>pmrC</i> para la construcción del	998 pb

KpnPropmrCR2	CATTTCCGCCGGAGAGTAGAG	plásmido reportero	
ProrcsCF	^a GgaattccATGAAGAGCTGGATGCCATC G	Amplificación de la región promotora del gen <i>rscC</i> para la construcción del plásmido reportero	540 pb
ProrcsCR	^B gggtacctGGGGTTCAAAGTTGGGCACC		
ProYojNF	^B gggtacctAGCTTTTCTCCTTCAGCCAG G	Amplificación de la región promotora del gen <i>yojN</i> para la construcción del plásmido reportero	807 pb
ProYojNR	^a GgaattccCGTTTCGAGATCTCCGATTTG G		
ProIpxOF	TGAAGGTGGAGACCTTCGTCTG	Amplificación de la región promotora del gen <i>lpxO</i> para la construcción del plásmido reportero	700 pb
ProIpxOR	^a GgaattccGGACAGGGAAGAATGCCGAA G		
KpnphoPQmutf	GTTCGATAAAGTCGGGCCAG	Construcción del mutante <i>phoPQ</i> en <i>K. pneumoniae</i> .	2.23 Kb
kpnphoPQmutr	^a CCGgaattccGAACATCTCCCGGATATC G		
Kpncomhfq F1	TCCGCGGCTGATTTTCGC	Amplificación del gen <i>hfq</i> para la complementación del mutante <i>52Δhfq</i> .	1.21 Kb

Kpncomhfq R1	^B ggatccGGCGTCATAACGG		
UphfqKpnF	GTCGCCGCCGGGCGAATTCC		
UphfqKpnR	^B CggatccGGATCTTGTAAGATTGCCCC TTAG	Construcción del mutante <i>hfq</i> en <i>K. pneumoniae</i> .	743 pb
DownhfqKpnF	^B CggatccGGACGCCGAATAAGGCCAGTG		712 pb
DownhfqKpnR	GCGTTGATTTTCCGGCGTTG		
UplpxOF	CCCAGGCGCAGATTGCCAG		
UplpxOR	^{BC} CggatccggactcactatagggGCGATA TTGAACGGCCGATG	Construcción del mutante <i>lpxO</i> en <i>K. pneumoniae</i> . Complementación del mutante <i>lpxO</i> .	748 pb
DownlpxOF	^{BC} CggatccggactcactatagggGCGGTA AATGTGGAATGGTCG		952 pb
DownlpxOR	TCCGTTCACTGCGTGCCCTG		
KpnIntlpxOF1	CCGACCATTCCACATTTACC	Construcción de mutantes <i>lpxO</i> en cepas clínicas de <i>K.</i> <i>pneumoniae</i> .	362 pb

KpnIntlpxOR1	TGGGCATCCTCATACCATTT		
UpmutpmrABF	^a GgaattcCAACGATAACGACGGCGGCTG		839 pb
UpmutpmrABR	^e GggtaccCTCCCGCCGCATGCGGGAGAG	Construcción del mutante <i>pmrAB</i> en <i>K. pneumoniae</i> .	
DownmutpmrABF	^e GggtaccCGCTACAGCCCTGAAGGGTCG		
DownmutpmrABR	^D caagcttgTGGCCAAAGCCATTGGCGAG		861 pb
RcsBF	^B CGg gatccCTGACGGTCCGCCGCATGC		1.1 Kb
RcsBinvR	TAATCAGCGTGATCCCGTCG	Construcción del mutante <i>rscB</i> en <i>K. pneumoniae</i> .	
RcsBinvF	GACA ACTGTCCATCCCCGATTC		
RcsBR	^B CGg gatccCCAGCTGGAGAGCTGGGGAG		1.33 Kb
Cassette-F1	^B CGCg gatccGTGTAGGCTGGAGCTGCTT CG	Amplificación del <i>cassette</i> de resistencia a Km presente en el plásmido	1.5 Kb

Cassette-R1	^B CGCggatccCATGGGAATTAGCCATGGT CC	pKD4.	
SalRTpagP F1	ACGTTTACCGATAACGTCGC	RT qPCR	295 pb
SalRTpagP R1	CCAGTCCAAGGCGAAAATTA		
SalRTphoP F1	ACCGTTGTTACGGATAAGCG	RT qPCR	251 pb
SalRTphoP R1	GCTGGCAGGATAAAGTCGAG		
SalRTtonB F1	AGGTTATTGAATTGCCTGCG	<i>Housekeeping</i> RT qPCR	201 pb
SalRTtonB R1	TGGGTTTTGGCTTAGGTTTG		
SalRTrpoD F1	GGTCTGACCATCGAACAGGT	<i>Housekeeping</i> RT qPCR	247 pb
SalRTrpoD R1	ACCAGGTTGCATAGGTGGAG		
SalRTrpoB F1	ACGGTCGCGTATGTCCTATC	<i>Housekeeping</i> RT qPCR	145 pb

SalRTrhoB R1	ATTTCGTCAGTAACCACGCC		
Ye08RTpagP F1	ATACAATGAGCGTCCTTGGG	RT qPCR	204 pb
Ye08RTpagP R1	GCGGTAATACTGGCCGTAAA		
Ye08RTphoP F1	CATTGATGCGACGCAATATC	RT qPCR	275 pb
Ye08RTphoP R1	ATGTTCTGCCAGCAGCTTTT		
Ye08tonBF1	AATGCACCGGTAAATCAGC	<i>Housekeeping</i> RT qPCR	204 pb
Ye08tonBR1	CCTGTTTCACTTCACGCTCA		
Ye08rpoBF1	GTACGCCGGTAGACATCGTT	<i>Housekeeping</i> RT qPCR	147 pb
Ye08rpoBR1	TGGCAACTTCTTCCTGCTTT		
KpnintpagpF1	TCATTACTCCGGAAGATGGC	RT qPCR	132 pb

KpintpagpR1	CCTTTGGCACCGTTAGTGAT		
RTKpintphoPF1	AGCAAAGATTCGCTGATGCT	RT qPCR	100 pb
RTKpintphoPR1	ACGTCCTGTGGGTATTCAGC		
KpnpmrH_LEFT_RtPCR	ATGAAGTCATTACGCCGTCC	RT qPCR	184 pb
KpnpmrH_RIGHT_RtPCR	GCGTAGTGACGGGAATTAT		
kpnintpmrFF	CGGATCCGGCAAAACCCGCCGAGGAGA	RT qPCR	222 pb
kpnintpmrFR	CGGATCCGGCTGTATTTGGAGTCACCGA		
KpnrpoD_LEFT_RtPCR	CCGGAAGACAAAATCCGTAA	<i>Housekeeping</i> RT qPCR	260 pb
KpnrpoD_RIGHT_RtPCR	CGGGTAACGTCGAACTGTTT		
KpntonBF1	AGCCAGAGGTAGTGCCTGAA	<i>Housekeeping</i> RT qPCR	100 pb

KpntonBR1	CTTTTTCTCCGGCTTAGGCT		
KpnrpoBF1	GCGGTTGGTCGTATGAAGTT	<i>Housekeeping</i> RT qPCR	273 pb
KpnrpoBR1	TGGCGTTGATCATATCCTGA		
KpnphoEF1	GAAGCGAAGAAACAGAACGG	<i>Housekeeping</i> RT qPCR	201 pb
KpnphoER1	CATTTTGCGGGTTTCAGAGT		
mLEFTHprt	AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA	<i>Housekeeping</i> RT qPCR	185 pb
mRIGHThprt	TTGCGCTCATCTTAGGCTTT		
Mice Gapdh LEFT	CCCACTAACATCAAATGGGG	<i>Housekeeping</i> RT qPCR	274 pb
Mice Gapdh RIGTH	CCTTCCACAATGCCAAAGTT		
Mice Cxcl1 (Kc) LEFT	GACAGACTGCTCTGATGGCA	RT qPCR	292 pb

Mice Cxcl1 (Kc) RIGTH	TGCACTTCTTTTCGCACAAC		
mouse Tnf LEFT	CCACATCTCCCTCCAGAAAA	RT qPCR	258 pb
mouse Tnf RIGHT	AGGGTCTGGGCCATAGAACT		

a En minúsculas se indica la diana para EcoRI (5'-3' GAATTCC).

b En minúsculas se indica la diana para BamHI (5'-3' GGATCC).

c En cursiva se indica el sitio T7.

^D En minúsculas se indica la diana para HindIII (5'-3' CAAGCTTG).

e En minúsculas se indica la diana para KpnI (5'-3' GGTACC).

Bibliografía

1. Podschun, R. & Ullmann, U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol Rev* **11**, 589-603 (1998).
2. Sahly, H. & Podschun, R. Clinical, bacteriological, and serological aspects of *Klebsiella* infections and their spondylarthropathic sequelae. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* **4**, 393-399 (1997).
3. Orskov, F. & Orskov I. Serotyping of *Klebsiella*. *Methods in microbiology* **14**, 143-164 (1984).
4. Carpenter, J. L. *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev Infect. Dis.* **12**, 672-682 (1990).
5. Podschun, R., Sievers, D., Fischer, A. & Ullmann, U. Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections. *J Infect Dis.* **168**, 1415-1421 (1993).
6. Schaberg, D. R., Weinstein, R. A. & Stamm, W. E. Epidemics of nosocomial urinary tract infection caused by multiply resistant gram-negative bacilli: epidemiology and control. *J Infect. Dis.* **133**, 363-366 (1976).
7. La Force, F. M. Community-acquired lower respiratory tract infections. Prevention and cost-control strategies. *Am. J Med.* **78**, 52-57 (1985).
8. Sahly, H. & Podschun, R. Clinical, bacteriological, and serological aspects of *Klebsiella* infections and their spondylarthropathic sequelae. *Clin. Diagn. Lab Immunol* **4**, 393-399 (1997).
9. Power, M. R., Peng, Y., Maydanski, E., Marshall, J. S. & Lin, T. J. The development of early host response to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is critically dependent on myeloid differentiation factor 88 in mice. *J. Biol. Chem.* **279**, 49315-49322 (2004).
10. Hervas, J. A., Alomar, A., Salva, F., Reina, J. & Benedi, V. J. Neonatal sepsis and meningitis in Mallorca, Spain, 1977-1991. *Clin. Infect. Dis.* **16**, 719-724 (1993).
11. Timko, J. Changes of antimicrobial resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella spp.* strains. *J. Infect. Chemother.* **10**, 212-215 (2004).

12. Nordmann, P., Cuzon, G. & Naas, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* **9**, 228-236 (2009).
13. Sadowski, P. L., Peterson, B. C., Gerding, D. N. & Cleary, P. P. Physical characterization of ten R plasmids obtained from an outbreak of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**, 616-624 (1979).
14. Jacoby, G. A. & Medeiros, A. A. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1697-1704 (1991).
15. Philippon, A., Labia, R. & Jacoby, G. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1131-1136 (1989).
16. Munoz-Price LS1, P. L. B. R. S. M. D. G. C. M. C. G. G. J. G. M. H. M. K. K. L. D. M. J. N. P. P. J. P. D. P. J. V. M. W. H. W. N. Q. JP. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet* **13**. 2013. Ref Type: Journal (Full)
17. Tumbarello, M. *et al.* Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin. Infect. Dis.* **55**, 943-950 (2012).
18. Brun-Buisson, C. *et al.* Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* **2**, 302-306 (1987).
19. Klemm, P., Jorgensen, J. B., Van Die, I., de Ree, H. & Bergmans, H. The fim genes responsible for synthesis of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*, cloning and genetic organization. *Mol. Gen. Genet.* **199**, 410-414 (1985).
20. Struve, C., Bojer, M. & Krogfelt, K. A. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect. Immun* **76**, 4055-4065 (2008).
21. Kline, K. A., Dodson, K. W., Caparon, M. G. & Hultgren, S. J. A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends Microbiol* **18**, 224-232 (2010).
22. Tarkkanen, A.-M. *et al.* Type V collagen as the target for type-3 fimbriae, enterobacterial adherence organelles. *Mol Microbiol* **4**, 1353-1361 (1990).
23. Struve, C., Bojer, M. & Krogfelt, K. A. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infect. Immun.* **77**, 5016-5024 (2009).

24. Schroll, C., Barken, K. B., Krogfelt, K. A. & Struve, C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol.* **10**, 179 (2010).
25. Struve, C., Bojer, M. & Krogfelt, K. A. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect. Immun.* **76**, 4055-4065 (2008).
26. Allen, B. L., Gerlach, G. F. & Clegg, S. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol.* **173**, 916-920 (1991).
27. Koebnik, R., Locher, K. P. & Van, G. P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* **37**, 239-253 (2000).
28. Buchanan, S. K. Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 455-461 (1999).
29. Lin, J., Huang, S. & Zhang, Q. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes. Infect.* **4**, 325-331 (2002).
30. Poolman, J. T. Bacterial outer membrane protein vaccines. The meningococcal example. *Adv. Exp. Med. Biol.* **397**, 73-77 (1996).
31. Weiser, J. N. & Gotschlich, E. C. The role of outer membrane protein A in *Escherichia coli* K-1 pathogenesis. *Trans. Assoc. Am. Physicians* **104**, 278-284 (1991).
32. Weiser, J. N. & Gotschlich, E. C. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. *Infect. Immun* **59**, 2252-2258 (1991).
33. Llobet, E., March, C., Gimenez, P. & Bengoechea, J. A. *Klebsiella pneumoniae* OmpA confers resistance to antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 298-302 (2009).
34. March, C. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein A is required to prevent the activation of airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 9956-9967 (2011).
35. Cano, V., Moranta, D., Llobet-Brossa, E., Bengoechea, J. A. & Garmendia, J. *Klebsiella pneumoniae* triggers a cytotoxic effect on airway epithelial cells. *BMC Microbiol.* **9**, 156 (2009).
36. Cortes, G., Alvarez, D., Saus, C. & Alberti, S. Role of lung epithelial cells in defense against *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Infect Immun* **70**, 1075-1080 (2002).

37. Cortes, G. *et al.* Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect. Immun.* **70**, 2583-2590 (2002).
38. Sahly, H. *et al.* Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **68**, 6744-6749 (2000).
39. Mizuta, K. *et al.* Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. *Infect. Immun.* **40**, 56-61 (1983).
40. Tsay, R. W., Siu, L. K., Fung, C. P. & Chang, F. Y. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Arch. Intern. Med.* **162**, 1021-1027 (2002).
41. Podschun, R. & Ullmann, U. *Klebsiella* Capsular Type-K7 in Relation to Toxicity, Susceptibility to Phagocytosis and Resistance to Serum. *Journal of Medical Microbiology* **36**, 250-254 (1992).
42. Podschun, R., Penner, I. & Ullmann, U. Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. *Microb Pathog* **13**, 371-379 (1992).
43. Alvarez, D., Merino, S., Tomas, J. M., Benedi, V. J. & Alberti, S. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Infect. Immun.* **68**, 953-955 (2000).
44. de, A. B. *et al.* C3 promotes clearance of *Klebsiella pneumoniae* by A549 epithelial cells. *Infect. Immun.* **72**, 1767-1774 (2004).
45. Favre-Bonte, S., Joly, B. & Forestier, C. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. *Infect. Immun.* **67**, 554-561 (1999).
46. Oelschlaeger, T. A. & Tall, B. D. Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. *Infect. Immun.* **65**, 2950-2958 (1997).
47. Llobet, E., Tomas, J. M. & Bengoechea, J. A. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology* **154**, 3877-3886 (2008).
48. Moranta, D. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of b-defensins by airway epithelial cells. *Infect. Immun.* **78**, 1135-1146 (2010).
49. Frank, C. G. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* targets an EGF receptor-dependent pathway to subvert inflammation. *Cell Microbiol.* (2013).

50. Madigan, M. T. M. J. M. P. J. *Brock Biology of microorganisms*. Prentice-Hall, (2000).
51. Kita, H. & Nikaido, H. Structure of cell wall lipopolysaccharide from *salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* **113**, 672-679 (1973).
52. Funahara, Y. & Nikaido, H. Asymmetric localization of lipopolysaccharides on the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* **141**, 1463-1465 (1980).
53. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593-656 (2003).
54. Raetz, C. R. & Whitfield, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 635-700 (2002).
55. March Aguiló, C. Disección molecular de la interacción entre *Klebsiella pneumoniae* y el sistema inmune innato. 2012. Ref Type: Thesis/Dissertation
56. Hansen, D. S. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 56-62 (1999).
57. Alberti, S. *et al.* C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. *Infect. Immun.* **61**, 852-860 (1993).
58. Alberti, S. *et al.* Analysis of complement C3 deposition and degradation on *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* **64**, 4726-4732 (1996).
59. Izquierdo, L. *et al.* The *Klebsiella pneumoniae wabG* gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence. *J. Bacteriol.* **185**, 7213-7221 (2003).
60. Shankar-Sinha, S. *et al.* The *Klebsiella pneumoniae* O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia. *Infect. Immun.* **72**, 1423-1430 (2004).
61. Holst, O. & Brade, H. *Bacterial endotoxic lipopolysaccharides. Molecular biochemistry and cellular biology*. Morrison, D. & Ryan, J. L. (eds.), pp. 135-170 (CRC Press, Boca Raton, 1992).
62. Vinogradov, E. & Perry, M. B. Structural analysis of the core region of the lipopolysaccharides from eight serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *Carbohydr. Res.* **335**, 291-296 (2001).
63. Vinogradov, E. *et al.* Structures of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*. Elucidation of the structure of the linkage region between core and polysaccharide O chain and identification of the residues at the

- non-reducing termini of the O chains. *J Biol. Chem.* **277**, 25070-25081 (2002).
64. Frirdich, E. & Whitfield, C. Characterization of Gla(KP), a UDP-galacturonic acid C4-epimerase from *Klebsiella pneumoniae* with extended substrate specificity. *J. Bacteriol.* **187**, 4104-4115 (2005).
 65. Frirdich, E., Bouwman, C., Vinogradov, E. & Whitfield, C. The role of galacturonic acid in outer membrane stability in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **280**, 27604-27612 (2005).
 66. Fresno, S. *et al.* The ionic interaction of *Klebsiella pneumoniae* K2 capsule and core lipopolysaccharide. *Microbiology* **152**, 1807-1818 (2006).
 67. Fresno, S. *et al.* A Second Galacturonic Acid Transferase is Required for Core Lipopolysaccharide Biosynthesis and Complete Capsule Association to the Cell Surface in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* (2006).
 68. Regue, M. *et al.* The incorporation of glucosamine into enterobacterial core lipopolysaccharide: two enzymatic steps are required. *J. Biol. Chem.* **280**, 36648-36656 (2005).
 69. Regue, M. *et al.* A second outer-core region in *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **187**, 4198-4206 (2005).
 70. Poltorak, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088 (1998).
 71. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).
 72. Helander, I. M. *et al.* Characterization of lipopolysaccharides of polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3. *Eur J Biochem* **237**, 272-278. *European Journal of Biochemistry* **237**, (1996).
 73. Clements, A. *et al.* Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. *J. Biol. Chem.* **282**, 15569-15577 (2007).
 74. Llobet, E., Campos, M. A., Gimenez, P., Moranta, D. & Bengoechea, J. A. Analysis of the networks controlling the antimicrobial peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infect. Immun.* **79**, 3718-3732 (2011).
 75. Nizet, V. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr. Issues Mol. Biol.* **8**, 11-26 (2006).

76. Raetz, C. R. H. Biochemistry of endotoxins. *Annual review in Biochemistry* **59**, 129-170 (1990).
77. Gunn, J. S. *et al.* PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* **27**, 1171-1182 (1998).
78. Guo, L. *et al.* Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phop-phoQ*. *Science* **276**, 250-253 (1997).
79. Groisman, E. A. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ
64. *J. Bacteriol.* **183**, 1835-1842 (2001).
80. Gibbons, H. S., Kalb, S. R., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. Role of Mg²⁺ and pH in the modification of Salmonella lipid A after endocytosis by macrophage tumour cells
81. *Mol. Microbiol.* **55**, 425-440 (2005).
81. Bader, M. W. *et al.* Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* **122**, 461-472 (2005).
82. Ray, B. L. & Raetz, C. R. The biosynthesis of gram-negative endotoxin. A novel kinase in *Escherichia coli* membranes that incorporates the 4'-phosphate of lipid A
224. *J. Biol. Chem.* **262**, 1122-1128 (1987).
83. Vorachek-Warren, M. K., Ramirez, S., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. A triple mutant of *Escherichia coli* lacking secondary acyl chains on lipid A. *J. Biol. Chem.* **277**, 14194-14205 (2002).
84. Brozek, K. A. & Raetz, C. R. Biosynthesis of lipid A in *Escherichia coli*. Acyl carrier protein-dependent incorporation of laurate and myristate
195. *J. Biol. Chem.* **265**, 15410-15417 (1990).
85. Raetz, C. R., Reynolds, C. M., Trent, M. S. & Bishop, R. E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 295-329 (2007).
86. Helander, I. M., Kilpeläinen, I. & Vaara, M. Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin-resistant *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium*: a ³¹P-NMR Study. *Molecular Microbiology* **11**, 481-487 (1994).
87. Nummilla, K., Kilpeläinen, I., Zähringer, U., Vaara, M. & Helander, I. M. Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of *Escherichia coli* are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A. *Molecular Microbiology* **16**, 271-278 (1995).
88. Soncini, F. C. & Groisman, E. A. Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *Journal of Bacteriology* **178**, 6796-6801 (1996).

89. Gunn, J. S. & Miller, S. I. Pho-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *Journal of Bacteriology* **178**, 6857-6864 (1996).
90. Breazeale, S. D., Ribeiro, A. A. & Raetz, C. R. Oxidative decarboxylation of UDP-glucuronic acid in extracts of polymyxin-resistant *Escherichia coli*. Origin of lipid a species modified with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose 111. *J. Biol. Chem.* **277**, 2886-2896 (2002).
91. Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M. & Reeves, P. R. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *Journal of Bacteriology* **178**, 4885-4893 (1996).
92. Breazeale, S. D., Ribeiro, A. A., McClerren, A. L. & Raetz, C. R. A formyltransferase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* and the modification of lipid A with 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose. Identification and function of UDP-4-deoxy-4-formamido-L-arabinose 78. *J. Biol. Chem.* **280**, 14154-14167 (2005).
93. Trent, M. S., Ribeiro, A. A., Lin, S., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J. Biol. Chem.* **276**, 43122-43131 (2001).
94. Yan, A., Guan, Z. & Raetz, C. R. An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* 51. *J. Biol. Chem.* **282**, 36077-36089 (2007).
95. March, C. *et al.* Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of *Klebsiella pneumoniae* with Phagocytes. *PLoS. ONE.* **8**, e56847 (2013).
96. Lee, H., Hsu, F. F., Turk, J. & Groisman, E. A. The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **186**, 4124-4133 (2004).
97. Beceiro, A. *et al.* Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the *pmrAB* two-component regulatory system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3370-3379 (2011).
98. Tamayo, R. *et al.* Identification of *cptA*, a PmrA-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium lipopolysaccharide core. *J. Bacteriol.* **187**, 3391-3399 (2005).

99. Gunn, J. S. The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol.* **16**, 284-290 (2008).
100. Reynolds, C. M., Kalb, S. R., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. A phosphoethanolamine transferase specific for the outer 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid residue of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. Identification of the eptB gene and Ca²⁺ hypersensitivity of an eptB deletion mutant
75. *J. Biol. Chem.* **280**, 21202-21211 (2005).
101. Brozek, K. A., Bulawa, C. E. & Raetz, C. R. Biosynthesis of lipid A precursors in *Escherichia coli*. A membrane-bound enzyme that transfers a palmitoyl residue from a glycerophospholipid to lipid X
221. *J. Biol. Chem.* **262**, 5170-5179 (1987).
102. Guo, L. *et al.* Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* **95**, 189-98 (1998).
103. Zhou, Z. *et al.* Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation
114. *J. Biol. Chem.* **276**, 43111-43121 (2001).
104. Preston, A. *et al.* *Bordetella bronchiseptica* PagP is a Bvg-regulated lipid A palmitoyl transferase that is required for persistent colonization of the mouse respiratory tract. *Mol. Microbiol.* **48**, 725-736 (2003).
105. Bishop, R. E. *et al.* Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *EMBO J.* **19**, 5071-5080 (2000).
106. Bishop, R. E. The lipid A palmitoyltransferase PagP: molecular mechanisms and role in bacterial pathogenesis
15. *Mol. Microbiol.* **57**, 900-912 (2005).
107. Robey, M., O'Connell, W. & Cianciotto, N. P. Identification of *Legionella pneumophila rcp*, a *pagP*-like gene that confers resistance to cationic antimicrobial peptides and promotes intracellular infection. *Infect. Immun.* **69**, 4276-4286 (2001).
108. Reines, M. *et al.* Molecular basis of *Yersinia enterocolitica* temperature-dependent resistance to antimicrobial peptides. *J. Bacteriol.* **194**, 3173-3188 (2012).
109. Gibbons, H. S., Lin, S., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. Oxygen requirement for the biosynthesis of the S-2-hydroxymyristate moiety in *Salmonella typhimurium* lipid A. Function of LpxO, A new Fe²⁺/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homologue. *J. Biol. Chem.* **275**, 32940-32949 (2000).

110. MacArthur, I., Jones, J. W., Goodlett, D. R., Ernst, R. K. & Preston, A. Role of pagL and lpxO in *Bordetella bronchiseptica* lipid A biosynthesis. *J. Bacteriol.* **193**, 4726-4735 (2011).
111. Sforza, S. *et al.* Determination of fatty acid positions in native lipid A by positive and negative electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **39**, 378-383 (2004).
112. Gibbons, H. S., Reynolds, C. M., Guan, Z. & Raetz, C. R. An inner membrane dioxygenase that generates the 2-hydroxymyristate moiety of *Salmonella* lipid A. *Biochemistry* **47**, 2814-2825 (2008).
113. Murata, T., Tseng, W., Guina, T., Miller, S. I. & Nikaido, H. PhoPQ-mediated regulation produces a more robust permeability barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *J. Bacteriol.* **189**, 7213-7222 (2007).
114. Moreira, C. G. *et al.* Virulence and stress-related periplasmic protein (VisP) in bacterial/host associations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **110**, 1470-1475 (2013).
115. Reynolds, C. M. *et al.* An outer membrane enzyme encoded by *Salmonella typhimurium* lpxR that removes the 3'-acyloxyacyl moiety of lipid A. *J. Biol. Chem.* **281**, 21974-21987 (2006).
116. Trent, M. S., Pabich, W., Raetz, C. R. & Miller, S. I. A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **276**, 9083-9092 (2001).
117. Kawasaki, K., Ernst, R. K. & Miller, S. I. Inhibition of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* lipopolysaccharide deacylation by aminoarabinose membrane modification. *J. Bacteriol.* **187**, 2448-2457 (2005).
118. Reines, M. *et al.* Deciphering the acylation pattern of *Yersinia enterocolitica* lipid A. *PLoS. Pathog.* **8**, e1002978 (2012).
119. Hajjar, A. M., Ernst, R. K., Tsai, J. H., Wilson, C. B. & Miller, S. I. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat. Immunol.* **3**, 354-359 (2002).
120. Kawasaki, K., Ernst, R. K. & Miller, S. I. 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* **279**, 20044-20048 (2004).
121. Reinés Bennàssar, M. d. M. Modulación de la estructura del lípido A como estrategia de virulencia en *Yersinia enterocolitica*. 20-6-0012. Ref Type: Thesis/Dissertation

122. Geurtsen, J., Steeghs, L., Hove, J. T., van der, L. P. & Tommassen, J. Dissemination of lipid A deacylases (pagL) among gram-negative bacteria: identification of active-site histidine and serine residues. *J Biol. Chem.* **280**, 8248-8259 (2005).
123. Beier, D. & Gross, R. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr. Opin. Microbiol* **9**, 143-152 (2006).
124. Ulrich, L. E., Koonin, E. V. & Zhulin, I. B. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* **13**, 52-56 (2005).
125. Martinez, M. A., Das, K., Saikolappan, S., Materon, L. A. & Dhandayuthapani, S. A serine/threonine phosphatase encoded by MG_207 of *Mycoplasma genitalium* is critical for its virulence. *BMC. Microbiol* **13**, 44 (2013).
126. Needham, B. D. & Trent, M. S. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 467-481 (2013).
127. Roland, K. L., Martin, L. E., Esther, C. R. & Spitznagel, J. K. Spontaneous pmrA mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 define a new two-component regulatory system with a possible role in virulence. *J Bacteriol.* **175**, 4154-4164 (1993).
128. Tamayo, R., Ryan, S. S., McCoy, A. J. & Gunn, J. S. Identification and genetic characterization of PmrA-regulated genes and genes involved in polymyxin B resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect. Immun* **70**, 6770-6778 (2002).
129. Marchal, K. *et al.* In silico identification and experimental validation of PmrAB targets in *Salmonella typhimurium* by regulatory motif detection. *Genome Biol.* **5**, R9 (2004).
130. Wosten, M. M. & Groisman, E. A. Molecular characterization of the PmrA regulon. *J Biol. Chem.* **274**, 27185-27190 (1999).
131. Aguirre, A., Lejona, S., Vescovi, E. G. & Soncini, F. C. Phosphorylated PmrA interacts with the promoter region of *ugd* in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol.* **182**, 3874-3876 (2000).
132. Flamez, C., Ricard, I., Arafah, S., Simonet, M. & Marceau, M. Two-component system regulon plasticity in bacteria: a concept emerging from phenotypic analysis of *Yersinia pseudotuberculosis* response regulator mutants. *Adv. Exp. Med. Biol.* **603**, 145-155 (2007).
133. McPhee, J. B. *et al.* Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg²⁺-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **188**, 3995-4006 (2006).

134. Moskowitz, S. M., Ernst, R. K. & Miller, S. I. PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J. Bacteriol.* **186**, 575-579 (2004).
135. Raetz, C. R. Regulated covalent modifications of lipid A 115. *J. Endotoxin. Res.* **7**, 73-78 (2001).
136. Hyytiainen, H., Sjoblom, S., Palomaki, T., Tuikkala, A. & Tapio, P. E. The PmrA-PmrB two-component system responding to acidic pH and iron controls virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Mol Microbiol* **50**, 795-807 (2003).
137. Zusman, T. *et al.* The response regulator PmrA is a major regulator of the icm/dot type IV secretion system in *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *Mol Microbiol* **63**, 1508-1523 (2007).
138. Mohapatra, N. P. *et al.* Identification of an orphan response regulator required for the virulence of *Francisella* spp. and transcription of pathogenicity island genes 28. *Infect. Immun.* **75**, 3305-3314 (2007).
139. Mitrophanov, A. Y., Jewett, M. W., Hadley, T. J. & Groisman, E. A. Evolution and dynamics of regulatory architectures controlling polymyxin B resistance in enteric bacteria 15. *PLoS. Genet.* **4**, e1000233 (2008).
140. Zhou, Z., Lin, S., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. Lipid A modifications characteristic of *Salmonella typhimurium* are induced by NH_4VO_3 in *Escherichia coli* K12. Detection of 4-amino-4-deoxy- L-arabinose, phosphoethanolamine and palmitate. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 18503-18514 (1999).
141. Wosten, M. M., Kox, L. F., Chamnongpol, S., Soncini, F. C. & Groisman, E. A. A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell* **103**, 113-125 (2000).
142. Chamnongpol, S., Dodson, W., Cromie, M. J., Harris, Z. L. & Groisman, E. A. Fe(III)-mediated cellular toxicity. *Mol Microbiol* **45**, 711-719 (2002).
143. Kato, A. & Groisman, E. A. Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor 42. *Genes Dev.* **18**, 2302-2313 (2004).
144. Kox, L. F., Wösten, M. M. & Groisman, E. A. A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *EMBO Journal* **19**, 1861-1872 (2000).
145. Kato, A., Latifi, T. & Groisman, E. A. Closing the loop: the PmrA/PmrB two-component system negatively controls expression of its

- posttranscriptional activator PmrD
 55. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 4706-4711 (2003).
146. Winfield, M. D., Latifi, T. & Groisman, E. A. Transcriptional regulation of the 4-amino-4-deoxy-L-arabinose biosynthetic genes in *Yersinia pestis*. *J. Biol. Chem.* **280**, 14765-14772 (2005).
 147. Kier, L. D., Weppelman, R. M. & Ames, B. N. Regulation of nonspecific acid phosphatase in Salmonella: phoN and phoP genes. *J Bacteriol.* **138**, 155-161 (1979).
 148. Castelli, M. E., Garcia, V. E. & Soncini, F. C. The phosphatase activity is the target for Mg²⁺ regulation of the sensor protein PhoQ in Salmonella. *J Biol. Chem.* **275**, 22948-22954 (2000).
 149. Vescovi, E. G., Soncini, F. C. & Groisman, E. A. Mg²⁺ as an extracellular signal: Environmental regulation of Salmonella virulence. *Cell* **84**, 165-174 (1996).
 150. Vescovi, E. G., Ayala, Y. M., Di, C. E. & Groisman, E. A. Characterization of the bacterial sensor protein PhoQ. Evidence for distinct binding sites for Mg²⁺ and Ca²⁺. *J. Biol. Chem.* **272**, 1440-1443 (1997).
 151. puche Aranda, C. M., Swanson, J. A., Loomis, W. P. & Miller, S. I. Salmonella typhimurium activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* **89**, 10079-10083 (1992).
 152. Kato, A., Tanabe, H. & Utsumi, R. Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in Escherichia coli K-12: identification of extracellular Mg²⁺-responsive promoters. *J Bacteriol.* **181**, 5516-5520 (1999).
 153. Soncini, F. C., Vescovi, E. G. & Groisman, E. A. Transcriptional autoregulation of the Salmonella typhimurium phoPQ operon. *J Bacteriol.* **177**, 4364-4371 (1995).
 154. Macfarlane, E. L., Kwasnicka, A. & Hancock, R. E. Role of Pseudomonas aeruginosa PhoP-phoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology* **146 (Pt 10)**, 2543-2554 (2000).
 155. Soncini, F. C., Garcia, V. E., Solomon, F. & Groisman, E. A. Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. *J. Bacteriol.* **178**, 5092-5099 (1996).
 156. Ernst, R. K. *et al.* Unique lipid a modifications in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the airways of patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **196**, 1088-1092 (2007).

157. Kawasaki, K., Ernst, R. K. & Miller, S. I. Deacylation and palmitoylation of lipid A by Salmonellae outer membrane enzymes modulate host signaling through Toll-like receptor 4. *J. Endotoxin. Res.* **10**, 439-444 (2004).
158. Tanamoto, K. & Azumi, S. Salmonella-type heptaacylated lipid A is inactive and acts as an antagonist of lipopolysaccharide action on human line cells. *J Immunol* **164**, 3149-3156 (2000).
159. Groisman, E. A., Kayser, J. & Soncini, F. C. Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments. *J Bacteriol* **179**, 7040-7045 (1997).
160. Stover, A. G. *et al.* Structure-activity relationship of synthetic toll-like receptor 4 agonists. *J Biol. Chem.* **279**, 4440-4449 (2004).
161. Smith, R. L. & Maguire, M. E. Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. *Mol Microbiol* **28**, 217-226 (1998).
162. Quintela, J. C., de Pedro, M. A., Zollner, P., Allmaier, G. & Garcia-Del, P. F. Peptidoglycan structure of Salmonella typhimurium growing within cultured mammalian cells. *Mol Microbiol* **23**, 693-704 (1997).
163. Pegues, D. A., Hantman, M. J., Behlau, I. & Miller, S. I. Phop/phoq transcriptional repression of salmonella typhimurium invasion genes: evidence for a role in protein secretion. *Molecular Microbiology* **17**, 169-181 (1995).
164. Brill, J. A., Quinlan-Walsh, C. & Gottesman, S. Fine-structure mapping and identification of two regulators of capsule synthesis in Escherichia coli K-12
116. *J. Bacteriol.* **170**, 2599-2611 (1988).
165. Gottesman, S., Trisler, P. & Torres Cabassa, A. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulator genes. *Journal of Bacteriology* **162**, 1111-1119 (1985).
166. Stout, V. & Gottesman, S. RcsB and RcsC: a two component regulator of capsule synthesis in {*Escherichia coli*}. *Journal of Bacteriology* **172**, 659-669 (1990).
167. Erickson, K. D. & Detweiler, C. S. The Rcs phosphorelay system is specific to enteric pathogens/commensals and activates ydel, a gene important for persistent Salmonella infection of mice. *Mol Microbiol* **62**, 883-894 (2006).
168. Majdalani, N. & Gottesman, S. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system
28. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 379-405 (2005).

169. Huang, Y. H., Ferrieres, L. & Clarke, D. J. The role of the Rcs phosphorelay in Enterobacteriaceae. *Res. Microbiol* **157**, 206-212 (2006).
170. Carballes, F., Bertrand, C., Bouche, J. P. & Cam, K. Regulation of Escherichia coli cell division genes ftsA and ftsZ by the two-component system rcsC-rcsB. *Mol Microbiol* **34**, 442-450 (1999).
171. Arricau, N. *et al.* The RcsB-RcsC regulatory system of Salmonella typhi differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Mol Microbiol* **29**, 835-850 (1998).
172. Cano, D. A., Dominguez-Bernal, G., Tierrez, A., Garcia-Del, P. F. & Casadesus, J. Regulation of capsule synthesis and cell motility in Salmonella enterica by the essential gene igaA. *Genetics* **162**, 1513-1523 (2002).
173. Francez-Charlot, A. *et al.* RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the flhDC operon in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **49**, 823-832 (2003).
174. Latasa, C. *et al.* Salmonella biofilm development depends on the phosphorylation status of RcsB. *J Bacteriol.* **194**, 3708-3722 (2012).
175. Virlogeux, I., Waxin, H., Ecobichon, C., Lee, J. O. & Popoff, M. Y. Characterization of the rcsA and rcsB genes from Salmonella typhi: rcsB through tvfA is involved in regulation of Vi antigen synthesis. *Journal of Bacteriology* **178**, 1691-1698 (1996).
176. Clavel, T., Lazzaroni, J. C., Vianney, A. & Portalier, R. Expression of the tolQRA genes of Escherichia coli K-12 is controlled by the RcsC sensor protein involved in capsule synthesis. *Molecular Microbiology* **19**, 19-25 (1996).
177. valos-Garcia, M., Conter, A., Toesca, I., Gutierrez, C. & Cam, K. Regulation of osmC gene expression by the two-component system rcsB-rcsC in Escherichia coli. *J Bacteriol.* **183**, 5870-5876 (2001).
178. Belas, R., Schneider, R. & Melch, M. Characterization of Proteus mirabilis precocious swarming mutants: identification of rsbA, encoding a regulator of swarming behavior. *J Bacteriol.* **180**, 6126-6139 (1998).
179. Gygi, D. *et al.* A cell-surface polysaccharide that facilitates rapid population migration by differentiated swarm cells of Proteus mirabilis. *Molecular Microbiology* **17**, 1167-1175 (1995).
180. Chen, M. H. *et al.* Characterization of the RcsC-->YojN-->RcsB phosphorelay signaling pathway involved in capsular synthesis in Escherichia coli. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 2364-2367 (2001).
181. Harshey, R. M. & Matsuyama, T. Dimorphic transition in Escherichia coli and Salmonella typhimurium: surface-induced differentiation into

- hyperflagellate swarmer cells. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* **91**, 8631-8635 (1994).
182. Sledjeski, D. D. & Gottesman, S. Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 75. *J. Bacteriol.* **178**, 1204-1206 (1996).
 183. Hagiwara, D. *et al.* Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**, 5735-5746 (2003).
 184. Laubacher, M. E. & Ades, S. E. The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *J Bacteriol.* **190**, 2065-2074 (2008).
 185. Callewaert, L., Vanoirbeek, K. G., Lurquin, I., Michiels, C. W. & Aertsen, A. The Rcs two-component system regulates expression of lysozyme inhibitors and is induced by exposure to lysozyme. *J Bacteriol.* **191**, 1979-1981 (2009).
 186. Farris, C., Sanowar, S., Bader, M. W., Pfuetzner, R. & Miller, S. I. Antimicrobial peptides activate the Rcs regulon through the outer membrane lipoprotein RcsF 5. *J. Bacteriol.* **192**, 4894-4903 (2010).
 187. Parker, C. T. *et al.* Role of the rfaG and rfaP Genes in Determining the Lipopolysaccharide Core Structure and Cell Surface Properties of *Escherichia-Coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **174**, 2525-2538 (1992).
 188. Shiba, Y. *et al.* Activation of the Rcs signal transduction system is responsible for the thermosensitive growth defect of an *Escherichia coli* mutant lacking phosphatidylglycerol and cardiolipin. *J Bacteriol.* **186**, 6526-6535 (2004).
 189. Sailer, F. C., Meberg, B. M. & Young, K. D. beta-Lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* **226**, 245-249 (2003).
 190. Majdalani, N., Heck, M., Stout, V. & Gottesman, S. Role of RcsF in signaling to the Rcs phosphorelay pathway in *Escherichia coli* 27. *J. Bacteriol.* **187**, 6770-6778 (2005).
 191. Takeda, S., Fujisawa, Y., Matsubara, M., Aiba, H. & Mizuno, T. A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC --> YojN --> RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Mol Microbiol* **40**, 440-450 (2001).
 192. Mouslim, C., Latifi, T. & Groisman, E. A. Signal-dependent requirement for the co-activator protein RcsA in transcription of the RcsB-regulated *ugd* gene 51. *J. Biol. Chem.* **278**, 50588-50595 (2003).

193. Tierrez, A. & Garcia-Del, P. F. The Salmonella membrane protein IgaA modulates the activity of the RcsC-YojN-RcsB and PhoP-PhoQ regulons. *J Bacteriol.* **186**, 7481-7489 (2004).
194. Majdalani, N., Hernandez, D. & Gottesman, S. Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA 49. *Mol. Microbiol.* **46**, 813-826 (2002).
195. Zhang, A. *et al.* Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq 40. *Mol. Microbiol.* **50**, 1111-1124 (2003).
196. Valentin-Hansen, P., Eriksen, M. & Udesen, C. The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol* **51**, 1525-1533 (2004).
197. Franze de Fernandez, M. T., Eoyang, L. & August, J. T. Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature* **219**, 588-590 (1968).
198. Sharma, C. M., Darfeuille, F., Plantinga, T. H. & Vogel, J. A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes Dev.* **21**, 2804-2817 (2007).
199. Vecerek, B., Moll, I. & Blasi, U. Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *EMBO J* **26**, 965-975 (2007).
200. Prevost, K. *et al.* The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Mol Microbiol* **64**, 1260-1273 (2007).
201. Urban, J. H. & Vogel, J. Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate glmS mRNA translation. *PLoS. Biol.* **6**, e64 (2008).
202. Gottesman, S. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria
32. *Trends Genet.* **21**, 399-404 (2005).
203. Brantl, S. Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr. Opin. Microbiol* **10**, 102-109 (2007).
204. Wagner, E. G., Altuvia, S. & Romby, P. Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv. Genet.* **46**, 361-398 (2002).
205. Aiba, H. Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr. Opin. Microbiol* **10**, 134-139 (2007).
206. Brennan, R. G. & Link, T. M. Hfq structure, function and ligand binding. *Curr. Opin. Microbiol* **10**, 125-133 (2007).

207. De, L. N. & Gottesman, S. The Crp-activated small noncoding regulatory RNA CyaR (RyeE) links nutritional status to group behavior. *J Bacteriol.* **191**, 461-476 (2009).
208. Ross, J. A., Ellis, M. J., Hossain, S. & Haniford, D. B. Hfq restructures RNA-IN and RNA-OUT and facilitates antisense pairing in the Tn10/IS10 system. *RNA.* **19**, 670-684 (2013).
209. Waters, L. S. & Storz, G. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**, 615-628 (2009).
210. Chao, Y. & Vogel, J. The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol* **13**, 24-33 (2010).
211. Sittka, A., Pfeiffer, V., Tedin, K. & Vogel, J. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of Salmonella typhimurium. *Mol. Microbiol.* **63**, 193-217 (2007).
212. Ansong, C. *et al.* Global systems-level analysis of Hfq and SmpB deletion mutants in Salmonella: implications for virulence and global protein translation. *PLoS. ONE.* **4**, e4809 (2009).
213. Sittka, A. *et al.* Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS. Genet.* **4**, e1000163 (2008).
214. Hansen, A. M. & Kaper, J. B. Hfq affects the expression of the LEE pathogenicity island in enterohaemorrhagic Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* **73**, 446-465 (2009).
215. Shakhnovich, E. A., Davis, B. M. & Waldor, M. K. Hfq negatively regulates type III secretion in EHEC and several other pathogens. *Mol Microbiol* **74**, 347-363 (2009).
216. Sonnleitner, E. *et al.* Detection of small RNAs in Pseudomonas aeruginosa by RNomics and structure-based bioinformatic tools. *Microbiology* **154**, 3175-3187 (2008).
217. Hammer, B. K. & Bassler, B. L. Regulatory small RNAs circumvent the conventional quorum sensing pathway in pandemic Vibrio cholerae. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* **104**, 11145-11149 (2007).
218. Kulesus, R. R., az-Perez, K., Slechta, E. S., Eto, D. S. & Mulvey, M. A. Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic Escherichia coli. *Infect. Immun* **76**, 3019-3026 (2008).
219. Perez-Gutierrez, C., Llobet, E., Llompert, C. M., Reines, M. & Bengoechea, J. A. Role of lipid A acylation in Yersinia enterocolitica virulence. *Infect. Immun.* **78**, 2768-2781 (2010).
220. Ganesan, S., Comstock, A. T. & Sajjan, U. S. Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue Barriers.* **1**, e24997 (2013).

221. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. **34**, 637-650 (2011).
222. Lee, M. S. & Kim, Y. J. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu. Rev Biochem* **76**, 447-480 (2007).
223. Nish, S. & Medzhitov, R. Host defense pathways: role of redundancy and compensation in infectious disease phenotypes. *Immunity*. **34**, 629-636 (2011).
224. Savva, A. & Roger, T. Targeting Toll-Like Receptors: Promising Therapeutic Strategies for the Management of Sepsis-Associated Pathology and Infectious Diseases. *Front Immunol* **4**, 387 (2013).
225. Nagai, Y. *et al.* Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* **3**, 667-672 (2002).
226. Moore, K. J. *et al.* Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. *J Immunol* **165**, 4272-4280 (2000).
227. Watters, T. M., Kenny, E. F. & O'Neill, L. A. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol. Cell Biol.* **85**, 411-419 (2007).
228. Johannessen, M., Askarian, F., Sangvik, M. & Sollid, J. E. Bacterial interference with canonical NFkappaB signalling. *Microbiology* **159**, 2001-2013 (2013).
229. Chen, Z. J. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat. Cell Biol.* **7**, 758-765 (2005).
230. Jiang, X. & Chen, Z. J. The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion. *Nat. Rev Immunol* **12**, 35-48 (2012).
231. Sun, S. C. The noncanonical NF-kappaB pathway. *Immunol Rev* **246**, 125-140 (2012).
232. Newton, K. & Dixit, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).
233. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem. J.* **420**, 1-16 (2009).
234. Liu, Y., Shepherd, E. G. & Nelin, L. D. MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 202-212 (2007).
235. Diamond, G., Legarda, D. & Ryan, L. K. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol. Rev.* **173**, 27-38 (2000).
236. Pearson, G. *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev* **22**, 153-183 (2001).

237. Regueiro Comesaña, V. Papel del sistema inmune innato en el control de las neumonías causadas por *Klebsiella pneumoniae*. 4-7-2008. Ref Type: Thesis/Dissertation
238. Barton, G. M. & Medzhitov, R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* **300**, 1524-1525 (2003).
239. Kawai, T. *et al.* Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J. Immunol.* **167**, 5887-5894 (2001).
240. Barton, G. M. & Medzhitov, R. Linking Toll-like receptors to IFN-alpha/beta expression. *Nat. Immunol.* **4**, 432-433 (2003).
241. Alper, C. A. *et al.* Studies of hepatic synthesis in vivo of plasma proteins, including orosomucoid, transferrin, alpha 1-antitrypsin, C8, and factor B. *Clin. Immunol Immunopathol.* **16**, 84-89 (1980).
242. Carroll, M. C. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat. Immunol* **5**, 981-986 (2004).
243. Hancock, R. E. Peptide antibiotics. *Lancet* **349**, 418-22 (1997).
244. Hancock, R. E. & Scott, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8856-8861 (2000).
245. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 238-250 (2005).
246. Jenssen, H., Hamill, P. & Hancock, R. E. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol Rev* **19**, 491-511 (2006).
247. Hancock, R. E., Falla, T. & Brown, M. Cationic bactericidal peptides. *Adv. Microb. Physiol* **37**, 135-175 (1995).
248. Perlman, D. & Bodanszky, M. Biosynthesis of peptide antibiotics. *Annu. Rev Biochem* **40**, 449-464 (1971).
249. Kleinkauf, H. & von, D. H. Peptide antibiotics, beta-lactams, and related compounds. *Crit Rev Biotechnol.* **8**, 1-32 (1988).
250. Vaara, M. Polymyxins and their novel derivatives 3. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 574-581 (2010).
251. Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* **84**, 5449-5453 (1987).

252. Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T. & Boman, H. G. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J Biochem* **106**, 7-16 (1980).
253. Habermann, E. Bee and wasp venoms. *Science* **177**, 314-322 (1972).
254. Nicolas, P. & Mor, A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defence system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol* **49**, 277-304 (1995).
255. Hancock, R. E. W. & Chapple, D. S. Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1317-1323 (1999).
256. Vaara, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews* **56**, 395-411 (1992).
257. Tytler, E. M. *et al.* Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. *Biochemistry* **34**, 4393-4401 (1995).
258. Yeaman, M. R. & Yount, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev* **55**, 27-55 (2003).
259. Hilchie, A. L., Wuerth, K. & Hancock, R. E. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 761-768 (2013).
260. Guani-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O. & Teran, L. M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin. Immunol* **135**, 1-11 (2010).
261. Stockley R., R. S. R. K. C. B. *Enfermedad pulmonar obstructiva crónica*. (2008).
262. Capodici, C., Chen, S., Sidorczyk, Z., Elsbach, P. & Weiss, J. Effect of Lipopolysaccharide (LPS) Chain Length on Interactions of Bactericidal/Permeability-Increasing Protein and Its Bioactive 23-Kilodalton NH₂-Terminal Fragment with Isolated LPS and Intact *Proteus Mirabilis* and *Escherichia Coli*. *Infect Immun* **62**, 259-265 (1994).
263. Peterson, A. A., Haug, A. & McGroarty, E. J. Physical properties of short- and long-O-antigen containing fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4. *J Bacteriol* **165**, 116-122 (1986).
264. Friedrich, C., Scott, M. G., Karunaratne, N., Yan, H. & Hancock, R. E. Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1542-1548 (1999).
265. Guina, T., Yi, E. C., Wang, H., Hackett, M. & Miller, S. I. A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J Bacteriol* **182**, 4077-4086 (2000).

266. Sugimura, K. & Nishihara, T. Purification, characterization, and primary structure of *Escherichia coli* protease VII with specificity for paired basic residues: identity of protease VII and OmpT. *J Bacteriol.* **170**, 5625-5632 (1988).
267. Stumpe, S., Schmid, R., Stephens, D. L., Georgiou, G. & Bakker, E. P. Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**, 4002-4006 (1998).
268. Shafer, W. M., Qu, X., Waring, A. J. & Lehrer, R. I. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 1829-1833 (1998).
269. Bengoechea, J. A. & Skurnik, M. Temperature-regulated efflux pump / potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Molecular Microbiology* **37**, 67-80 (2000).
270. Padilla, E. *et al.* Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 177-183 (2010).
271. Ingram, B. O., Masoudi, A. & Raetz, C. R. *Escherichia coli* mutants that synthesize dephosphorylated lipid A molecules. *Biochemistry* **49**, 8325-8337 (2010).
272. Wang, X., McGrath, S. C., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. Expression cloning and periplasmic orientation of the *Francisella novicida* lipid A 4'-phosphatase LpxF. *J. Biol. Chem.* **281**, 9321-9330 (2006).
273. Wang, X., Ribeiro, A. A., Guan, Z., Abraham, S. N. & Raetz, C. R. Attenuated virulence of a *Francisella* mutant lacking the lipid A 4'-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 4136-4141 (2007).
274. Kanistanon, D. *et al.* Role of Francisella lipid A phosphate modification in virulence and long-term protective immune responses. *Infect. Immun* **80**, 943-951 (2012).
275. Tran, A. X. *et al.* The lipid A 1-phosphatase of *Helicobacter pylori* is required for resistance to the antimicrobial peptide polymyxin. *J Bacteriol.* **188**, 4531-4541 (2006).
276. Gunn, J. S., Ryan, S. S., Van Velkinburgh, J. C., Ernst, R. K. & Miller, S. I. Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* **68**, 6139-6146 (2000).

277. McCoy, A. J., Liu, H., Falla, T. J. & Gunn, J. S. Identification of *Proteus mirabilis* mutants with increased sensitivity to antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2030-2037 (2001).
278. Ernst, R. K., Guina, T. & Miller, S. I. How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. *J. Infect. Dis.* **179 Suppl 2**, S326-S330 (1999).
279. Regueiro, V. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* subverts the activation of inflammatory responses in a NOD1-dependent manner. *Cell Microbiol.* **13**, 135-153 (2011).
280. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).
281. Beuken, E., Vink, C. & Bruggeman, C. A. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. *Biotechniques* **24**, 748-50 (1998).
282. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557-580 (1983).
283. Hitchcock, P. J. & Brown, T. M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol* **154**, 269-277 (1983).
284. Bitter, T. & Muir, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry* **4**, 330-334 (1962).
285. Rahn, A. & Whitfield, C. Transcriptional organization and regulation of the *Escherichia coli* K30 group 1 capsule biosynthesis (cps) gene cluster. *Mol Microbiol* **47**, 1045-1060 (2003).
286. El Hamidi A., Tirsoaga, A., Novikov, A., Hussein, A. & Caroff, M. Microextraction of bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization. *J. Lipid Res.* **46**, 1773-1778 (2005).
287. Yi, E. C. & Hackett, M. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. *Analyst* **125**, 651-656 (2000).
288. Caroff, M., Tacken, A. & Szabo, L. Detergent-accelerated hydrolysis of bacterial endotoxins and determination of the anomeric configuration of the glycosyl phosphate present in the "isolated lipid A" fragment of the *Bordetella pertussis* endotoxin. *Carbohydr. Res.* **175**, 273-282 (1988).
289. Hirschfeld, M., Ma, Y., Weis, J. H., Vogel, S. N. & Weis, J. J. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J. Immunol.* **165**, 618-622 (2000).

290. Laemmli, U. K., Beguin, F. & Gujer-Kellenberger, G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol.* **47**, 69-85 (1970).
291. Cigana, C. *et al.* Pseudomonas aeruginosa exploits lipid A and muropeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. *PLoS. ONE.* **4**, e8439 (2009).
292. Coornaert, A., Chiaruttini, C., Springer, M. & Guillier, M. Post-transcriptional control of the Escherichia coli PhoQ-PhoP two-component system by multiple sRNAs involves a novel pairing region of GcvB. *PLoS. Genet.* **9**, e1003156 (2013).
293. Paciello, I. *et al.* Intracellular Shigella remodels its LPS to dampen the innate immune recognition and evade inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* **110**, E4345-E4354 (2013).
294. Schromm, A. B. *et al.* Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2008-2013 (2000).
295. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373-384 (2010).
296. Nassif, X., Fournier, J. M., Arondel, J. & Sansonetti, P. J. Mucoid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect Immun* **57**, 546-552 (1989).
297. Figueroa-Bossi, N. *et al.* Loss of Hfq activates the sigmaE-dependent envelope stress response in Salmonella enterica. *Mol Microbiol* **62**, 838-852 (2006).
298. Appleyard, R. K. Segregation of new lysogenic types during growth of doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* **39**, 440-452 (1954).
299. Ditta, G. *et al.* Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* **13**, 149-153 (1985).
300. Blattner, F. R. *et al.* The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science* **277**, 1453-1462 (1997).
301. Favre, D. & Viret, J. F. Gene replacement in gram-negative bacteria: the pMAKSAC vectors. *Biotechniques* **28**, 198-200, 202, 204 (2000).
302. Derbise, A., Lesic, B., Dacheux, D., Ghigo, J. M. & Carniel, E. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in Yersinia. *FEMS Immunol Med. Microbiol* **38**, 113-116 (2003).

303. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6640-6645 (2000).
304. Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. & Schweizer, H. P. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**, 77-86 (1998).
305. Michiels, T. & Cornelis, G. R. Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system. *Journal of Bacteriology* **173**, 1677-1685 (1991).

