



Departamento de Microbiología  
Facultad de Biología  
Universidad de Barcelona

## **Caracterización del lipopolisacárido de *Aeromonas* mesófilas**

Memoria presentada por Natalia Jiménez Blasco  
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado  
Microbiología Ambiental y Biotecnología  
Bienio: 2003-2005

VºBº del director

VºBº de la codirectora

La doctoranda

Dr. Juan Tomás Magaña

Dra. Susana Merino Montero

Natalia Jiménez Blasco

Barcelona, mayo 2008

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 El género *Aeromonas*

### 1.1.1 Taxonomía

La familia *Aeromonadaceae* incluye el género *Aeromonas* que está constituido por bacilos Gram negativos; oxidasa y catalasa positivos; quimiorganotrofos anaerobios facultativos, capaces de fermentar tanto la glucosa como numerosos carbohidratos con producción de ácidos y, frecuentemente, gas; reductores de nitratos a nitritos (aunque no tienen actividad desnitrificante); y con una temperatura óptima de crecimiento de 22-28°C. La de las cepas psicrófilas se sitúa entre los 22-25°C, aunque pueden crecer entre 5-35°C, y la de las cepas mesófilas es de 28°C, pero pueden llegar a crecer entre 5-41°C. Los integrantes de este género son, en su mayoría, móviles por flagelación polar, a excepción de *A. salmonicida* y *A. media*. Se diferencian de la mayoría de las especies del género *Vibrio* porque son resistentes al agente vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina) y son capaces de crecer sin NaCl o hasta con un 6% (Kirov, 1997). El porcentaje de guanina-citosina del ADN del género oscila entre el 57 y el 63% (Popoff, 1984).

La taxonomía del género *Aeromonas* es compleja y ha experimentado cambios continuos. En 1891, Sanarelli realizó lo que se considera la primera descripción de un aislamiento de *Aeromonas* con el nombre de *Bacillus hydrophilus fuscus*, a partir de una rana infectada. Posteriormente, varios autores describieron cepas similares aisladas de diferentes animales y su nomenclatura fue cambiando progresivamente, hasta que, en 1936, Kluver y van Neil propusieron su asignación a un nuevo género, *Aeromonas*, nombre que deriva de las palabras griegas *aer*, que significa aire o gas, y *monas*, que significa unidad, es decir, unidades productoras de gas. Aunque durante muchos años fue clasificado dentro de la familia *Vibrionaceae*, junto con los géneros *Vibrio*, *Photobacterium* y *Plesiomonas*, investigaciones filogenéticas posteriores indicaron que debería formar parte de una familia propia: *Aeromonadaceae* (Colwell *et al.*, 1986). En la primera edición del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática, el género se dividió en dos grupos principales: uno constituido por las especies psicrófilas e inmóviles: *A. salmonicida*; y otro por las especies mesófilas y móviles: *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria* (Popoff, 1984).

Las primeras clasificaciones dentro del género se llevaron a cabo mediante características fenotípicas, generándose las denominadas fenoespecies, en base a pruebas

bioquímicas. No obstante, existe una gran dificultad en la identificación de las cepas de *Aeromonas* a nivel de especie mediante características bioquímicas, debido a la heterogeneidad fenotípica encontrada y al número creciente de especies reconocidas (Abbott *et al.*, 2003). Uno de los mayores logros en el proceso taxonómico fue la introducción y validación de métodos genotípicos, estableciéndose grupos de hibridación (HG) o genoespecies mediante pruebas de hibridación de ADN total. Las genoespecies se han ido asociando a especies fenotípicas determinadas, aunque todavía quedan genoespecies sin fenoespecie asociada y viceversa. Sin embargo, la identificación de algunas especies seguía suponiendo un problema debido a que existían discrepancias entre los grupos fenotípicos y genotípicos. Una herramienta útil para la clasificación de las cepas del género *Aeromonas* fue el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S (Martínez-Murcia *et al.*, 1992). Posteriormente, se desarrolló un método, rápido y de relativo bajo coste, basado en el análisis de los patrones RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) de los genes ADNr 16S amplificados por PCR (Figueras *et al.*, 2000). Con el fin de mejorar la clasificación de las especies y su identificación, se han desarrollado, recientemente, estudios basados en el análisis de la secuencia de genes esenciales, entre los que se encuentran el gen *gyrB*, que codifica la subunidad B de la ADN girasa, el gen *rpoD*, que codifica el factor  $\sigma^{70}$  de la ARN polimerasa (Yáñez *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2004; Saavedra *et al.*, 2006), el gen *rpoB*, que codifica la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa (Küpfer *et al.*, 2006), el gen *dnaJ*, que codifica la proteína de choque térmico 40 (Nhung *et al.*, 2007), y el gen que codifica la proteína RecA (Sepe *et al.*, 2008). Estos genes logran una mayor resolución interespecífica y son buenos marcadores moleculares para realizar estudios filogenéticos en el género, ya que su tasa de sustitución nucleotídica es mayor que la del gen ADNr 16S.

El género *Aeromonas* incluye en la actualidad 17 especies (entre paréntesis se indica el grupo de hibridación del ADN), según la última edición del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Martin-Carnahan y Joseph, 2005): *A. hydrophila* (HG1), *A. bestiarum* (HG2), *A. salmonicida* (HG3), *A. caviae* (HG4), *A. media* (HG5), *A. eucrenophila* (HG6), *A. sobria* (HG7), *A. veronii* (bv. *sobria* (HG8) y bv. *veronii* (HG10)), *A. jandaei* (HG9), *A. schubertii* (HG12), *A. trota* (HG14), *A. allosaccharophila* (HG15), *A. encheleia* (HG16) y *A. popoffii* (HG17) y los grupos de hibridación de ADN *Aeromonas* sp. HG11 y *Aeromonas* sp. HG13 (Grupo Entérico 501) que permanecen sin tener asignado un nombre de especie. Recientemente, se han descrito tres nuevas especies: *A. culicicola*

(Pidiyar *et al.*, 2002), *A. simiae* (Harf-Monteil *et al.*, 2004) y *A. molluscorum* (Miñana-Galbis *et al.*, 2004). Otras especies, como *A. ichtiosmia* y *A. enteropelogenes*, actualmente se consideran sinónimos de *A. veronii* y *A. trota*, respectivamente (Collins *et al.*, 1993).

### 1.1.2 Hábitat

Las especies de *Aeromonas* ocupan una enorme diversidad de hábitats, aunque son microorganismos considerados autóctonos del medio acuático. Se han aislado a partir de aguas marinas, ríos, lagos, pantanos, sedimentos, aguas potables, tanto cloradas como no cloradas, sistemas de distribución de aguas y aguas residuales, observándose un mayor número en los meses cálidos. Algunos autores consideran que la presencia de *Aeromonas* en el agua potable podría ser un indicador de la necesidad de optimizar el sistema de tratamiento y potabilización del agua (Szewzyk *et al.*, 2000).

Son microorganismos que también se han aislado de una gran variedad de alimentos frescos, como carnes, pescados, mariscos o vegetales; o alimentos preparados, como salsas, helados o productos de pastelería, cuya presencia ha sido atribuida al contacto del alimento con agua contaminada (Merino *et al.*, 1995). Potencialmente, podrían representar un problema serio en alimentos, dado que muchas cepas pueden crecer a las temperaturas de refrigeración (4-7°C), en condiciones de pH de 4-10, bajo la mayoría de atmósferas utilizadas para la preservación de alimentos y en presencia de una elevada concentración de sal (Kirov, 1997).

### 1.1.3 Patogenia y epidemiología

El género *Aeromonas* comprende, predominantemente, patógenos de animales poiquilotermos, incluyendo varias especies de peces, anfibios y reptiles, aunque también se han asociado con infecciones en aves y mamíferos. Diversas especies del género son consideradas agentes etiológicos de numerosas patologías en peces de interés en acuicultura, causando infecciones que suponen significativas pérdidas económicas (Austin *et al.*, 1998). La especie psicrófila *A. salmonicida* se considera el principal agente causal de furunculosis (formación de lesiones o forúnculos) en diferentes especies de peces, entre las que se incluyen el salmón y la trucha, cultivadas en piscifactorías de zonas frías. La furunculosis se caracteriza por producir letargo y múltiples hemorragias en aletas, ano y músculo; y, a nivel interno, hemorragias en hígado y bazo, y necrosis en riñón (McCarthy, 1975). Por otro lado, *A. hydrophila* y *A. jandaei* son causantes de aeromoniasis en especies

de peces cultivadas en zonas templadas, como la anguila, la carpa o el pez gato (Austin *et al.*, 1998). La aeromoniasis es una septicemia hemorrágica que se caracteriza por la presencia de pequeñas lesiones superficiales, precedidas a menudo por la pérdida de escamas, hemorragias en agallas y ano, úlceras, abscesos, exoftalmia (ojos saltones) y distensión abdominal y, a nivel interno, se puede observar anemia e inflamación de hígado y riñón (Miyazaki y Kaige, 1985).

Las *Aeromonas* mesófilas están emergiendo como importantes patógenos en humanos y, cada vez con más frecuencia, aparecen como responsables de una gran variedad de infecciones. Aproximadamente, el 85% de los aislamientos clínicos del género *Aeromonas* corresponden a las especies: *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* bv. *sobria* (Janda, 1991). Entre las infecciones extraintestinales producidas por *Aeromonas*, se incluyen: septicemia, generalmente en individuos inmunocomprometidos; infecciones de heridas, principalmente infecciones cutáneas superficiales pero pueden llegar a complicarse infectando tendones, músculos y huesos; infecciones en el tracto respiratorio, desde epiglotitis a neumonía; y con menor frecuencia, meningitis, peritonitis, infecciones oculares y síndrome hemolítico urémico (Janda y Abbott, 1998). Una de las infecciones causada por *Aeromonas* más comúnmente descrita es la gastroenteritis, que puede manifestarse desde una forma de diarrea líquida autolimitante hasta una diarrea más severa e invasiva. Es, especialmente, un problema en niños y, en los últimos años, se han documentado casos de diarrea del viajero causada por *Aeromonas* (Vila *et al.*, 2003). Se ha descrito que, a nivel mundial, la tasa de aislamiento de *Aeromonas* a partir de muestras diarreicas oscila entre el 0% y el 10,8% (Edberg *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de haberse demostrado el potencial enterotoxigénico de algunas cepas, su papel etiológico en la diarrea líquida permanece en controversia (von Graevenitz, 2007), debido a que no se han descrito grandes brotes epidémicos y a que, a nivel experimental, no se dispone de un modelo animal adecuado para reproducir la sintomatología diarreica observada en el ser humano (Janda y Abbot, 1998).

#### **1.1.4 Factores de virulencia**

El estudio de la patogenicidad bacteriana ha permitido la comprensión de parte de las complejas interacciones entre los patógenos y sus hospedadores a nivel celular y molecular. La variedad de manifestaciones clínicas observadas en las infecciones provocadas por *Aeromonas* concuerda con la idea de que la patogenicidad de este

microorganismo es multifactorial, de manera que múltiples factores de virulencia podrían actuar conjuntamente. Estudios recientes refuerzan esta hipótesis, además se ha observado que la virulencia, en este género, es dependiente de la cepa bacteriana, de la ruta de infección y del animal utilizado como modelo (Yu *et al.*, 2005).

En la actualidad, se está llevando a cabo la secuenciación del genoma de la cepa A449 de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* y, recientemente, se ha completado la secuenciación del de la cepa ATCC 7966<sup>T</sup> de *A. hydrophila*. La información obtenida permite una mejor comprensión del potencial de virulencia de la bacteria, el cual se ha visto que es considerable en esta última. Sin embargo, existe una gran diversidad dentro del género y algunos de los factores de virulencia puede que no estén representados en estas cepas, como es el caso del sistema de secreción de tipo III o del flagelo lateral en la cepa *A. hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup>, o que presenten factores de virulencia distintos a los de otras cepas (Seshadri *et al.*, 2006).

Se ha propuesto, recientemente, un ensayo para evaluar la virulencia de diferentes especies de *Aeromonas* mediante el uso de la ameba *Dictyostelium* como modelo hospedador alternativo a los vertebrados. Este ensayo se basa en la capacidad de la ameba de formar una calva de fagocitosis sobre un cultivo confluyente de una bacteria no patógena, mientras que cepas virulentas impiden su crecimiento. De esta manera, ha sido ensayada la patogenicidad asociada a varios factores de virulencia, concordando los resultados con los obtenidos en el modelo animal en los casos en los que éste había sido utilizado (Froquet *et al.*, 2007).

Los principales factores de virulencia descritos en *Aeromonas* spp. son el lipopolisacárido, la cápsula, la lámina S, las fimbrias y otras adhesinas no filamentosas, la flagelación polar y lateral, los sistemas de captación de hierro, el sistema de secreción de tipo III y la secreción de otras exotoxinas y enzimas extracelulares.

#### **1.1.4.1 El lipopolisacárido (LPS)**

Este factor de virulencia, por ser el objeto de estudio de este trabajo, se describe de forma extensa y detallada en el apartado 1.2.

#### **1.1.4.2 Cápsula**

La cápsula es una estructura polisacáridica que recubre la membrana externa de la bacteria. Está altamente hidratada (aproximadamente, un 95% es agua) y se compone de

repeticiones de monosacáridos unidos entre sí mediante enlaces glicosídicos, dando lugar a polisacáridos capsulares (CPS) que pueden ser homopolímeros o heteropolímeros. La variedad de monosacáridos que pueden formarla y del tipo de uniones entre éstos, y sus posibles modificaciones, contribuyen a una elevada diversidad y a una complejidad estructural adicional. Frecuentemente, esta estructura constituye la capa más externa de la célula y, como tal, participa en la interacción de la bacteria con el ambiente. Se ha descrito como un factor de virulencia importante en diversos patógenos, ya que contribuye a la resistencia a la actividad bactericida del complemento y a la fagocitosis, favorece la adherencia a otras bacterias o tejidos del hospedador, y actúa como barrera frente a moléculas hidrofóbicas tóxicas. La cápsula puede impedir el acceso de los componentes del complemento a la superficie celular y, por otro lado, algunos CPS contienen componentes que inactivan al factor C3b, de manera que se impide la formación del complejo de ataque a la membrana. La cápsula, además, se ha utilizado para la clasificación dentro de un mismo género debido a sus propiedades antigénicas (antígenos K) (Roberts, 1996).

En *A. salmonicida*, se había documentado la capacidad de formar cápsula tanto *in vitro* (en un medio rico en glucosa) como *in vivo*, y el papel de esta estructura como factor de virulencia, ya que su presencia reducía la opsonización, impidiendo la fagocitosis (Garrote *et al.*, 1992, Garduño *et al.*, 1993; Merino *et al.*, 1994), y favorecía la invasión en líneas celulares de peces (Merino *et al.*, 1996a). Recientemente, se ha descrito su estructura química, que consiste en unidades repetitivas de un trisacárido lineal, y es idéntica a la de un nuevo antígeno O del lipopolisacárido que se produce en estas mismas condiciones (Wang *et al.*, 2004b). Este polisacárido capsular es detectado *in vitro* en crecimientos en medio sólido TSA (*Tryptic Soy Agar*), pero no en medio líquido TSB (*Tryptic Soy Broth*).

Entre las *Aeromonas* spp. mesófilas, *A. hydrophila* AH-3 (serotipo O:34) y *A. veronii* bv. *sobria* (serotipo O:11) también son capaces de producir cápsula cuando crecen en un medio rico en glucosa (Martínez *et al.*, 1995). En el serotipo O:34, se ha asociado con una mayor invasión y adhesión a líneas celulares de peces (Merino *et al.*, 1997a). Las cepas PPD134/91 y JCM3980 de *A. hydrophila* (serotipo O:18) también producen polisacáridos capsulares y es en la cepa PPD134/91 donde se ha descrito por primera vez, dentro del género, una agrupación génica que incluye los genes de biosíntesis y exportación de la cápsula. Su organización genética, en tres regiones, es similar al grupo II de polisacáridos capsulares de otras bacterias como *Escherichia coli* (Zhang *et al.*, 2002). En base a la



organización genética en diferentes cepas de *A. hydrophila*, se han identificado dos tipos de cápsulas del grupo II: IIA, mayoritariamente encontradas en los serotipos O:18 y O:34, y IIB, halladas en los serotipos O:21 y O:27. Ambos tipos muestran correlación con la resistencia a la actividad bactericida del suero y a la fagocitosis, pero es mayor en el caso de las cápsulas del grupo IIA (Zhang *et al.*, 2003).

### 1.1.4.3 Lámina S

La lámina S es una matriz proteica de naturaleza paracristalina, producida por una gran variedad de bacterias, que forma una envuelta externa a la pared celular. Su análisis químico ha demostrado que está constituida por monómeros de una única proteína o glicoproteína, que se autoensamblan constituyendo una estructura supramolecular con una morfología ultraestructural precisa. Debido a su posición, cumple distintas funciones biológicas: está implicada en adhesión y protección frente a la fagocitosis, presenta propiedades antigénicas, y es el lugar de anclaje de exoenzimas hidrolíticas y receptor de bacteriófagos, entre otras (Beveridge *et al.*, 1997).

En 1981, se identificó, mediante microscopía electrónica de transmisión, una lámina externa a la pared celular, inicialmente llamada lámina A, que se asoció con la virulencia de *A. salmonicida* (Kay *et al.*, 1981). Estudios posteriores, permitieron la identificación de la proteína constituyente y la secuenciación del gen codificante de la misma, *vapA* (Kay *et al.*, 1984). Se observó, además, la pérdida de dicha lámina cuando esta especie crecía a temperaturas superiores a 25°C, debido a una delección del material genético (Belland y Trust, 1987). Seguidamente, se identificaron también las láminas S de algunas cepas de *A. hydrophila* y *A. veronii* bv. *sobria*, todas pertenecientes al serotipo O:11, y el gen codificante fue denominado *ahsA* (Dooley y Trust, 1988; Janda *et al.*, 1987). Aunque estas láminas son parecidas a nivel morfológico a la de *A. salmonicida*, son diferentes a nivel genético y funcional y, consecuentemente, podrían desempeñar papeles distintos en la patogenicidad (Noonan y Trust, 1997). Recientemente, se ha descrito la presencia de lámina S en aislados patógenos de *A. hydrophila* pertenecientes a los serotipos O:14 y O:81 (Esteve *et al.*, 2004).

La lámina S de *Aeromonas* está constituida por subunidades de una única proteína que se autoensamblan de forma tetragonal y envuelven a la célula por completo, y constituye el antígeno superficial predominante de las células que la poseen (Chu *et al.*, 1991). Anticuerpos policlonales contra la lámina S han permitido desarrollar un método

para la detección de las *Aeromonas* pertenecientes al serotipo O:11 en alimentos mediante ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Merino *et al.*, 1993).

Estudios de secreción de la proteína de la lámina, realizados en diferentes especies de *Aeromonas*, muestran que el paso a través de la membrana plasmática implica el corte de un péptido señal. La salida desde el periplasma hacia el exterior requiere la acción de diferentes proteínas de secreción que muestran homología con componentes del sistema de secreción de tipo II, aunque son específicas de las subunidades de la lámina S, habiéndose demostrado que la mutagénesis de éstas no altera la secreción de sustratos de tipo II (Thomas y Trust, 1995; Noonan y Trust, 1995).

En *A. salmonicida*, la lámina S facilita la unión a macrófagos, una porfirinas (Kay *et al.*, 1985) e inmunoglobulinas (Phipps y Kay, 1988), protege de la acción de las proteasas, evita la activación del complemento y contribuye a la resistencia a la actividad bactericida del suero (Merino *et al.*, 1996b), y es capaz de unirse a una gran variedad de proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno IV y la laminina (Trust *et al.*, 1993). La presencia de lámina S en las *Aeromonas* spp. mesófilas pertenecientes al serotipo O:11 incrementa la capacidad de adhesión de estas células, contribuyendo a la colonización de la mucosa intestinal, pudiendo ser ésta la explicación del frecuente aislamiento de este serotipo en pacientes con gastroenteritis. Además, parece que la lámina S proporciona una mayor resistencia a la opsonofagocitosis, hecho que podría facilitar la diseminación sistémica (Merino *et al.*, 1995). Tanto en *A. salmonicida* como en *Aeromonas* mesófilas de serotipo O:11, la pérdida de la lámina se ha asociado con la disminución de la virulencia (Noonan y Trust, 1997).

Hasta el momento, todas las cepas de *Aeromonas* que poseen lámina S tienen en común la presencia de un lipopolisacárido (LPS) que contiene polisacáridos O de longitud de cadena homogénea en su superficie celular, y este hecho ha llevado a especular sobre la posible implicación del LPS en la unión de la lámina a la superficie celular bacteriana (Kokka *et al.*, 1990; Esteve *et al.*, 2004).

#### **1.1.4.4 Adhesinas**

La capacidad de adhesión y colonización bacteriana de las mucosas es crítica para el desarrollo de la infección. Las *Aeromonas* spp. producen adhesinas que les permiten adherirse a receptores específicos que se encuentran en la superficie de células eucariotas. Muchos de estos receptores son carbohidratos que se expresan en eritrocitos, de manera

que la hemoaglutinación se ha utilizado para la detección de adhesinas, aunque no todas las adhesinas presentan la capacidad de hemoaglutinar. Se han descrito dos clases de adhesinas en *Aeromonas*, unas se han asociado con apéndices filamentosos (fimbrias o *pili*) y otras con proteínas de la membrana externa (Burke *et al.*, 1984) y otras estructuras.

#### 1.1.4.4.1 Fimbrias o *pili* (adhesinas filamentosas)

Las fimbrias son proyecciones filamentosas, formadas a partir de subunidades proteicas denominadas pilinas, que se encuentran en la superficie bacteriana. En aislados de cepas, tanto clínicas como ambientales, de *Aeromonas* mesófilas, se han descrito dos tipos de fimbrias: fimbrias cortas y rígidas (S/R, *Short/Rigid*), presentándose en un alto número por célula bacteriana; y fimbrias largas y flexibles (L/W, *Long/Wavy*), que se encuentran en bajo número por célula.

Las fimbrias S/R presentan una longitud de 0,6 a 2  $\mu\text{m}$ , poseen epítomos comunes entre las diferentes especies analizadas, y están altamente distribuidas entre las cepas ambientales. Es el tipo de fimbrias predominante entre las *Aeromonas* spp. que presentan una elevada cantidad de *pili*, como algunas cepas ambientales de *A. veronii* bv. *sobria* (Kirov *et al.*, 1995). Pueden causar autoagregación de las bacterias, pero no hemoaglutinación, y no se unen a células intestinales (Honma y Nakasone, 1990). En algunas cepas clínicas, este tipo de fimbrias se puede inducir bajo determinadas condiciones ambientales (< 22°C, en medio líquido).

Las fimbrias L/W se consideran hemoaglutininas (Hokama *et al.*, 1990). Son largas, finas (4-7 nm) y flexibles y son el tipo predominante en cepas aisladas a partir de heces, como las de *A. veronii* bv. *sobria* que presentan un bajo número de *pili* (< 10 por célula). El análisis de su secuencia aminoacídica indica que se corresponden con *pili* de tipo IV (Pepe *et al.*, 1996), reconocidos como estructuras importantes en la adhesión a células epiteliales y en la formación de “biofilms”, y relacionadas con el movimiento celular independiente de flagelo sobre superficies sólidas, conocido como *twitching motility*, actividades importantes en la colonización de las mucosas (Béchet y Blondeau, 2003). En especies de *Aeromonas* asociadas con gastroenteritis, existen dos familias de *pili* de tipo IV: Bfp (*Bundle-Forming Pili*) y Tap (*Type IV Aeromonas Pili*) (Barnett *et al.*, 1997). Se ha demostrado la implicación de las fimbrias Bfp en la adhesión a células intestinales (Kirov *et al.*, 1999) y parece ser que las fimbrias Tap no presentan un papel tan significativo en la colonización de estas células (Kirov *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha

observado que una de las proteínas de la familia Tap (TapD) es esencial para la secreción de aerolisina y proteasas, contribuyendo de este modo al sistema de secreción de tipo II (Pepe *et al.*, 1996).

#### **1.1.4.4.2 Adhesinas no filamentosas**

Las *Aeromonas* spp. presentan en su superficie otras estructuras no filamentosas que han sido consideradas adhesinas, como los monómeros constituyentes de la lámina S, el lipopolisacárido y diferentes proteínas de membrana externa. Entre estas últimas, se ha descrito que las porinas podrían actuar como adhesinas tipo lectina para la unión de la bacteria a superficies ricas en carbohidratos, como los eritrocitos y, probablemente, las células del intestino humano (Quinn *et al.*, 1993). En *A. hydrophila*, ha sido descrita una proteína de membrana externa (OMP) de 43 kDa con función adhesina (Quinn *et al.*, 1993; Quinn *et al.*, 1994), denominada Aha1p, y se ha planteado la posibilidad de utilizarla como vacuna en peces (Fang *et al.*, 2004). Una adhesina OMP de 43 kDa ha sido también hallada en cepas sin fimbrias de *A. caviae* (Rocha-De-Souza *et al.*, 2001) y, en *A. veronii*, se ha observado que una proteína parecida a la porina LamB, Omp48, está implicada en la adhesión a células epiteliales (Vázquez-Juárez *et al.*, 2004).

#### **1.1.4.5 Flagelo**

El flagelo bacteriano es un apéndice largo (15-20  $\mu\text{m}$  de longitud) y delgado (aproximadamente, 20 nm de diámetro), de naturaleza proteica, con capacidad de rotación y que permite la propulsión de la célula. En esta estructura, se distinguen tres regiones: el cuerpo basal, el gancho y el filamento. El cuerpo basal se encuentra embebido en las envueltas bacterianas y el gancho tiene como función el anclaje del filamento al cuerpo basal. El filamento, que se extiende desde el gancho hacia el exterior, es un cilindro rígido y hueco constituido por la polimerización de una proteína denominada flagelina.

Las *Aeromonas* mesófilas expresan un único flagelo polar de manera constitutiva y, en un 50-60% de las cepas asociadas a procesos diarreicos, el crecimiento en superficies induce la expresión de flagelos laterales (Kirov *et al.*, 2002). Así, las cepas AH-3 de *A. hydrophila* y Sch3N de *A. caviae* producen un único flagelo polar sin vaina cuando crecen en medio líquido, y múltiples flagelos laterales, además del flagelo polar, también sin vaina, cuando crecen en medio sólido (Gavín *et al.*, 2002). El flagelo polar permite la movilidad por natación (*swimming*) en ambientes líquidos, mientras que los flagelos laterales son responsables de la movilidad colonial observada en crecimientos en medios

sólidos o semisólidos, conocida como *swarming* (“enjambado”). La natación y la quimiotaxis son importantes en el contacto inicial con las superficies, mientras que el *swarming* permite a las bacterias avanzar sobre las superficies y facilitar el proceso de colonización (O'Toole y Kolter, 1998). En consecuencia, la presencia del flagelo y también su movilidad participan en las fases iniciales del proceso de infección, entre las que cabe destacar la adhesión a células eucariotas, la colonización del hospedador (Josenhans y Suerbaum, 2002) y la formación de “biofilms” (Merino *et al.*, 2006). En *A. hydrophila* O:34, se ha demostrado que la movilidad es importante en el proceso de adhesión a líneas celulares de peces, que los flagelos contribuyen al proceso de invasión (Merino *et al.*, 1997b), y que tanto la natación como el *swarming* son esenciales para la formación de “biofilms” en la cepa AH-3 de *A. hydrophila* (Gavín *et al.*, 2002).

Se han secuenciado agrupaciones génicas implicadas en el establecimiento de la flagelación polar y lateral en las cepas AH-3 de *A. hydrophila* y Sch3N de *A. caviae*. En la cepa AH-3, los genes del sistema de flagelación polar se agrupan, al menos, en seis regiones cromosómicas distintas (Canals *et al.*, 2006b). En cambio, los genes del sistema de flagelación lateral están agrupados en una única región cromosómica (Canals *et al.*, 2006a). Por otro lado, la cepa AH-3 de *A. hydrophila* presenta dos flagelinas para la flagelación polar (FlaA y FlaB) y una sola para la flagelación lateral (LafA), mientras que *A. caviae* Sch3N presenta dos flagelinas para ambos tipos de flagelo (Gavín *et al.*, 2002). Las flagelinas polares y laterales de ambas cepas están glicosiladas (Gavín *et al.*, 2002) y, recientemente, han sido descritos varios genes implicados en su glicosilación (Canals *et al.*, 2007).

*A. salmonicida* ha sido definida como una especie no flagelada e inmóvil, aunque en crecimientos en medios líquidos con elevada viscosidad y a temperaturas supraóptimas (30 a 37°C), se ha observado que un 1% de la población presenta movilidad mediante flagelación polar (McIntosh y Austin, 1991). Se han identificado algunos genes implicados en la biosíntesis de la flagelación polar, como los que codifican las flagelinas, *flaA* y *flaB* (Umelo y Trust, 1997). También se ha descrito una agrupación génica asociada a la flagelación lateral, *lafA-U*, donde todos los genes son funcionales, excepto *lafA*, inactivo debido a la presencia de una putativa transposasa (Merino *et al.*, 2003).

#### 1.1.4.6 Sistemas de captación de hierro

Numerosos ambientes contienen una concentración de hierro libre inferior a 1  $\mu\text{M}$ , que es la considerada indispensable para el crecimiento óptimo de los microorganismos (Neilands, 1995). La baja disponibilidad de hierro libre dificulta, pero no impide, el crecimiento y la patogenicidad bacteriana. Los microorganismos han desarrollado una serie de mecanismos que les permiten extraer el hierro del hospedador y de los polímeros insolubles del ambiente: las modificaciones reductivas del hierro, los sistemas de transporte de iones ferrosos o los sideróforos. Debido a la presencia de las proteínas de unión a hierro del hospedador, como por ejemplo la hemoglobina (con sus grupos hemo), la transferrina, la lactoferrina o la ferritina, el hierro se encuentra poco accesible *in vivo*. En suero, las concentraciones de hierro libre están muy lejos de los mínimos requeridos para el crecimiento durante la infección de muchas bacterias. Por lo tanto, los mecanismos para la captación de hierro que presentan las bacterias se consideran esenciales para su crecimiento y para la virulencia durante una infección (Stintzi y Raymond, 2000).

Se conocen dos sistemas de captación de hierro en cepas de *Aeromonas*, uno dependiente y otro independiente de sideróforo (Byers *et al.*, 1991). Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular que presentan grupos funcionales con elevada afinidad y especificidad por el ión férrico. Algunas *Aeromonas* spp. también podrían adquirir el hierro *in vivo* mediante la unión de receptores de la membrana bacteriana con proteínas secuestradoras de hierro del hospedador (Stintzi y Raymond, 2000).

La mayoría de *Aeromonas* mesófilas producen un único tipo de sideróforo: enterobactina o amonabactina. La enterobactina es sintetizada por diferentes bacterias Gram negativas, mientras que la amonabactina es producida, exclusivamente, por *Aeromonas* spp. (Zywno *et al.*, 1992). Ambos sideróforos son de tipo catecolato, ya que están formados por ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHB) conjugado con aminoácidos (Telford y Raymond, 1998). De este modo, en *Aeromonas* spp. la biosíntesis de 2,3-DHB está codificada por dos agrupaciones génicas diferentes: la agrupación *amo*, presente en las cepas productoras de amonabactina, y la agrupación *aeb* (*Aeromonad Enterobactin Biosynthesis*), propia de las productoras de enterobactina (Massad *et al.*, 1994).

Se ha demostrado la capacidad de la amonabactina en la adquisición de hierro a partir de la transferrina y de la lactoferrina y, por lo tanto, su importante papel en la patogénesis (Stintzi y Raymond, 2000).

Los sistemas de captación de hierro mediante sideróforos se componen, también, de un aparato asociado a la célula responsable de procesar el sideróforo unido a hierro con la finalidad de entregarlo al metabolismo bacteriano. Este sistema incluye un receptor, específico para el sideróforo, unido a la membrana. En *A. hydrophila*, se ha descrito un único receptor y transportador de hierro en la membrana externa de la bacteria, que es dependiente de amonabactina. El transporte implica un proceso de intercambio de ligando, o mecanismo lanzadera, que tiene lugar en la superficie celular cuando el ferri-sideróforo transfiere el átomo de hierro a un apo-sideróforo, libre de hierro, previamente unido al receptor. Además, el receptor de amonabactina de *A. hydrophila* presenta baja especificidad, con capacidad de transportar un amplio rango de sideróforos, con grupos quelantes tan variados como catecolato, hidroxamato o hidroxipiridonato (Stintzi *et al.*, 2000).

Recientemente, ha sido descrita la agrupación génica implicada en la biosíntesis del sideróforo tipo catecolato de *A. salmonicida*, cuya producción es imprescindible para el crecimiento en condiciones limitantes de hierro, y que es capaz de obtenerlo de la transferrina (Najimi *et al.*, 2008).

También, se ha secuenciado el gen que codifica el receptor de sideróforos en *A. salmonicida*, *fstA*, que muestra homología con otros genes *fstA* de bacterias patógenas Gram negativas (Pemberton *et al.*, 1997).

#### **1.1.4.7 Secreción de exotoxinas y otras enzimas extracelulares**

##### **1.1.4.7.1 Exotoxinas**

Se ha descrito que el género *Aeromonas* produce una gran variedad de exotoxinas. No obstante, no todas las cepas del género producen la totalidad de toxinas descritas y, aunque ciertas cepas posean los genes que codifican una toxina en concreto, éstos sólo se expresan en determinadas condiciones de crecimiento.

##### **1.1.4.7.1.1 Enterotoxinas**

En *Aeromonas* spp., se han descrito dos tipos de enterotoxinas: citotóxicas, que provocan importantes daños en el epitelio del intestino delgado, y citotónicas, que no producen degeneración del epitelio.

#### **1.1.4.7.1.1 Enterotoxinas citotóxicas**

Las enterotoxinas citotóxicas, también conocidas como enterotoxinas citolíticas,  $\beta$ -hemolisinas o aerolisinas, pueden llegar a producir hemólisis, citotoxicidad y enterotoxicidad. Las cepas productoras se aíslan, frecuentemente, de enfermos diarreicos (Chopra *et al.*, 1993). Se sintetizan como preproteínas que contienen una secuencia señal que se separa al atravesar la membrana. La proproteína inactiva pierde parte de su extremo C-terminal y, produciéndose su activación por proteólisis, es capaz de oligomerizar y formar poros en la membrana de la célula eucariota que pueden provocar un desequilibrio osmótico (van der Goot, 1994).

A partir de *A. hydrophila*, se purificó una hemolisina con actividad hemolítica, citotóxica y enterotóxica y capaz de provocar letalidad en ratones (Asao *et al.*, 1984). Más tarde, dos grupos diferentes publicaron el clonaje de un gen aerolisina, *aerA*, a partir de *A. trota* y *A. bestiarum* (Chakraborty *et al.*, 1986; Howard y Buckley, 1986). Posteriormente, a partir de la cepa SSU de *A. hydrophila*, aislada de una muestra diarreica, fue purificada una nueva enterotoxina citotóxica, Act, que presentaba actividades similares a las asociadas a las enterotoxinas descritas anteriormente (Ferguson *et al.*, 1997). Estudios detallados de las funciones y estructuras de la aerolisina y la Act indicaron que estaban íntimamente relacionadas, aunque presentan heterogeneidad aminoacídica en algunas regiones (Buckley y Howard, 1999). Se ha demostrado la importancia de estas enterotoxinas en la patogénesis de enfermedades mediadas por *Aeromonas* (Chakraborty *et al.*, 1987; Xu *et al.*, 1998). La aerolisina contiene dos lugares de unión a receptor, uno se une a proteínas ancladas al glicosilfosfatidilinositol y el otro, a carbohidratos de superficies celulares. En este sentido, la aerolisina de *A. bestiarum* puede unirse a la glicoforina de la membrana de los eritrocitos, mientras que la Act no (Chopra y Houston, 1999). Se han realizado estudios de las cascadas de señalización intracelular, inducidas por Act, que llevan a la producción de mediadores de la inflamación en macrófagos (Galindo *et al.*, 2003) y en células epiteliales humanas (Galindo *et al.*, 2005). Además, se ha investigado el potencial papel de esta enterotoxina como inductora de la apoptosis (Galindo *et al.*, 2006).

#### **1.1.4.7.1.2 Enterotoxinas citotónicas**

Las enterotoxinas citotónicas presentan un sistema de actuación similar al de la toxina colérica, aumentando los niveles de AMPc y prostaglandinas en las células del epitelio intestinal (Chopra *et al.*, 1992). En el género *Aeromonas*, se han descrito diversas



enterotoxinas que presentan diferentes pesos moleculares y una reactividad variable con la antitoxina colérica (Chakraborty *et al.*, 1984; Potomski *et al.*, 1987; McCardell *et al.*, 1995). Estas enterotoxinas se dividieron en dos tipos: termolábiles (56°C durante 10 minutos) sin reactividad cruzada con la toxina colérica, y termoestables (100°C durante 30 minutos) que reaccionan con la antitoxina colérica (James *et al.*, 1982).

La proteína Alt es una enterotoxina citotónica termolábil, que fue purificada a partir de la cepa SSU de *A. hydrophila* (Chopra y Houston, 1989). Parte de su secuencia proteica muestra similitud con el extremo C-terminal de la fosfolipasa C (PLC) de *A. hydrophila* y causa un incremento de los niveles de AMPc y de prostaglandinas en la mucosa intestinal de rata (Chopra *et al.*, 1996). En la misma cepa, fue identificada la enterotoxina citotónica termoestable (56°C durante 20 minutos) conocida como Ast (Chopra *et al.*, 1994) y se ha demostrado, utilizando una rata como modelo animal, que provoca la secreción de fluido en el intestino delgado y un aumento de los niveles de AMPc en las células de la mucosa (Chopra y Houston, 1999). Por otro lado, se ha observado que la contribución de estas dos enterotoxinas en la gastroenteritis inducida por *A. hydrophila* en ratón es menor que la de la enterotoxina citotóxica Act y que puede existir algún tipo de interacción entre todas ellas durante la infección (Sha *et al.*, 2002).

#### **1.1.4.7.1.2 Hemolisinas**

Las *Aeromonas* spp. producen al menos dos clases de hemolisinas:  $\beta$ -hemolisinas y  $\alpha$ -hemolisinas. Además de la enterotoxina citotóxica con actividad  $\beta$ -hemolítica, las *Aeromonas* producen otras  $\beta$ -hemolisinas. Provocan la formación de poros en las membranas celulares produciendo una lisis osmótica y una destrucción completa de los eritrocitos. Las  $\beta$ -hemolisinas son termolábiles (56°C durante 5 minutos) y, generalmente, se forman durante la fase de crecimiento exponencial (Thelestam y Ljungh, 1981; Kirov, 1997). Un tipo de  $\beta$ -hemolisina es la designada como AHH1 (Hirono y Aoki, 1991), cuya secuencia presenta una elevada similitud con la proteína HlyA de *V. cholerae* y podría funcionar formando canales de manera similar (Wong *et al.*, 1998). Por otro lado, recientemente, ha sido identificada una proteína con actividad hemolítica en la cepa SSU de *A. hydrophila* que no presenta similitud con el resto de hemolisinas caracterizadas y ha sido denominada HlyA (Erova *et al.*, 2007).

Las  $\alpha$ -hemolisinas producidas durante la fase estacionaria del crecimiento causan efectos citotóxicos reversibles y lisis incompleta de los eritrocitos, pero no se han relacionado con propiedades enterotoxigénicas (Thelestam y Ljungh, 1981).

#### **1.1.4.7.2 Otras enzimas extracelulares**

Las cepas de *Aeromonas* pueden producir una gran variedad de enzimas extracelulares como proteasas, lipasas, amilasas, quitinasas, nucleasas o gelatinasas, entre otras. Aunque en muchos casos su papel en la patogenicidad está todavía por determinar, representan un gran potencial en la adaptación a los cambios ambientales.

##### **1.1.4.7.2.1 Proteasas**

Las proteasas pueden contribuir a la patogenicidad causando lesiones directas del tejido, potenciando la invasividad o mediante la activación proteolítica de toxinas (Kirov, 1997). Además, también pueden contribuir al establecimiento de la infección ayudando a superar las defensas del hospedador, mediante inactivación del complemento, y proporcionando nutrientes para la proliferación celular (Leung y Stevenson, 1988).

En *A. hydrophila*, se han identificado tres tipos de proteasas. Las dos halladas en la mayoría de los sobrenadantes de cultivos de esta especie son una serina proteasa termolábil de 68 kDa (Rivero *et al.*, 1991) y una metaloproteasa de 38 kDa termoestable y sensible al EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Rivero *et al.*, 1990), ambas con actividad caseinolítica. Una Zn-metaloproteasa de 19 kDa resistente al EDTA ha sido también descrita en una única cepa (Loewy *et al.*, 1993). La metaloproteasa de 38 kDa, denominada AhpB, presenta también actividad elastasa, no descrita inicialmente, y es un importante factor de virulencia, y la serina proteasa, AhpA, podría estar implicada en su maduración (Cascón *et al.*, 2000). La purificación de una metaloelastasa se ha llevado a cabo en varios grupos (Esteve y Birbeck, 2004) y, según un estudio paralelo, provocaría la activación de la protrombina (Keller *et al.*, 2004), actividad que también ha sido descrita para la serina proteasa de 65 kDa (ASP) de *A. sobria* (Nitta *et al.*, 2007). En *A. caviae*, se ha caracterizado una metaloproteasa de 34 kDa (AP34) y una Zn/Fe-metaloproteasa termoestable de 19 kDa (AP19), pero sus papeles en la virulencia están por determinar (Toma *et al.*, 1999; Nakasone *et al.*, 2004). Y, en *A. veronii* bv. *sobria*, se ha observado que la proteasa más importante, una metaloproteasa de 34 kDa (AVP), activa la proaerolisina (Song *et al.*, 2004). En el caso de *A. salmonicida*, la serina proteasa de 64

kDa AspA (Whitby *et al.*, 1992) es necesaria para la activación de la GCAT (glicerofosfolípido colesterol aciltransferasa) (Vipond *et al.*, 1998).

Por otro lado, también existen aminopeptidasas que pueden presentar diversas actividades específicas como el catabolismo de péptidos exógenos, la activación extracelular de la aerolisina o la eliminación de la metionina N-terminal de nuevas cadenas peptídicas sintetizadas (metionina aminopeptidasas) (Pemberton *et al.*, 1997).

#### **1.1.4.7.2.2 Lipasas/Fosfolipasas**

Muchas bacterias patógenas producen lipasas. En *A. hydrophila*, se han encontrado diferentes lipasas, como la Ah65 lipasa/aciltransferasa y otras que muestran elevada homología entre ellas: H3, Apl1 y Lip, la segunda de las cuales presenta actividad fosfolipasa C (Chuang *et al.*, 1997; Pemberton *et al.*, 1997). En cepas de *Aeromonas* del serotipo O:34, se han descrito las fosfolipasas A1 y C. La fosfolipasa C muestra actividad lecitinasa y capacidad citotóxica, y se ha demostrado su papel como factor de virulencia (Merino *et al.*, 1999).

Las *Aeromonas* spp. también producen glicerofosfolípido colesterol aciltransferasas (GCAT), que funcionan como lipasas y pueden provocar lisis en eritrocitos mediante la digestión de sus membranas plasmáticas (Pemberton *et al.*, 1997).

#### **1.1.4.7.3 Toxinas asociadas al sistema de secreción de tipo III**

El sistema de secreción de tipo III (T3SS) (ver apartado 1.1.4.8) es un sistema de transporte de proteínas bacterianas, denominadas efectores, al citoplasma de las células hospedadoras. Las moléculas efectoras llevan a cabo una amplia gama de actividades bioquímicas y modulan la función de moléculas reguladoras cruciales para la célula hospedadora, de manera que son capaces de alterar el citoesqueleto o interferir en las cascadas de señalización intracelular (Mota y Cornelis, 2005).

Se han identificado cuatro proteínas efectoras de T3SS en *A. salmonicida*, AexT, AopP, AopO y AopH (Braun *et al.*, 2002; Dacanay *et al.*, 2006; Fehr *et al.*, 2006), y una en las cepas AH-3 y SSU de *A. hydrophila*, AexT y AexT-like (o AexU), respectivamente (Vilches *et al.*, 2008; Sha *et al.*, 2007; Sierra *et al.*, 2007). La proteína AexT es una toxina bifuncional homóloga de los efectores bifuncionales ExoT/ExoS de *P. aeruginosa*, que presenta actividad ADP-ribosiltransferasa y GAP (*GTPase activating protein*) (Fehr *et al.*, 2007). AopP es miembro de la familia YopJ, un grupo de proteínas efectoras de T3SS que

interfiere con vías de señalización de proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK) y/o con el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (Fehr *et al.*, 2006). Las funciones biológicas de AopO y AopH se desconocen; sin embargo, son homólogos de los efectores de *Yersinia enterocolitica* YopO y YopH, respectivamente.

#### **1.1.4.8 Sistema de secreción de tipo III (T3SS)**

El sistema de secreción de tipo III (T3SS) es un sistema de transporte de proteínas bacterianas, denominadas efectores, al interior de células eucariotas (ver apartado 1.1.4.7.3) y presenta una elevada similitud con el sistema de biogénesis flagelar (Plano *et al.*, 2001).

El T3SS constituye una maquinaria de transporte de proteínas bacterianas, frecuentemente implicadas en patogenicidad, al interior de células eucariotas, hecho que implica su transporte tanto a través de las envueltas bacterianas, como a través de la membrana plasmática y, en algunos casos, de la pared, de las células eucariotas. El T3SS está formado por tres tipos de proteínas: componentes estructurales del sistema de inyección, sustratos de secreción (efectores) y factores reguladores de la expresión de las proteínas estructurales y efectoras. El aparato de inyección está formado por unas 20 proteínas diferentes que se ensamblan entre ellas formando una estructura en forma de aguja que permite la translocación de efectores (Cornelis, 2006), generalmente tras el contacto con la célula hospedadora (Galán y Collmer, 1999).

Se ha caracterizado un T3SS funcional en *A. salmonicida* (Burr *et al.*, 2002; Burr *et al.*, 2003), en la cual se halla codificado en un plásmido termolábil, y en las cepas AH-1, AH-3 y SSU de *A. hydrophila* (Yu *et al.*, 2004; Vilches *et al.*, 2004; Sha *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que el T3SS es esencial, en *A. salmonicida*, para establecer la infección sistémica en peces (Burr *et al.*, 2005) y que es importante en el proceso invasivo y de colonización (Dacanay *et al.*, 2006). En *A. hydrophila* AH-1, AH-3 y SSU, también se ha observado que es un factor importante para su patogenicidad, viéndose reducida su virulencia al inactivar algunos de los genes, tanto en modelos animales como en cultivos celulares (Yu *et al.*, 2004; Vilches *et al.*, 2004; Sha *et al.*, 2005).

Se ha estudiado la presencia del T3SS en diferentes cepas, ambientales y clínicas, de *Aeromonas* spp., y se ha observado una mayor frecuencia en *A. veronii* y *A. hydrophila* respecto a *A. caviae* (Chacón *et al.*, 2004; Vilches *et al.*, 2004).

## 1.2 El lipopolisacárido (LPS)

El lipopolisacárido (LPS), también conocido como endotoxina, es una molécula glucolipídica que representa la estructura mayoritaria de la cara externa de la membrana externa de la mayoría de las bacterias Gram negativas (Funahara y Nikaido, 1980). Es una molécula anfipática constituida por una región polisacárida (polar) unida covalentemente a una estructura lipídica (apolar), altamente conservada, denominada lípido A, que le permite el anclaje a la membrana. La fracción polisacárida suele constar de dos partes: una oligosacárida más interna y conservada, unida al lípido A, conocida como núcleo del LPS, que se puede subdividir en núcleo interno y núcleo externo; y otra polisacárida más externa y variable, anclada al núcleo y denominada polisacárido O, cadena lateral O o antígeno O por sus características inmunogénicas (Fig. 1.1). El antígeno O consiste en la repetición de una subunidad oligosacárida básica que varía en función de las diversas especies y serotipos y que puede estar formada por un único tipo de monosacárido, o por diferentes, constituyendo subunidades lineales o ramificadas. Estas tres regiones (lípido A, núcleo del LPS y antígeno O), divididas en base a su estructura química, también se diferencian en sus rutas biosintéticas, en las agrupaciones génicas implicadas en su biosíntesis y en el grado de conservación.

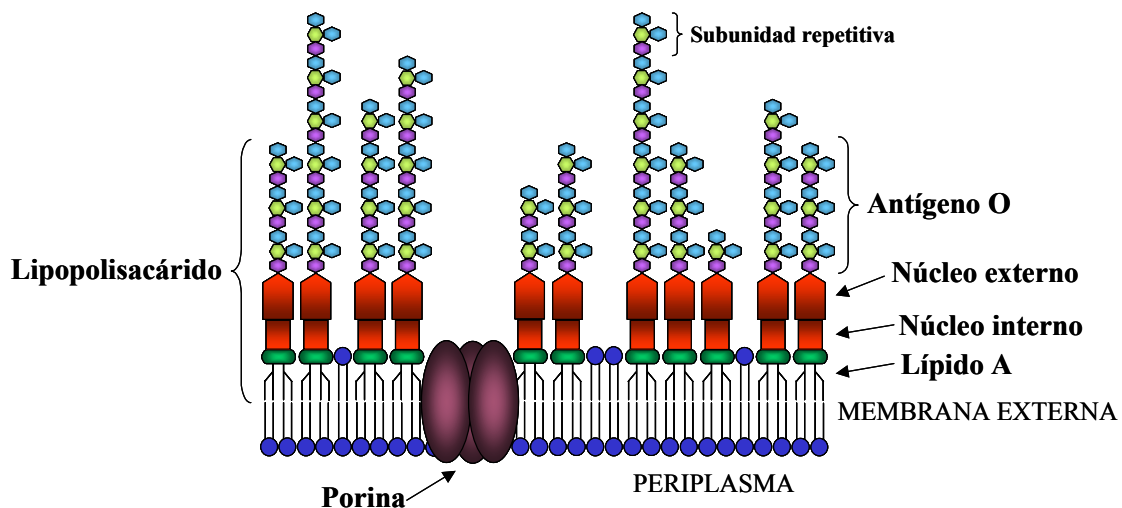


Figura 1.1. Esquema de la estructura y disposición del LPS en la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

La variabilidad estructural del LPS disminuye gradualmente desde el antígeno O hasta el lípido A. La elevada conservación de las características generales del lípido A y del núcleo interno puede ser reflejo de las restricciones impuestas por su papel en el

mantenimiento de la integridad de la membrana externa, mientras que las estructuras más superficiales están sometidas a una mayor presión evolutiva ejercida tanto por el ambiente como por la interacción con el sistema inmune del hospedador (Heinrichs *et al.*, 1998). Esta variabilidad se correlaciona con la amplia diversidad de los genes implicados en su biosíntesis.

Las moléculas de LPS extraídas a partir de un mismo cultivo celular muestran heterogeneidad en sus tamaños. Algunas familias, como *Enterobacteriaceae*, producen comúnmente moléculas de LPS que presentan el antígeno O unido al núcleo, con diversas longitudes de cadena, conocidas como LPS de tipo S (*Smooth*). Sin embargo, también se pueden encontrar algunas moléculas que sólo contienen el lípido A y el núcleo, completo o truncado, denominadas LPS de tipo R (*Rough*). Estos dos términos se deben al aspecto que presentan las colonias bacterianas, de fenotipo liso las que producen S-LPS y con bordes rugosos, en el caso del R-LPS (Whitfield *et al.*, 1997).

### **1.2.1 Importancia biológica**

El LPS tiene un papel muy importante en el mantenimiento y la organización de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Dicha membrana está formada por una bicapa lipídica asimétrica, la cara interna de la cual está constituida por fosfolípidos, mientras que la cara externa está formada, principalmente, por el LPS, cuyo componente hidrófobo, el lípido A, forma la parte exterior de esta bicapa y queda oculto por los componentes sacarídicos (Fig. 1.1). Su contacto directo con el medio lo convierten en un importante antígeno de superficie y en una de las principales dianas de bacteriófagos, así como del sistema de defensa del organismo hospedador.

El LPS también es responsable de la resistencia de las bacterias Gram negativas a determinadas moléculas. El núcleo y el antígeno O crean una barrera hidrofílica (Snyder *et al.*, 1999) difícilmente penetrable por compuestos o antibióticos hidrofóbicos que, además, también debilita la efectividad de los péptidos policatiónicos, los cuales quedan atrapados mediante interacciones electrostáticas con las cargas negativas del LPS y pueden formar autoagregados, evitándose su acceso a la membrana (Andră *et al.*, 2004; Papo y Shai, 2005).

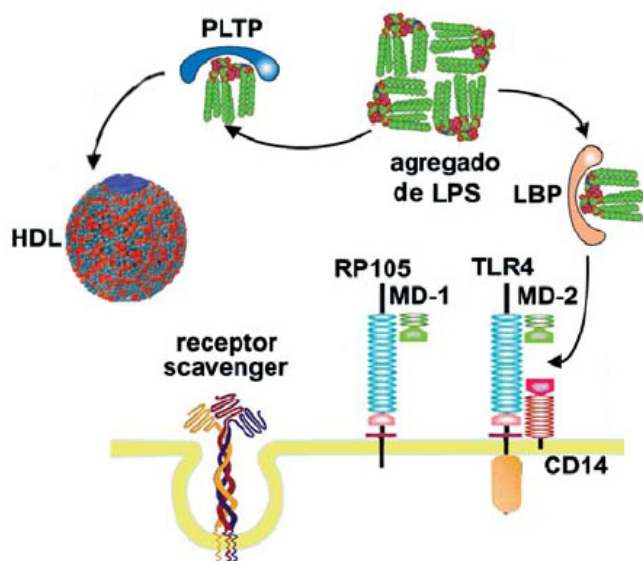
El LPS es un importante factor de virulencia en bacterias Gram negativas patógenas. Por un lado, el lípido A, la única región del LPS reconocida por el sistema inmune innato,

es el responsable de la actividad endotóxica del LPS (Rietschel *et al.*, 1996) y puede llegar a provocar una importante inflamación sistémica conocida como *shock* séptico o endotoxemia. Las moléculas de LPS, que se liberan durante la división o muerte bacteriana, provocan la activación del sistema inmune para hacer frente a la infección. Sin embargo, en algunos casos, la activación continuada e incontrolada produce una respuesta excesiva en la secreción de citoquinas que, junto con las anafilatoxinas que se hayan podido generar en la cascada del complemento, son responsables del proceso inflamatorio. La respuesta sistémica que se produce se caracteriza por una elevada concentración de citoquinas proinflamatorias en sangre, especialmente del TNF- $\alpha$  (*Tumoral Necrosis Factor  $\alpha$* ), principal causante de los efectos patológicos del *shock* séptico, tales como daños en el endotelio, pérdida del tono vascular, coagulopatías e insuficiencia multiorgánica que, muchas veces, lleva a la muerte (Cohen, 2002). Por otro lado, la presencia de las cadenas polisacáridicas del antígeno O facilita el proceso inicial de adhesión (Merino *et al.*, 1996c) y colonización de las mucosas (Merino *et al.*, 1996d). Además, actúa de barrera física impidiendo la correcta activación del complemento, confiriendo resistencia a la actividad bactericida del suero no inmune, debido a que sobre las cadenas más largas del antígeno O del LPS, no recubiertas por el polisacárido capsular, se deposita el componente C3b del complemento lejos de la membrana, lo que previene la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b-9) que provoca la lisis celular y la muerte bacteriana (Merino *et al.*, 1991; Merino *et al.*, 1992a).

### **1.2.1.1 Receptores humorales y celulares del LPS**

Se han reconocido diversos receptores humorales del LPS entre los cuales hay que destacar la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP), la lipoproteína de alta densidad (HDL), la proteína de unión a LPS (LBP) y el receptor CD14 soluble (CD14s). La PLTP, implicada en el intercambio de lípidos entre distintas partículas lipoproteicas plasmáticas, se une al LPS y lo transfiere de la membrana bacteriana o de los agregados de LPS a las HDL, las cuales lo neutralizan dando lugar a una función destoxicadora (Chaby, 2004). La LBP reconoce al lípido A y entrega el LPS al receptor CD14 de la membrana de monocitos, macrófagos y neutrófilos, facilitando la detección de pequeñas cantidades de LPS (Rietschel *et al.*, 1996) (Fig. 1.2). Además, la LBP también transfiere el LPS al receptor CD14 soluble (CD14s) formando un complejo que puede transportar el LPS a partículas lipoproteicas o a las células, de manera que las células endoteliales, las

cuales no expresan el receptor CD14 celular, pueden ser activadas y producir citoquinas (Frey *et al.*, 1992; Dauphinee y Karsan, 2006). Por otro lado, la LBP, a elevadas concentraciones, inhibe la estimulación celular producida por el LPS, lo que puede ser debido, en parte, a la neutralización por las partículas lipoproteicas a las que es capaz de transferirlo (Wurfel *et al.*, 1994). Debido a sus diferentes funciones, la LBP juega un importante papel en la respuesta inmune producida por el LPS (Zweigner *et al.*, 2006).



**Figura 1.2.** Esquema con algunos de los receptores de membrana y extracelulares del LPS. Figura adaptada de Chaby, 2004.

Otras moléculas plasmáticas que se unen al LPS son diferentes constituyentes de las tres vías del complemento. La región polisacáridica es reconocida por el componente C3b, produciendo la activación de la vía alternativa; la lectina de unión a manosa (MBL) reconoce residuos de manosa repetidos que pueden estar contenidos en el antígeno O y activa la vía de la lectina; y la región del lípido A activa la vía clásica mediante la interacción con los componentes C1q y C3b (Chaby, 2004).

Los péptidos antimicrobianos, defensinas y catelicidinas, secretados por células epiteliales y fagocíticas, interactúan también con el LPS de la superficie bacteriana debido a sus cargas positivas y a sus residuos polares, desplazando los cationes divalentes que neutralizan las cargas negativas de las moléculas de LPS. De esta manera, reducen la respuesta proinflamatoria, ya que el LPS no puede ser reconocido por la LBP (Rosenfeld y Shai, 2006).

El Factor XII es otra de las proteínas solubles que se unen al LPS y se activa dando lugar a la vía de coagulación intrínseca de la sangre (Morrison y Cochrane, 1974), lo que, en exceso, puede originar una coagulación intravascular diseminada.



A nivel celular, CD14 concentra las moléculas de LPS para favorecer su unión al complejo formado por el receptor *Toll-like 4* (TLR4) y la proteína adaptadora extracelular MD-2 (proteína de diferenciación mieloide 2) (Miller *et al.*, 2005). MD-2 es el lugar de unión del LPS al complejo y es necesaria para la transducción de señales (Nagai *et al.*, 2002) (Fig. 1.2). Como consecuencia, se activan vías de señalización que conducirán a la síntesis y la secreción de mediadores de la inflamación, como el TNF- $\alpha$  o la interleuquina IL1- $\beta$ , y de moléculas requeridas para la activación de la respuesta inmune adaptativa (Raetz y Whitfield, 2002). En consecuencia, se estimula la fagocitosis y se activa la proliferación, diferenciación y secreción de anticuerpos en los linfocitos B.

Recientemente, se ha descrito que el complejo formado por RP105, parecido estructuralmente a TLR4 pero sin el dominio de señalización citoplasmático, y la molécula MD-1, similar a su homóloga MD-2, se expresa, no sólo en los linfocitos B, de los que se creía exclusivo, sino también en macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Su papel en la señalización producida por el LPS, en estas últimas, no es debido al reconocimiento directo del mismo sino a la interacción con el complejo TLR4/MD-2, inhibiendo su capacidad de unión con el ligando. En las células B, sin embargo, la interpretación fue que RP105 facilitaba la señalización mediada por TLR4, de manera que su función se sigue estudiando (Divanovic *et al.*, 2007).

El receptor *scavenger* SR-A es otra de las moléculas de la membrana de los macrófagos implicada en el reconocimiento del LPS, lo que induce su posterior internalización y eliminación de la sangre (Hampton *et al.*, 1991).

Si bien todos los efectos provocados por el LPS son necesarios para la eliminación de infecciones localizadas, la excesiva estimulación sistémica producida en el caso de una infección severa puede provocar un *shock séptico*, acompañado de daños irreversibles en vasos sanguíneos y órganos.

## **1.2.2 El lípido A**

### **1.2.2.1 Características principales del lípido A**

El lípido A es el responsable de las propiedades endotóxicas del LPS y constituye su punto de anclaje hidrofóbico en la monocapa externa de la membrana externa de la mayoría de bacterias Gram negativas. Es la región más conservada del LPS, con pequeñas variaciones interespecíficas. Su presencia resulta indispensable para la viabilidad de la

mayoría de bacterias Gram negativas, dado su importante papel en la integridad de la membrana externa, siendo el responsable de su ensamblaje e interactuando con algunas proteínas de esta membrana de forma específica, de manera que contribuye, probablemente, a su correcto plegamiento (de Cock *et al.*, 1999; Ferguson *et al.*, 2000). La interacción con cationes divalentes de las cargas negativas de los grupos fosfato del lípido A, de los grupos carboxilo de las moléculas de ácido 3-desoxi-D-*mano*-2-octulosónico (Kdo) que lleve unidas, y, posiblemente, también, de otros azúcares más distales que pueda haber, es indispensable para la estabilización de la membrana externa. De esta manera, las moléculas de LPS adyacentes interaccionan fuertemente, hecho que disminuye, además, la permeabilidad de dicha membrana (Nikaido *et al.*, 2003).

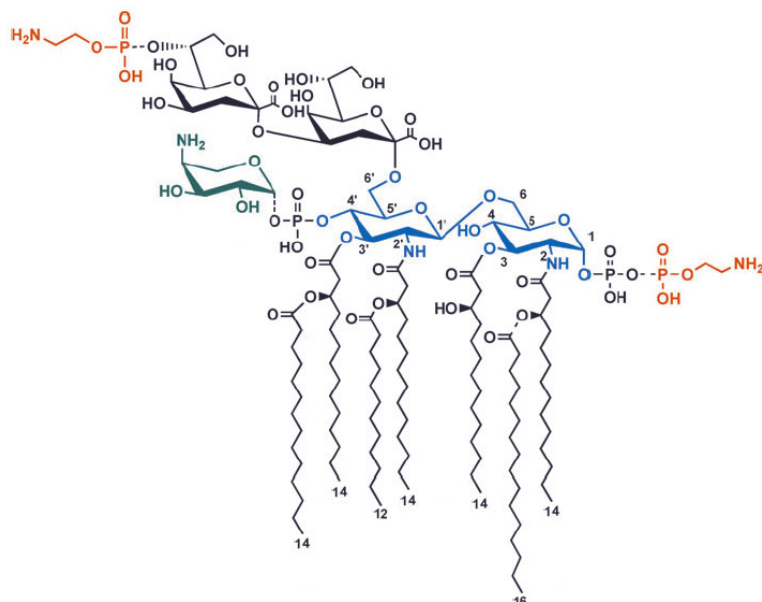
Debido a que se trata de una molécula indispensable para la mayoría de las bacterias Gram negativas, a su elevada conservación y a su papel como componente tóxico de la endotoxina, se ha desarrollado un gran interés en su biosíntesis, con el fin de analizar los motivos implicados en su toxicidad y desarrollar nuevos fármacos contra el *shock* séptico (Rietschel *et al.*, 1996; Onishi *et al.*, 1996).

### 1.2.2.2 Estructura química del lípido A

La mayoría de las bacterias Gram negativas sintetizan un lípido A muy similar al de *E. coli*. Su estructura química básica consiste en un disacárido de glucosamina (GlcN) ligado mediante un enlace  $\beta(1-6)$ , fosforilado en las posiciones 1 y 4' y acilado con residuos de *R*-3-hidroxi-*miristato* en las posiciones 2, 3, 2' y 3' del disacárido. Los grupos hidroxilo de los acilos de las posiciones 2' y 3' se encuentran esterificados con otros dos grupos acilo de 12 átomos de carbono (*laureato*) ó 14 (*miristato*), respectivamente. La molécula está glicosilada en la posición 6' por los residuos del Kdo, que ya corresponden al núcleo del LPS (Raetz y Whitfield, 2002) (Fig. 1.3).

Aunque la estructura del lípido A presenta un alto grado de conservación, puede verse modificada como respuesta a cambios ambientales. Muchas de las enzimas necesarias para la modificación covalente del lípido A se sitúan en el periplasma o en la membrana externa, a diferencia de las enzimas implicadas en su biosíntesis. En *E. coli* y *Salmonella enterica* sv. Typhimurium (*S. typhimurium*), se han descrito diversas modificaciones que consisten en la adición de grupos de fosfoetanolamina (PEtN), 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (L-Ara4N), grupos difosfato y palmitato (16 átomos de carbono); en la sustitución del *laureato* por el *palmitoleato* (en *E. coli*); y en la

hidroxilación o la eliminación de alguna cadena de miristato (en *Salmonella*) (Raetz *et al.*, 2007) (Fig. 1.3).



**Figura 1.3.** Estructura química del Kdo<sub>2</sub>-lípidio A de *E. coli* K-12 y sus modificaciones covalentes más frecuentes. En negro se indican las moléculas de Kdo, las cadenas aciladas y los fosfatos; en azul, el dímero de glucosamina; en rojo, la PEtN; y, en verde, la L-Ara4N. Figura adaptada de Raetz *et al.*, 2007.

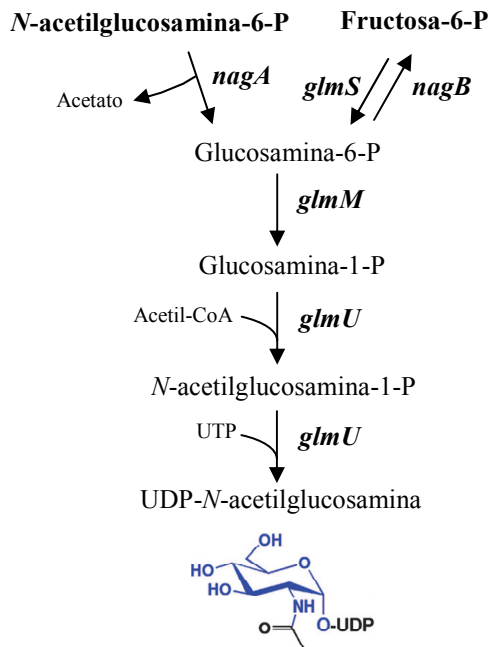
En el caso de *Aeromonas hydrophila* AH-3 (serotipo O:34), el lípidio A está constituido también por un disacárido de GlcN, unidas mediante un enlace  $\beta(1-6)$ , cuyos grupos fosfato en las posiciones 1 y 4' presentan sustituciones con residuos de L-Ara4N (Knirel *et al.*, 2004). Respecto a su estructura acilada, se han descrito cambios como consecuencia de una adaptación térmica, de forma que a elevadas temperaturas (37°C) se produce un incremento de los niveles de ácidos grasos hidroxilados y saturados (principalmente, 2-hidroxilaureato, 3-hidroxilaureato, 2-hidroximiristato, laureato y palmitato) (Merino *et al.*, 1992c).

### 1.2.2.3 Biosíntesis del lípidio A

La ruta biosintética del lípidio A es un proceso que tiene lugar en el citoplasma y en la cara citoplasmática de la membrana interna. La de *E. coli* es la mejor caracterizada pero las nueve enzimas constitutivas implicadas están altamente conservadas en la mayoría de las bacterias Gram negativas (Raetz y Whitfield, 2002). *Sphingomonas paucimobilis* constituye una de las excepciones, debido a que su membrana externa contiene glicosfingolípidos en lugar de lípidio A (Kawasaki *et al.*, 1994).

Uno de los primeros precursores que se necesitan es la UDP-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), cuya formación la lleva a cabo la enzima bifuncional GlmU que acetila la

GlcN-1-P y, posteriormente, activa la GlcNAc (Mengin-Lecreux y Heijenoort, 1994) (Fig. 1.4). Se trata de un precursor que participa en varias rutas biosintéticas, entre ellas, la formación del peptidoglicano y la síntesis de algunos antígenos O.

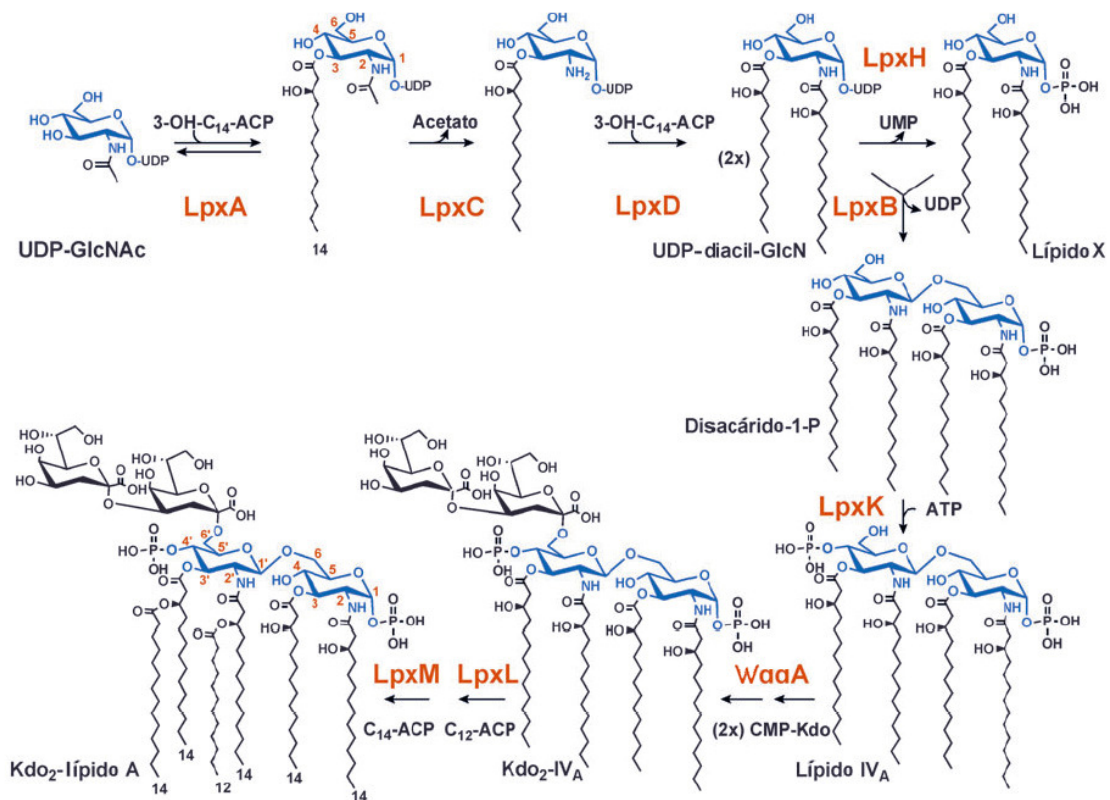


**Figura 1.4.** Ruta de biosíntesis de la UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). Figura adaptada de Mengin-Lecreux y Heijenoort, 1996.

La reacción inicial en la biosíntesis del lípido A está catalizada por la aciltransferasa LpxA y consiste en la acilación de la UDP-GlcNAc en la posición 3 con *R*-3-hidroximiristato, el cual tiene que estar unido a la proteína transportadora de grupos acilo ACP (*Acil Carrier Protein*) como dadora del sustrato. *Leptospira interrogans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Legionella pneumophila*, entre otras, contienen una deshidrogenasa (GnnA) y una transaminasa (GnnB) que, en dos reacciones sucesivas, convierten la UDP-GlcNAc en su análogo UDP-GlcNAc3N (UDP-2-acetamido-3-amino-2,3-didesoxiglucosa), sobre el que se produce la acilación con LpxA (Sweet *et al.*, 2004).

A continuación, actúa la desacetilasa LpxC liberando el grupo acetilo de la posición 2, lo que significa la primera reacción irreversible de la vía. Seguidamente, una segunda aciltransferasa, LpxD, transfiere un segundo grupo *R*-3-hidroximiristato, formando la UDP-2,3-diacil-GlcN. Estas tres enzimas, LpxA, LpxC y LpxD, presentan una localización citoplasmática. La pirofosfatasa LpxH genera, a continuación, el lípido X (2,3-diacil-GlcN-1-P) y la disacárido sintasa LpxB cataliza el enlace glicosídico  $\beta(1'-6)$  entre una molécula de UDP-2,3-diacil-GlcN y el lípido X. LpxB y LpxH son proteínas periféricas de la membrana y las cuatro enzimas que actúan a continuación son proteínas integrales de la

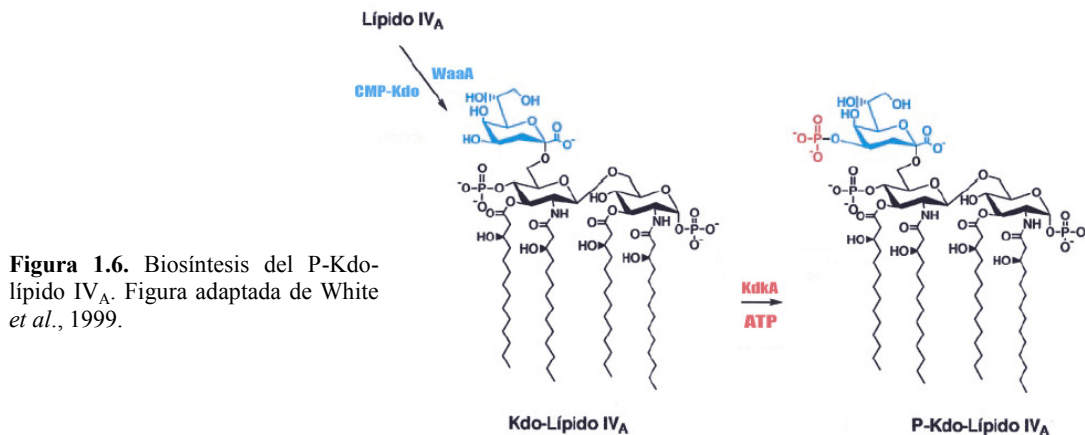
membrana interna. Una vez formado el disacárido, la quinasa LpxK lo fosforila en la posición 4' y forma la molécula conocida como lípido IV<sub>A</sub>. La transferencia del primer residuo de Kdo (KdoI) a la segunda GlcN mediante un enlace  $\alpha(2-6')$ , a partir del azúcar nucleótido CMP-Kdo, es catalizada por la Kdo transferasa, proteína integral de la membrana interna, codificada por el gen *waaA*. Se trata de una enzima bifuncional en *E. coli* ya que añade dos residuos de Kdo, el segundo (KdoII) mediante un enlace  $\alpha(2-4)$  con el primero. Esta reacción constituye el primer paso para la biosíntesis del núcleo del LPS. En *E. coli*, la biosíntesis del lípido A se completa con la acción de dos aciltransferasas, LpxL y LpxM, que catalizan la transferencia de laureato y miristato, respectivamente, a los acilos de la segunda GlcN (Raetz y Whitfield, 2002; Trent, 2004) (Fig. 1.5).



**Figura 1.5.** Ruta constitutiva de la biosíntesis del Kdo<sub>2</sub>-lípido A en *E. coli* K-12. Figura adaptada de Raetz *et al.*, 2007.

Durante la biosíntesis del lípido A, en los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, se añaden dos moléculas de Kdo al lípido IV<sub>A</sub>. Muchas otras bacterias Gram negativas también contienen un lípido A glicosilado con dos moléculas de Kdo (Rietschel *et al.*, 1992). Sin embargo, en *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae*, *Bordetella* spp., *Shewanella putrefaciens* y otras especies, la enzima WaaA incorpora un

único residuo de Kdo, tratándose en estos casos, de una enzima monofuncional. Además, este único Kdo está fosforilado en la posición 4, ocupada normalmente por el segundo Kdo en la mayoría de bacterias Gram negativas, gracias a la quinasa dependiente de ATP, asociada a la membrana interna, KdkA (*Kdo kinase A*) (White *et al.*, 1999) (Fig. 1.6).



**Figura 1.6.** Biosíntesis del P-Kdo-lípido IV<sub>A</sub>. Figura adaptada de White *et al.*, 1999.

En *Pasteurella multocida*, han sido descritos, recientemente, los dos tipos de lípido A glicosilado, de manera que se expresan dos glicoformas simultáneas del núcleo de su lipooligosacárido (LOS) (ver apartado 1.2.3.1). La predominante contiene un único Kdo fosforilado y la segunda está formada por dos residuos de Kdo. Esto es debido a la expresión simultánea de una Kdo transferasa bifuncional, una Kdo quinasa que fosforila a una tasa elevada y dos heptosiltransferasas I diferentes (ver apartado 1.2.3.3). Otras especies como *Mannheimia haemolytica* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* parecen contener también los mismos genes en su genoma, aunque sólo en el primer caso se ha encontrado más de una glicoforma (Harper *et al.*, 2007).

Por otro lado, aunque el LPS de *Helicobacter pylori* contiene un único Kdo no fosforilado, su Kdo transferasa es bifuncional. La eliminación del KdoII tiene lugar a nivel periplasmático mediante la acción de una enzima unida a la membrana con actividad Kdo hidrolasa (Stead *et al.*, 2005), actividad que también ha sido descrita en membranas de *Francisella novicida* (Wang *et al.*, 2004a).

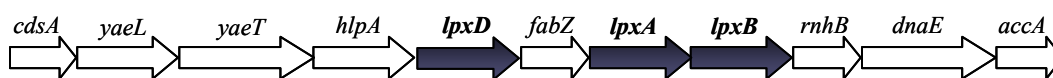
#### 1.2.2.4 Organización genética del lípido A

El sistema de síntesis del lípido A se encuentra altamente conservado y los genes que codifican para las diversas enzimas de la ruta biosintética son de copia única en la mayoría de bacterias (Raetz y Whitfield, 2002). *Legionella pneumophila* es la única en la que se

han descrito parálogos para varios de los genes implicados en la biosíntesis de su lípido A (Albers *et al.*, 2007).

La mayoría de los genes necesarios para su producción se encuentran dispersos a lo largo del genoma bacteriano debido al hecho de compartir intermediarios con otras rutas de biosíntesis de macromoléculas. Sólo algunos de ellos (*lpxA*, *lpxB* y *lpxD*) se han visto agrupados en un operón complejo que se denominó, inicialmente, Operón de Síntesis Macromolecular II (OSMII) en el que, entre sus once genes, también se localizan genes para la replicación del ADN y la biosíntesis de glicerofosfolípidos (Tomasiewicz, 1990) (Fig. 1.7). Posteriormente, fueron también identificados en esta agrupación genes necesarios para la biogénesis de la membrana externa, implicados en el transporte y ensamblaje de proteínas de membrana externa (OMP) y en la regulación de la respuesta al choque térmico mediada por el factor  $\sigma^E$  (Genevrois *et al.*, 2003; Bos *et al.*, 2007).

Los genes *lpxD* y *lpxA*, que codifican aciltransferasas, se hallan separados por el gen *fabZ* que codifica una *R*-3-hidroxiiristoil deshidratasa relacionada con la biosíntesis de palmitato. De esta manera, tres genes que codifican enzimas que utilizan el mismo sustrato se hallan agrupados y, presuntamente, corregulados (Schnaitman y Klena, 1993). El gen *lpxB*, que codifica la disacárido sintasa, se halla localizado inmediatamente a continuación del gen *lpxA*, de manera que en *E. coli* existe solapación entre el codón de terminación de uno y el de inicio de la transcripción del otro, lo que sugiere que se transcriben y traducen de forma acoplada (Crowell *et al.*, 1987). Por otro lado, ha sido identificada una secuencia promotora dependiente del factor  $\sigma^E$  en la región 5' del gen *hlpA* (*skp*), que codifica una chaperona periplasmática de OMP, y en la región 5' del gen *lpxD*. Los genes transcritos a partir de ellas formarían parte del regulón  $\sigma^E$  de *E. coli* que se induce por la acumulación de proteínas no plegadas correctamente en el periplasma o alteraciones en la estructura del lípido A, con el fin de responder a diferentes situaciones de estrés que alteren la membrana (Dartigalongue *et al.*, 2001; Tam y Missiakas, 2005).



**Figura 1.7.** Esquema del operón OSMII en *E. coli* K-12. Los genes implicados en la biosíntesis del lípido A están sombreados. Figura adaptada de Genevrois *et al.*, 2003.

La secuenciación del genoma de *H. influenzae*, entre muchos otros, puso de manifiesto el elevado grado de conservación de los genes *lpx*, ya que mantienen incluso el

mismo orden dentro del operón y pueden sustituir funcionalmente a los genes de *E. coli* (Servos *et al.*, 1996).

El resto de genes se localizan en diferentes regiones del cromosoma. El gen *lpxC*, que codifica la desacetilasa, se encuentra en el extremo 3' de una gran agrupación de genes relacionados con la división celular y con la secreción de proteínas (Schnaitman y Klena, 1993). Por otro lado, el gen *lpxK*, que codifica la quinasa que permite la formación del lípido IV<sub>A</sub>, está localizado en un operón junto con el gen *msbA*, implicado en las etapas iniciales de la exportación del lípido A y de los fosfolípidos (Garrett *et al.*, 1997).

Los genes implicados en la vía constitutiva de biosíntesis del lípido A son los más conservados, mientras que los que codifican las enzimas implicadas en su modificación covalente muestran una mayor variabilidad (Raetz y Whitfield, 2002).

### **1.2.2.5 Lípido A y viabilidad celular**

La mínima estructura del LPS requerida para la viabilidad de la mayoría de las bacterias Gram negativas es la constituida, normalmente, por dos moléculas de Kdo unidas al lípido A (Kdo<sub>2</sub>-lípido A), conocida como quimiotipo Re del LPS, como en el caso de *E. coli* y de *S. typhimurium* (Belunis *et al.*, 1995; Goldman *et al.*, 1988). *E. coli* puede sobrevivir también con un único Kdo unido al lípido A al reemplazar su WaaA bifuncional por la enzima monofuncional de *Haemophilus* junto con la coexpresión de la Kdo kinasa KdkA de éste (Brabetz *et al.*, 2000). La presencia de dos grupos cargados negativamente, y por consiguiente, de la molécula de Kdo, parece ser un requisito fundamental para el mantenimiento de la integridad de la membrana externa y la viabilidad celular. La falta de alguno de los enzimas implicados en la biosíntesis del Kdo (ver apartado 1.2.3.3) o de la Kdo transferasa resulta en un mutante no viable en la mayoría de los casos (Raetz y Whitfield, 2002).

Las moléculas de Kdo estabilizan la membrana externa participando en la unión con cationes divalentes junto con las cargas negativas de los grupos fosfato del lípido A. Esto permite la interacción lateral entre moléculas de LPS adyacentes, de manera que se crea una barrera impermeable a la difusión de moléculas hidrofóbicas y péptidos catiónicos. En la creación de esta barrera y en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa también son importantes las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas aciladas saturadas del lípido A, manteniendo un bajo grado de fluidez (Nikaido *et al.*, 2003).



En *E. coli* y *S. typhimurium*, la acción de LpxL y LpxM requiere de la presencia del disacárido de Kdo en el lípido A para poder completar el proceso de acilación. Precursores no acilados completamente o no glicosilados que fuesen transportados comprometerían la estabilidad y la permeabilidad de la membrana externa. Mutantes en la síntesis de Kdo de *S. typhimurium* presentan sensibilidad a la temperatura de crecimiento y acumulación del lípido IV<sub>A</sub> tetraacilado en las condiciones no permisivas (Rick y Young, 1982), al igual que el mutante de *E. coli* en la Kdo transferasa (Belunis *et al.*, 1995).

Sin embargo, el orden de acilación no es universal. En *Pseudomonas aeruginosa*, la acilación precede a la adición del Kdo (Mohan y Raetz, 1994) y en *Neisseria meningitidis* parece ocurrir lo mismo, dada la descripción de un mutante en su Kdo transferasa que es viable y expresa un lípido A completamente acilado (Tzeng *et al.*, 2002a). Mutantes viables sin esta enzima también han sido conseguidos en *Yersinia pestis* (Tan y Darby, 2005) y en *Moraxella catarrhalis* (Peng *et al.*, 2005a). En todos estos casos, los mutantes presentan tasas de crecimiento muy reducidas, pero la presencia de Kdo no es esencial para su viabilidad. Mutantes en el gen *kdsD*, que codifica la D-arabinosa-5-fosfato isomerasa implicada en la biosíntesis del Kdo, son también viables en *N. meningitidis* (Tzeng *et al.*, 2002b) y *Y. pestis* (Tan y Darby, 2005), a pesar de la ausencia de un lípido A glicosilado. Por otro lado, también han sido descritas mutaciones en el gen *lpxA* de *N. meningitidis* (Steeghs *et al.*, 1998; Bos y Tommassen, 2005) y *M. catarrhalis* (Peng *et al.*, 2005b) que implican la falta total de lípido A pero resultan en un fenotipo viable, capaz de ensamblar la membrana externa, aunque con alteraciones en la composición de fosfolípidos y la ausencia de algunas lipoproteínas (Steeghs *et al.*, 2001).

Ante todos estos datos, la mínima estructura del LPS requerida para el crecimiento y la viabilidad de *E. coli* fue redefinida recientemente. Mediante la delección de los dos genes de *E. coli* que codifican una D-arabinosa-5-fosfato isomerasa (*kdsD* y *gutQ*) y la aparición de una mutación supresora, se obtuvo una cepa mutante viable con una tasa de crecimiento reducida y con el lípido IV<sub>A</sub> formando parte de su membrana interna y externa, de manera que esta estructura sería suficiente para el ensamblaje de la membrana externa (Meredith *et al.*, 2006). Se sugirió que la supresión del fenotipo letal por la falta de Kdo podría ser debida a una mutación que permitiera el transporte del lípido IV<sub>A</sub> desde la membrana interna, a una tasa basal suficiente para evitar los efectos tóxicos secundarios debidos a su acumulación, proporcionando una cantidad suficiente de precursores del LPS para que la membrana externa se pudiera formar. Mutaciones puntuales en el transportador del LPS

MsbA (ver apartado 1.2.3.3) de la membrana interna compensan este fenotipo letal (Mamat *et al.*, 2008).

## 1.2.3 El núcleo del LPS

### 1.2.3.1 Características principales del núcleo del LPS

El núcleo del LPS es un oligosacárido heterogéneo unido al lípido A en la posición 6'. En bacterias que producen LPS de tipo S, se encuentra dividido en dos regiones: el núcleo interno, próximo al lípido A, y el núcleo externo, donde normalmente se une el antígeno O. Algunos patógenos de las mucosas, como *Neisseria*, *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Pasteurella*, *Moraxella* o *Campylobacter* producen, sin embargo, una molécula denominada lipooligosacárido (LOS) que contiene un núcleo interno desde el que se extienden una o más ramificaciones mono u oligosacarídicas, que equivaldrían al núcleo externo, y carecen de antígeno O.

El núcleo del LPS está implicado de forma indirecta en la virulencia al ser el lugar de anclaje del antígeno O, aunque también se ha descrito una posible relación con la adhesión de ciertas bacterias a células del hospedador (Jacques, 1996). Por otro lado, mediante estudios realizados en *E. coli* y *Vibrio*, se ha descrito que la región del LPS a la que se unen toxinas que son secretadas, y que permanecen asociadas a la superficie bacteriana, es la constituida por las dos moléculas de Kdo del núcleo o por una sola desfosforilada (Horstman *et al.*, 2004). En el caso de *Klebsiella pneumoniae*, se ha demostrado la implicación del núcleo del LPS en la unión de la cápsula a la superficie celular bacteriana (Fresno *et al.*, 2006) y, en *S. enterica* serovar Typhi, parece que es necesaria la presencia de una glucosa terminal en el núcleo de su LPS para el reconocimiento de la bacteria y su internalización en las células epiteliales (Hoare *et al.*, 2006).

Dentro de un género o familia bacteriana, la estructura del núcleo interno tiende a estar bien conservada. Las similitudes estructurales en bacterias lejanamente relacionadas se atribuyen a su importante papel en la organización de la membrana externa (Heinrichs *et al.*, 1998). Las cargas negativas de los grupos carboxilo de las moléculas de Kdo, así como las de los grupos fosfato que modifican las primeras heptosas que forman el núcleo interno, en el caso de *E. coli* y *Salmonella*, constituyen un lugar de unión con cationes divalentes permitiendo la interacción entre moléculas de LPS adyacentes (Yethon *et al.*, 2000). La falta de estos grupos fosfato, o de los residuos de heptosa a los que se unen, provoca

grandes cambios en la composición y la estructura de la membrana, que se traducen en un fenotipo pleiotrópico, conocido como *deep-rough*, que consiste, entre otros, en una importante reducción de la cantidad de proteínas de la membrana externa y un aumento de la de fosfolípidos; en una hipersensibilidad a antibióticos catiónicos (como la polimixina), detergentes y otros compuestos hidrófobos; y en la liberación de enzimas periplasmáticas al medio (Schnaitman y Klena, 1993). En *P. aeruginosa*, en cambio, la pérdida de estos grupos fosfato o de las heptosas del núcleo interno impide su viabilidad (Walsh *et al.*, 2000). Por otro lado, *K. pneumoniae* no presenta grupos fosfato en el núcleo interno del LPS y son las cargas negativas de los grupos carboxilo de los ácidos galacturónicos (GalA) del núcleo las que contribuyen al mantenimiento de la membrana externa y a la resistencia a compuestos hidrofóbicos (Izquierdo *et al.*, 2003a; Frirdich *et al.*, 2005). Además, estos ácidos galacturónicos juegan un papel esencial en la unión de la cápsula a la superficie bacteriana mediante una interacción iónica en cepas de *K. pneumoniae* (Fresno *et al.*, 2006; Fresno *et al.*, 2007).

El núcleo externo muestra una mayor diversidad estructural al ser una región más expuesta a las presiones selectivas del medio, de bacteriófagos y del sistema inmune del hospedador. Sin embargo, esta variabilidad dentro de una especie, o incluso un género, es limitada en comparación con la hipervariabilidad del antígeno O, lo que ofrece la posibilidad de utilizar el núcleo del LPS como vacuna que proteja, a la vez, contra diferentes especies de Gram negativas. Para ello, han sido estudiadas distintas estrategias tales como la utilización del núcleo como antígeno para la vacuna (Stanislavsky *et al.*, 1997; Cross *et al.*, 2004), para la preparación de vacunas basadas en anticuerpos (Müller-Loennies *et al.*, 2007), en anticuerpos anti-idiotipo (Field y Morrison, 1994) o en liposomas (Bennett-Guerrero *et al.*, 2000).

### 1.2.3.2 Estructura química del núcleo del LPS

El núcleo del LPS es un oligosacárido sin unidades de repetición unido al lípido A mediante un residuo de Kdo (KdoI). El núcleo interno está formado, principalmente, por Kdo y heptosas, normalmente en su configuración *L-glicero-D-mano*-heptosa (L,D-Hep). En algunos casos, como *Acinetobacter haemolyticus* o *Y. pestis*, un derivado del Kdo, el ácido *D-glicero-D-talo-2*-octulosónico (Ko) está también presente, pudiendo reemplazar al KdoI o al KdoII, respectivamente (Vinogradov *et al.*, 1997; Vinogradov *et al.*, 2002c), pero todavía no se conoce su ruta biosintética ni la regulación de su expresión en el LPS.

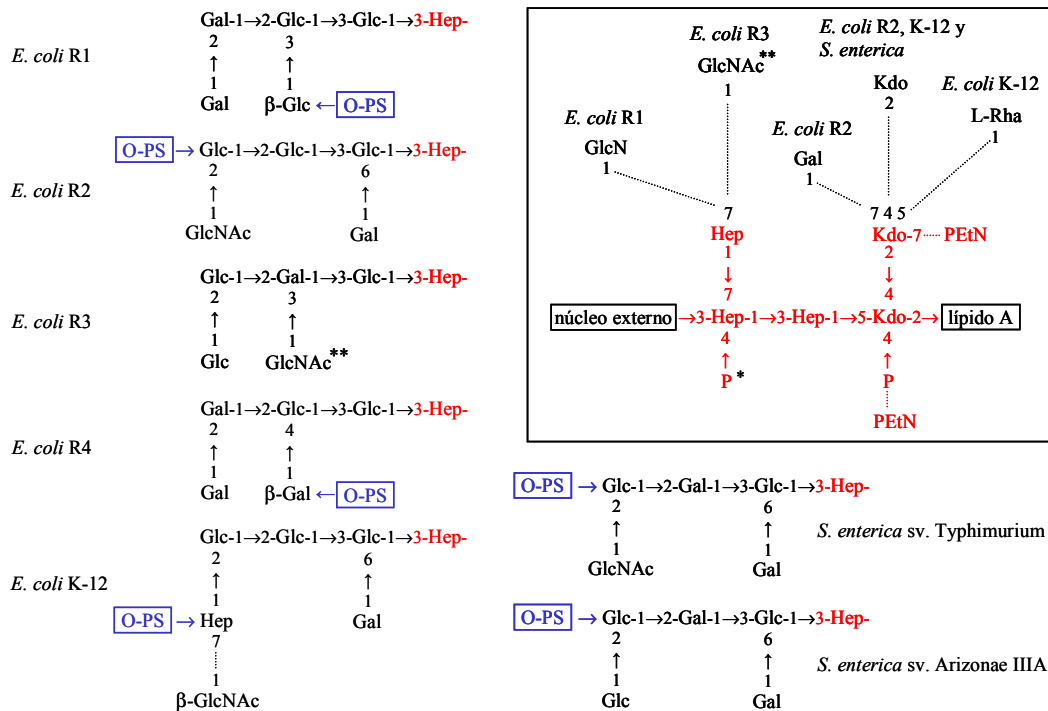
Algunas bacterias como *Shewanella putrefaciens* contienen heptosas sólo en forma de D-glicero-D-mano-heptosa (D,D-Hep) (Vinogradov *et al.*, 2002a) y, en casos como el de *Rhizobium* o *Francisella tularensis*, entre otras, carecen incluso de ellas (Forsberg y Carlson, 1998; Vinogradov *et al.*, 2002b).

El núcleo externo está formado, mayoritariamente, por hexosas, entre las cuales se hallan, normalmente, la glucosa (Glc), la galactosa (Gal) y la N-acetilglucosamina (GlcNAc). Por este motivo, núcleo interno y externo también se denominan, en ocasiones, región de las heptosas y de las hexosas, respectivamente. Sin embargo, también es frecuente hallar residuos de D,D-Hep y/o L,D-Hep en el núcleo externo (Caroff y Karibian, 2003).

La estructura del núcleo interno tiende a estar bastante conservada, especialmente dentro de una misma familia (Fig. 1.8). A pesar de ello, suele presentar sustituciones no estequiométricas con otros azúcares, grupos fosfato (P) o residuos de pirofosfoetanolamina (PPEtN) o fosfocolina (PCho), lo que contribuye a crear heterogeneidad entre las moléculas de LPS presentes, incluso, en un mismo cultivo bacteriano, de manera que, en muchos casos, tan sólo se conoce la cadena oligosacáridica predominante para un determinado núcleo. Alteraciones en el núcleo externo, quizás en función de las condiciones de crecimiento y de los factores ambientales, podrían afectar a la eficiencia de ligación del antígeno O al núcleo y contribuir, a su vez, a la heterogeneidad del LPS (Raetz y Whitfield, 2002).

Se han descrito diferentes tipos de núcleos del LPS dentro de una misma especie y las principales diferencias residen en el núcleo externo. En *E. coli*, existen cinco tipos de núcleo conocidos (R1, R2, R3, R4 y K-12) que difieren, principalmente, en el núcleo externo, así como en algunas sustituciones no estequiométricas del núcleo interno (Heinrichs *et al.*, 1998) (Fig. 1.8).

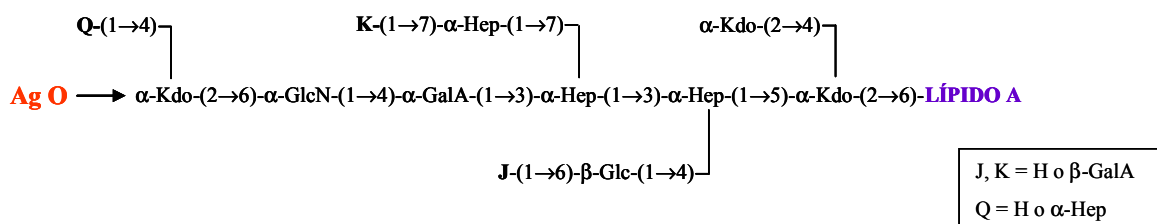
En el caso de *S. enterica*, se conocen dos tipos de núcleo, muy parecidos a los de *E. coli*, que se corresponden a los encontrados en *S. enterica* sv. Typhimurium y *S. enterica* sv. Arizonae y que se diferencian, tan sólo, en un residuo del núcleo externo (Kaniuk *et al.*, 2002) (Fig. 1.8).



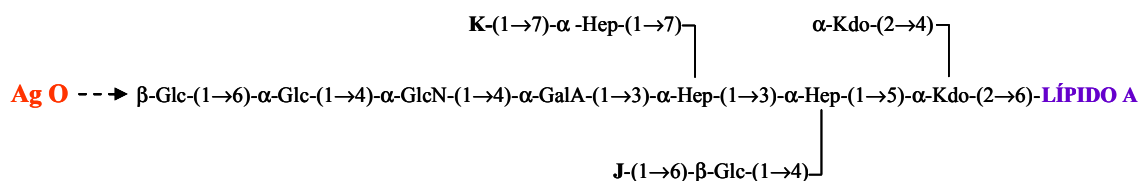
**Figura 1.8.** Estructuras de los núcleos de *E. coli* y *Salmonella* conocidos. El recuadro muestra la estructura del núcleo interno. Las sustituciones no estequiométricas se indican con líneas de puntos. El núcleo externo se muestra unido a la HepII del núcleo interno y, si se conoce, se indica el lugar de unión del antígeno O (O-PS). Todos los enlaces están en la configuración  $\alpha$ -anomérica excepto que se indique, las hexosas son D-piranosas y las heptosas presentan la configuración L,D-Hep. (\*): sustitución no estequiométrica en R3. (\*\*): N-acetiladas parcialmente. Figura adaptada de Raetz y Whitfield, 2002; Müller-Loennies *et al.*, 2002 y Müller-Loennies *et al.*, 2003.

En *K. pneumoniae* han sido descritos, también, dos tipos de núcleo, tipo 1 y tipo 2, del LPS (Vinogradov y Perry, 2001; Regué *et al.*, 2005b) que comparten el mismo núcleo interno y los residuos del núcleo externo más proximales (Fig. 1.9).

**Núcleo tipo 1**



**Núcleo tipo 2**

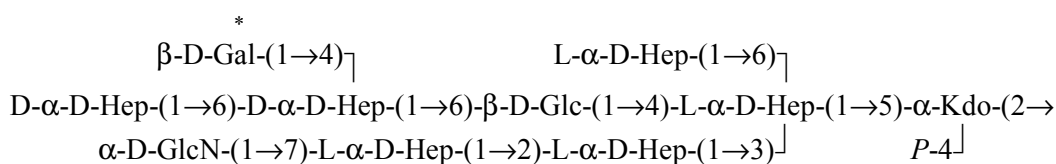


**Figura 1.9.** Estructuras de los núcleos de *K. pneumoniae*. Las hexosas son D-piranosas y las heptosas presentan la configuración L,D-Hep. Dependiendo de la cepa, los residuos J y K pueden ser hidrógeno (H) o  $\beta$ -GalA y el residuo Q puede ser H o  $\alpha$ -Hep. La flecha discontinua indica el posible lugar de unión del antígeno O (Ag O). (Vinogradov y Perry, 2001; Regué *et al.*, 2005b).

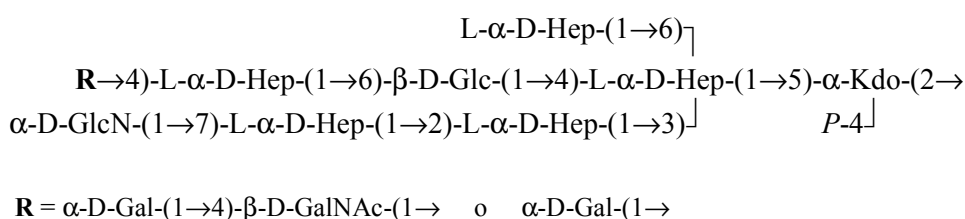
El análisis estructural de la región del núcleo no sólo se ha llevado a cabo en la familia *Enterobacteriaceae*, en la cual se ha realizado un enorme progreso (Holst, 2007), sino que también se ha caracterizado el núcleo del LPS o del LOS de una gran cantidad de bacterias Gram negativas.

El núcleo del LPS de *Aeromonas hydrophila* AH-3 (serotipo O:34) está constituido por un único Kdo fosforilado, L,D-Hep, D,D-Hep, D-Glc, D-GlcN y D-Gal. El grado de sustitución con D-Gal es de un 50% y representa el lugar de unión del antígeno O (Knirel *et al.*, 2004). Esta estructura comparte muchas similitudes con la estructura del núcleo de *A. hydrophila* A6 caracterizada anteriormente (Michon *et al.*, 1984) y es también muy parecida a la recientemente descrita del núcleo de varias cepas de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (Wang *et al.*, 2006) (Fig. 1.10), la cual, por su parte, difiere bastante respecto a la estructura que había sido previamente caracterizada de la cepa SJ-15 de esta misma especie, tanto a nivel del núcleo interno como del externo (Shaw *et al.*, 1992).

*A. hydrophila* AH-3



*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*

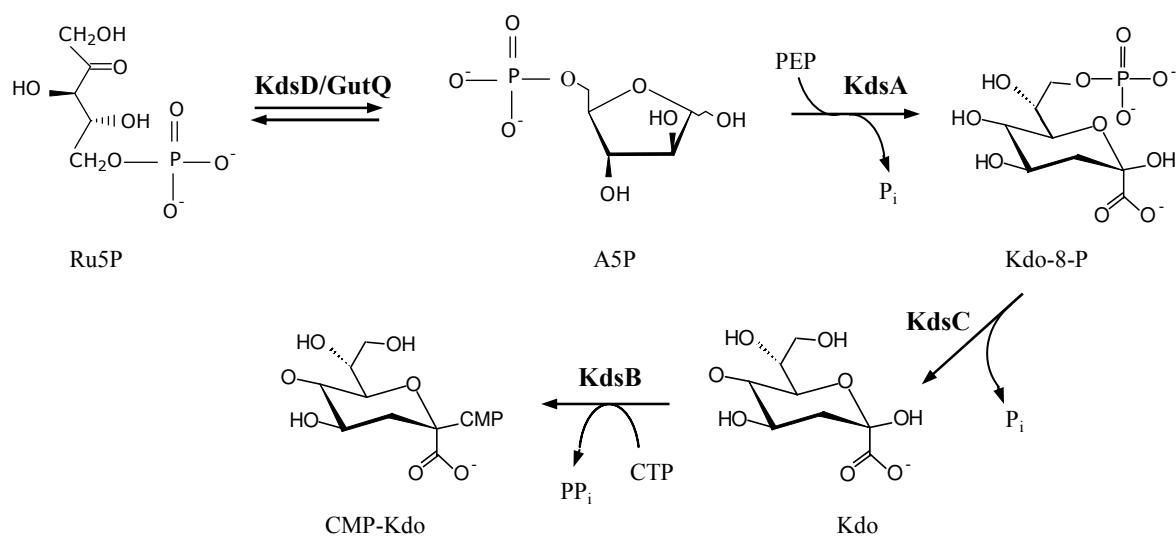


**Figura 1.10.** Estructura química del núcleo de *A. hydrophila* AH-3 (serotipo O:34) y de las cepas A449, 80204-1 y de una cepa con R-LPS de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Todos los monosacáridos están en la forma piranosa. (\*): Lugar de unión del antígeno O. (Knirel *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006).

### 1.2.3.3 Biosíntesis del núcleo del LPS

El inicio de la síntesis del núcleo se intercala con el final de la biosíntesis del lípido A en *E. coli*, que, en sus últimos pasos, requiere la unión de los residuos de Kdo a partir de la molécula activada (CMP-Kdo). La ruta de biosíntesis del Kdo se inicia con la acción de

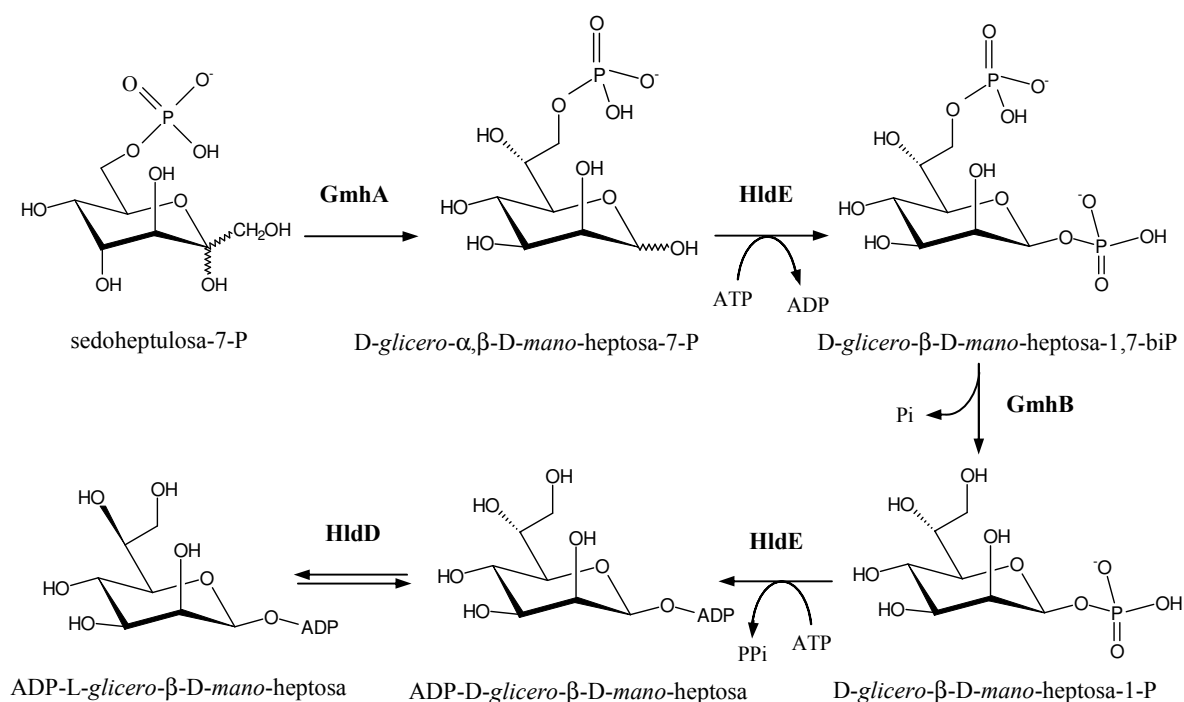
la enzima D-arabinosa-5-fosfato isomerasa (API), codificada por el gen *kdsD* y, en algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, también por el gen parálogo *gutQ* (Meredith y Woodard, 2005). La API convierte la D-ribulosa-5-fosfato (Ru5P) en D-arabinosa-5-fosfato (A5P) que, seguidamente, es condensada con fosfoenolpiruvato (PEP) formándose Kdo-8-fosfato por la enzima KdsA (Kdo-8-P sintasa). A continuación, KdsC (Kdo-8-P fosfatasa) hidroliza el fosfato para obtener la molécula de Kdo, función que en su ausencia podría ser realizada a baja eficiencia por fosfatasa no específicas (Sperandeo *et al.*, 2006). Por último, la molécula de Kdo formada es activada, posteriormente, por KdsB (CMP-Kdo sintetasa) (Wu y Woodard, 2003; Strohmaier *et al.*, 1995) (Fig. 1.11).



**Figura 1.11.** Ruta de biosíntesis del CMP-Kdo.

La proteína que une los residuos de Kdo al lípido A es la Kdo transferasa, codificada por el gen *waaA*. Es una enzima integral de la membrana interna con un dominio transmembrana (Clementz y Raetz, 1991) que ha sido descrita como multifuncional, capaz de transferir varios residuos de Kdo desde CMP-Kdo a diferentes sustratos y formando diferentes enlaces. Se trata de una enzima bifuncional en *E. coli* (Belunis y Raetz, 1992) y se ha sugerido que puede tener actividad trifuncional en aquellas bacterias cuyo núcleo contenga tres residuos de Kdo, como en el caso de la familia *Chlamydiaceae* (Löbau *et al.*, 1995), o monofuncional, en el caso de contener uno solo, como ocurre en *H. influenzae* (White *et al.*, 1997), yendo acompañada, en este último caso, de la actividad de la kinasa KdkA (White *et al.*, 1999). Sin embargo, aún no es posible deducir su mono-, bi- o trifuncionalidad mediante el análisis de su secuencia (Raetz y Whitfield, 2002).

Seguidamente, en la mayoría de los casos, se añaden secuencialmente varios residuos de heptosa que han sido previamente sintetizados. La ruta de biosíntesis y activación de la L,D-Hep se inicia mediante la isomerasa GmhA que convierte la sedoheptulosa-7-fosfato en D,D-heptosa-7-fosfato. A continuación, la enzima bifuncional HldE fosforila el anómero  $\beta$ , mediante su actividad kinasa, produciendo D,D-Hep-1,7-bisfosfato, que será desfosforilada por la fosfatasa GmhB obteniendo D,D-Hep-1-fosfato. HldE vuelve a actuar generando, con su función adenosiltransferasa específica para la configuración  $\beta$ -anomérica, ADP-D,D-Hep (Kneidinger *et al.*, 2002). Finalmente, la epimerasa HldD (o GmhD) cataliza una reacción reversible, usando como cofactor NADP<sup>+</sup>, que implica una oxidación y una reducción seguidas, dando lugar a la ADP-L,D-Hep (Morrison y Tanner, 2007). Las dos formas activadas de la heptosa se sintetizan en su configuración  $\beta$ -anomérica, forma en la que son sustratos para las heptosiltransferasas (Zamyatina *et al.*, 2000) (Fig. 1.12).

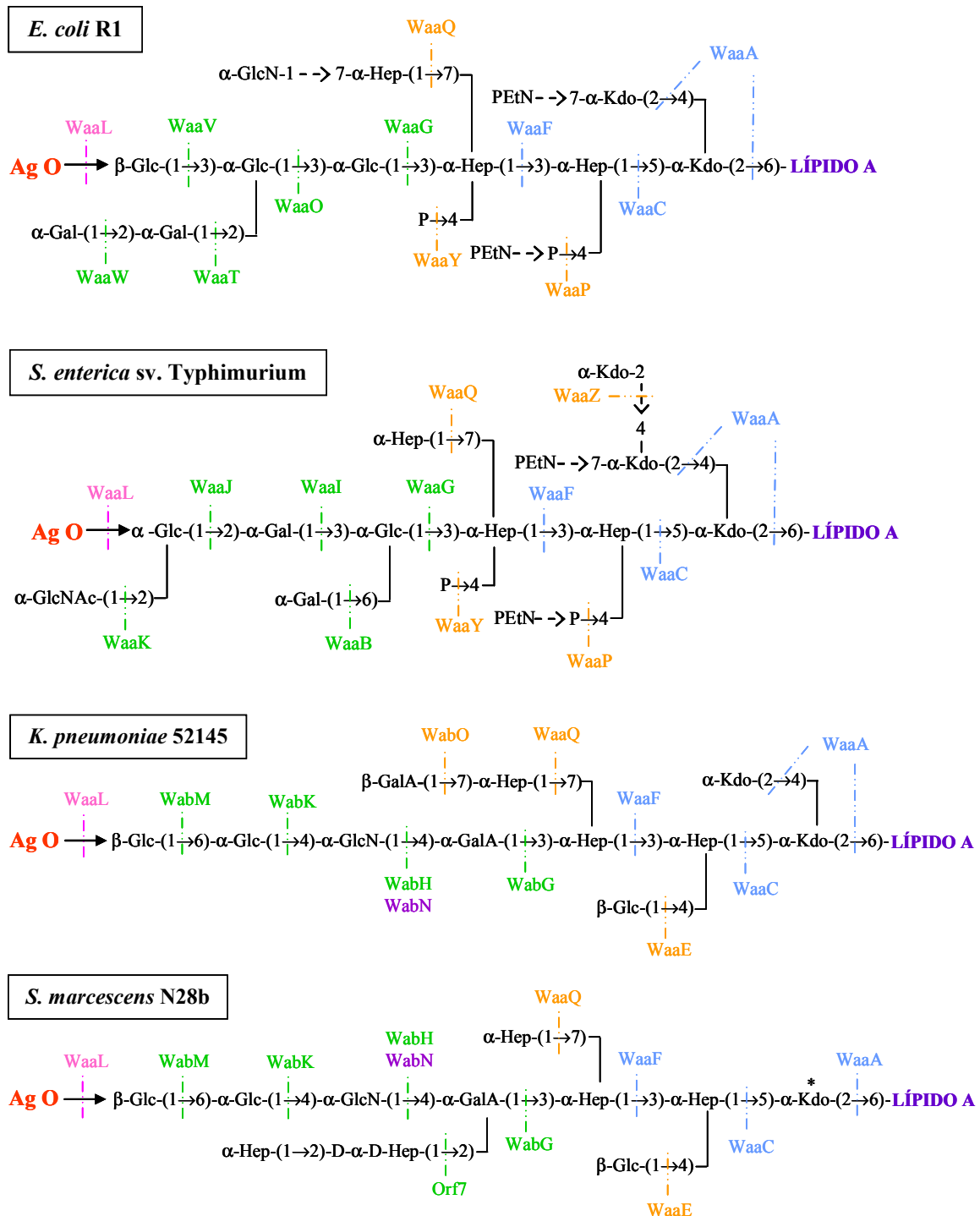


**Figura 1.12.** Biosíntesis de la ADP-L-glicero-D-mano-heptosa en *E. coli*. Figura adaptada de Zamyatina *et al.*, 2003.

El núcleo del LPS se ensambla por la acción secuencial de glicosiltransferasas asociadas a la membrana que actúan de forma coordinada, y quizás formando un complejo, en la cara citoplasmática de la membrana interna, donde están disponibles el aceptor y los



azúcares precursores activados con nucleótidos para su transferencia (Raetz y Whitfield, 2002).



**Figura 1.13.** Esquema de la estructura química y de las transferasas conocidas implicadas en la biosíntesis de los núcleos de *E. coli* R1 (Raetz y Whitfield, 2002), *S. enterica* sv. Typhimurium (Heinrichs *et al.*, 1998; Kaniuk *et al.*, 2002), *K. pneumoniae* 52145 (Regué *et al.*, 2005a; Regué *et al.*, 2005b; Fresno *et al.*, 2007) y *S. marcescens* N28b (Coderch *et al.*, 2004; Regué *et al.*, 2005a; Regué *et al.*, 2005b). Las enzimas que forman el núcleo interno están marcadas en azul; las del núcleo externo, lo están en verde; las que introducen modificaciones, en naranja; la desacetilasa de GlcNAc, en lila; y la ligasa, en rosa. Las sustituciones no estequiométricas se indican con flechas discontinuas. Las hexosas son D-piranosas y las heptosas presentan la configuración L,D-Hep, excepto que se indique. (\*): El KdoI de *S. marcescens* N28b lleva, probablemente unido en la posición 4, un segundo Kdo que podría ser sustituido por un Ko, en base a la caracterización del núcleo de otras cepas (Vinogradov *et al.*, 2006).

Aunque muchos de los genes implicados en la biosíntesis del núcleo han sido identificados en una gran cantidad de bacterias, la gran diversidad estructural impide la asignación de la función exacta de muchas de las transferasas. A nivel del núcleo interno, su conservación ha facilitado el reconocimiento de las enzimas implicadas en su biosíntesis, de manera que, en la mayoría de los casos, las heptosiltransferasas codificadas por los genes *waaC* y *waaF* son las que transfieren las dos primeras heptosas, la L,D-HepI y la L,D-HepII, respectivamente (Raetz y Whitfield, 2002). Los sistemas de biosíntesis del núcleo mejor caracterizados son el de *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens* (Fig. 1.13).

En el caso de los LOS, la síntesis del núcleo interno y la unión de los oligosacáridos sigue el mismo mecanismo utilizado para la biosíntesis del núcleo del LPS (Raetz and Whitfield, 2002).

El KdoI está mayoritariamente sustituido por una L,D-Hep mediante un enlace  $\alpha(1-5)$ , reacción catalizada por la enzima WaaC. Sin embargo, en *H. influenzae*, la heptosiltransferasa I difiere en la especificidad de sustrato respecto a la enzima WaaC descrita en la mayoría de bacterias, y le fue asignado el nombre de OpsX. Mientras que la primera muestra preferencia por la molécula de Kdo<sub>2</sub>-lípidio A como aceptor, OpsX presenta una estricta especificidad de sustrato por la molécula de Kdo fosforilada (P-Kdo-Lípidio A) (Gronow *et al.*, 2005). En *Pasteurella multocida*, se han identificado dos heptosiltransferasas I diferentes, la primera, denominada HptA, tiene como aceptor la molécula predominante de P-Kdo-Lípidio A y, la segunda, HptB, es específica para la molécula de Kdo<sub>2</sub>-lípidio A, lo que responde a la expresión de dos glicofomas simultáneas del núcleo de su LOS (Harper *et al.*, 2007).

Por otro lado, existen también casos, como el de *Shewanella*, en el que la primera heptosa es una D,D-Hep (Vinogradov *et al.*, 2002a; Vinogradov *et al.*, 2003), o casos en los que el primer azúcar unido al Kdo no es una heptosa, estando el núcleo desprovisto de ellas, como ocurre en *Rhizobium* o *F. tularensis*, donde el primer azúcar es una manosa. En *Rhizobium leguminosarum*, concretamente, se ha descrito una manosiltransferasa, denominada LpcC, implicada en la transferencia de manosa al KdoI mediante un enlace  $\alpha(1-5)$  a partir de GDP-manosa, y cuyo gen es capaz de complementar a un mutante en el gen *waaC* de *Salmonella*, debido, probablemente, a la similitud estructural entre la L,D-Hep y la D-manosa (Kanipes *et al.*, 2003).

El núcleo del LPS puede ser también modificado mediante la adición de otros azúcares o grupos fosfato, por la acción de kinasas, sobre la cadena principal. El orden en el que tienen lugar estas modificaciones o la necesidad de ellas para la correcta extensión del núcleo sugieren complicadas especificidades de sustrato para las enzimas y complejas interacciones entre ellas para un óptimo ensamblaje (Raetz y Whitfield, 2002).

Por otro lado, la modificación con PEtN que tiene lugar en el segundo residuo de Kdo en *E. coli* y *S. typhimurium* es llevada a cabo, seguramente a nivel del periplasma, por una enzima integral de membrana interna denominada EptB que utiliza fosfatidiletanolamina (PtdEtN) como dador del sustrato, liberando una molécula de diacilglicerol, y que es inducida por elevadas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Reynolds *et al.*, 2005).

Respecto al mecanismo de incorporación de residuos de GlcN al núcleo del LPS, en *K. pneumoniae*, se ha descrito la participación de dos enzimas que también están presentes en *S. marcescens*. En primer lugar, la glicosiltransferasa WabH incorpora un residuo de GlcNAc a partir del precursor activado UDP-GlcNAc (Firdich *et al.*, 2004) y, a continuación, actúa la desacetilasa WabN, lo cual es necesario para la incorporación del resto de los azúcares del núcleo externo (Regué *et al.*, 2005a). Este mecanismo, junto con el hecho de que la UDP-GlcNAc se halle en una concentración mucho mayor que la UDP-GlcN, prácticamente inexistente en la célula bacteriana (Gabriel, 1982), indica que la incorporación de GlcNAc y su posterior desacetilación podría ser el procedimiento general de biosíntesis de núcleos con GlcN en la familia *Enterobacteriaceae* (Regué *et al.*, 2005a).

Una vez sintetizado el núcleo, tendrá lugar la unión covalente del antígeno O en la cara periplasmática de la membrana interna. La proteína MsbA es un transportador ABC (*ATP-Binding Cassette*), por lo que presenta dominios transmembrana y actividad ATPasa, que forma un homodímero, es esencial para la supervivencia de la bacteria y está implicada en el transporte del núcleo-lípido A al periplasma a través de la membrana interna (Zhou *et al.*, 1998; Chang y Roth, 2001). MsbA también ha sido relacionada con el transporte de fosfolípidos a través de la membrana interna en *E. coli* (Doerrler *et al.*, 2004) y, por otro lado, también se ha descrito que es capaz de reconocer y transportar una amplia gama de moléculas tóxicas (Woebking *et al.*, 2005).

### 1.2.3.4 Organización genética del núcleo del LPS

La mayoría de los genes implicados en la biosíntesis del núcleo se hallan formando operones contenidos en una agrupación génica cromosómica denominada *wa*, fuera de la cual se localizan los genes conservados relacionados con la biosíntesis y activación del Kdo y la mayoría de los implicados en la biosíntesis y activación de las heptosas. En el caso de *E. coli*, *S. enterica* (Heinrichs *et al.*, 1998), *S. marcescens* (Coderch *et al.*, 2004), *K. pneumoniae* (Regué *et al.*, 2001) y *V. cholerae* (Nesper *et al.*, 2002), esta agrupación *wa* es única. Sin embargo, en otras bacterias Gram negativas, esta organización puede ser distinta. En el caso de *Bordetella*, por ejemplo, los genes implicados en la biosíntesis del núcleo y del antígeno O se hallan en una misma agrupación génica (Allen y Maskel, 1996) y, en otros casos, puede que los genes para la biosíntesis del núcleo del LPS no estén agrupados en una sola, sino en varias regiones, como seguramente ocurre en *Y. pestis* en base al análisis de su genoma secuenciado (Knirel *et al.*, 2007).

En *E. coli* y *Salmonella*, la agrupación *wa* consiste en tres operones definidos por el primer gen de cada unidad transcripcional: *hldD*-, *waaQ*- y *waaA*- (Fig. 1.14). En el primer operón, los genes *hldD*, *waaF* y *waaC* codifican enzimas para el paso final de la biosíntesis y activación de la L,D-Hep y para transferirla al núcleo interno, y el gen *waaL*, codifica la ligasa que une el antígeno O al núcleo-lípido A (ver apartado 1.2.5). En *E. coli* K-12, la transcripción de este primer operón está regulada por un promotor de choque térmico, lo que indica la importancia de las heptosas para el crecimiento a elevadas temperaturas (Schnaitman y Klena, 1993), el cual es dependiente del factor  $\sigma^E$  (Dartigalongue *et al.*, 2001).

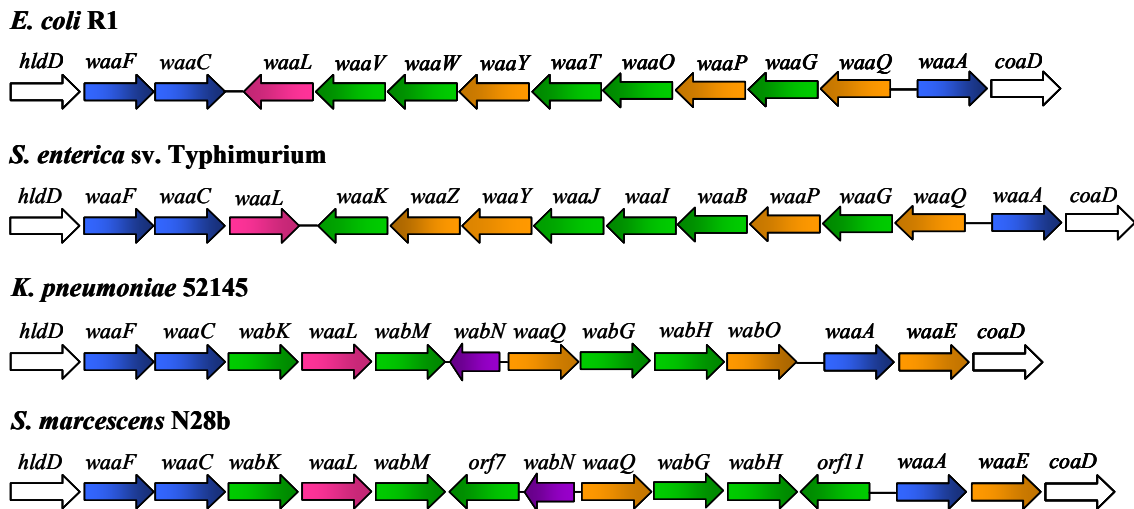
El operón central *waaQ* contiene los genes necesarios para la biosíntesis del núcleo externo y para la modificación del núcleo interno con otros azúcares o grupos fosfato y, en *E. coli* R1 y R4, el gen *waaL* es el último. Este operón está precedido por una región de 39 pb no traducida (Heinrichs *et al.*, 1998) denominada JUMPStart (*Just Upstream of Many Polysaccharide-associated gene Starts*) (Hobbs y Reeves, 1994) que contiene una secuencia conservada de 8-12 pb conocida como *ops* (*operon polarity supressor*) (Nieto *et al.*, 1996). Esta región también se halla en operones implicados en la biosíntesis de otras macromoléculas extracitoplasmáticas que representan factores de virulencia dirigidos a la superficie celular (Bailey *et al.*, 1997). La secuencia *ops* enlentece a la ARN polimerasa e induce su isomerización a un estado de pausa transcripcional (Artsimovitch y Landick,

2000), favoreciendo el reclutamiento del factor facilitador de la elongación de la transcripción o antiterminador RfaH (Artsimovitch y Landick, 2002). RfaH se une específicamente a la cadena de ADN no codificante expuesta en la superficie del complejo de elongación de la transcripción (Artsimovitch y Landick, 2002), lo que desencadena el desplazamiento de sus dominios y la exposición de su lugar de unión con la subunidad  $\beta'$  de la ARN polimerasa (Belogurov *et al.*, 2007). RfaH permanece unido y modifica a la ARN polimerasa mediante una señal alostérica que aumenta la procesividad del complejo evitando su isomerización al estado de pausa (Svetlov *et al.*, 2007), de esta manera, permite extender la transcripción en operones largos, eludiendo las posibles secuencias de pausa y de terminación, y suprimiendo, así, la polaridad transcripcional. Por otro lado, la unión de RfaH previene la unión del factor  $\sigma$  a la subunidad  $\beta'$  de la ARN polimerasa durante la elongación en lugares parecidos a la secuencia promotora de  $-10$ , lo que también evita su pausa (Sevostyanova *et al.*, 2008). RfaH y el elemento *ops* funcionarían como un sistema de antiterminación en la biosíntesis del núcleo (Bailey *et al.*, 1997), sin embargo, la secuencia JUMPStart no se ha hallado en otras regiones *wa* como la de *K. pneumoniae* o la de *S. marcescens* (Regué *et al.*, 2001; Coderch *et al.*, 2004).

El último operón contiene el gen *waaA*, que codifica la Kdo transferasa bifuncional que coloca los dos residuos de Kdo del núcleo interno, y el gen *coaD*, que no está relacionado con la biosíntesis del núcleo del LPS, sino que está implicado en la biosíntesis de la coenzima A (Geerlof *et al.*, 1999). Entre ambos genes, en *K. pneumoniae* y *S. marcescens*, se sitúa el gen *waaE* que codifica una glicosiltransferasa que une un residuo de glucosa a la HepI del núcleo interno mediante un enlace  $\beta(1-4)$ . Este gen también se halla en otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* como *Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis* y *Enterobacter aerogenes* (Izquierdo *et al.*, 2002) (Fig. 1.14).

Los genes implicados en la biosíntesis del núcleo del LPS han sido identificados en un elevado número de bacterias, pero la asignación de una función a las proteínas que codifican se ha llevado a cabo en muy pocos casos. No obstante, la caracterización química de mutantes en genes específicos del LPS y los estudios de complementación realizados en algunas bacterias, han permitido asignar funciones específicas a algunos de los genes. Las agrupaciones génicas de *E. coli* (Heinrichs *et al.*, 1998; Yethon *et al.*, 1998), *S. enterica* (Heinrichs *et al.*, 1998; Kaniuk *et al.*, 2002), *K. pneumoniae* (Regué *et al.*, 2001; Izquierdo *et al.*, 2003a; Frirdich *et al.*, 2004; Regué *et al.*, 2005a; Regué *et al.*, 2005b; Fresno *et al.*,

2007) y *S. marcescens* (Coderch *et al.*, 2004; Regué *et al.*, 2005a; Regué *et al.*, 2005b) son las mejor caracterizadas (Fig. 1.14).



**Figura 1.14.** Esquema de las agrupaciones génicas *wa* de *E. coli* R1 (Heinrichs *et al.*, 1998), *S. enterica* sv. Typhimurium (Heinrichs *et al.*, 1998), *K. pneumoniae* 52145 (Regué *et al.*, 2005a; Regué *et al.*, 2005b; Fresno *et al.*, 2007) y *S. marcescens* N28b (Coderch *et al.*, 2004; Regué *et al.*, 2005a; Regué *et al.*, 2005b). Los genes en azul codifican las transferasas que forman el núcleo interno; los naranjas, las enzimas que modifican la estructura; los verdes, las del núcleo externo y la ligasa está en rosa. En lila se marca el gen que codifica la desacetilasa de GlcNAc y, en blanco, se indica el gen implicado en la biosíntesis de las heptosas (*hldD*) y el *coaD*, no relacionado con la biosíntesis del núcleo del LPS.

## 1.2.4 El antígeno O

### 1.2.4.1 Características principales del antígeno O

El antígeno O es un polisacárido expuesto en la superficie bacteriana unido, frecuentemente, a un residuo terminal del núcleo externo que consiste en una serie de repeticiones, entre 10 y 30 normalmente, de una subunidad oligosacáridica básica, llamada unidad o subunidad O, que, generalmente, contiene de 2 a 6 residuos de azúcares (Reeves *et al.*, 1996). Existe variabilidad en el número de repeticiones de esta subunidad, de forma que las moléculas de LPS de tipo S de un cultivo bacteriano son heterogéneas en cuanto a su tamaño, lo que produce el característico patrón de migración en “escalera” al visualizarlas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Cada banda o “escalón” superior representa una molécula de núcleo-lípido A con una unidad O adicional respecto al anterior, y el espacio entre cada uno de ellos está determinado por el tamaño de esta subunidad, manteniendo cada cepa un patrón de distribución de longitudes de cadena específico (Whitfield *et al.*, 1997).

El antígeno O es la parte más externa, inmunogénica y variable del LPS. Es uno de los componentes de la bacteria que está sometido a una mayor presión selectiva, ya que actúa como receptor para bacteriófagos y es también importante en la respuesta inmune del hospedador, quedando reflejada en la elevada variabilidad estructural que presenta tanto a nivel de la naturaleza, como en el orden y en los enlaces de los diferentes azúcares que lo constituyen. Esta variabilidad se puede detectar mediante métodos inmunológicos, lo que ha permitido agrupar las cepas de una especie bacteriana en diferentes serotipos.

Se trata de un importante factor de virulencia que proporciona a la bacteria una capa superficial hidrófila que puede enmascarar importantes epítomos antigénicos conservados de la membrana externa y que es capaz de conferir resistencia a la actividad bactericida del complemento, en función de la cantidad de moléculas de LPS con antígeno O, así como de la longitud de esta cadena polisacáridica (ver apartado 1.2.1). Por otro lado, también se ha descrito, en muchas bacterias patógenas, el papel que juega como adhesina y, consecuentemente, su importancia en la colonización de las mucosas del organismo hospedador (Merino *et al.*, 1996c; Merino *et al.*, 1996d).

En *A. hydrophila* AH-3 (serotipo O:34), se han observado cambios en el LPS, como consecuencia de una adaptación térmica, que implican la presencia o ausencia de antígeno O. Las moléculas de LPS de las bacterias crecidas a 20°C, o a 37°C y elevada osmolaridad, son de tipo S, mientras que las crecidas a 37°C en condiciones de baja osmolaridad son de tipo R (Merino *et al.*, 1992c; Aguilar *et al.*, 1997). El LPS de tipo S proporciona a las bacterias una mayor actividad hemolítica, un aumento de la virulencia en peces y ratones (Merino *et al.*, 1992c), un incremento de la adhesión a células epiteliales humanas y resistencia a la actividad bactericida del suero no inmune (Aguilar *et al.*, 1997).

#### **1.2.4.2 Estructura química del antígeno O**

Existe una amplísima diversidad estructural a nivel del antígeno O ya que las subunidades repetitivas pueden diferir en los monómeros que las forman, en la posición y en la estereoquímica de los enlaces *O*-glicosídicos, y en la presencia o la ausencia de sustituyentes no sacarídicos. Han sido descritos más de 60 monosacáridos y unos 30 componentes no sacarídicos diferentes. Estas subunidades, lineales o ramificadas, pueden estar formadas por un solo tipo de monosacárido (formando homopolisacáridos) o por varios (heteropolisacáridos) (Raetz y Whitfield, 2002).

Las sustituciones no estequiométricas y otras modificaciones tienen un importante papel en la antigenicidad, de forma que adiciones de grupos acetilo o de residuos de glucosa y modificaciones de los enlaces entre residuos pueden cambiar el serotipo de la bacteria, definido por la estructura del antígeno O. En algunos casos, estas modificaciones pueden ser el resultado de la presencia de bacteriófagos lisogénicos que codifican enzimas que alteran la biosíntesis del antígeno O (Schnaitman y Klena, 1993).

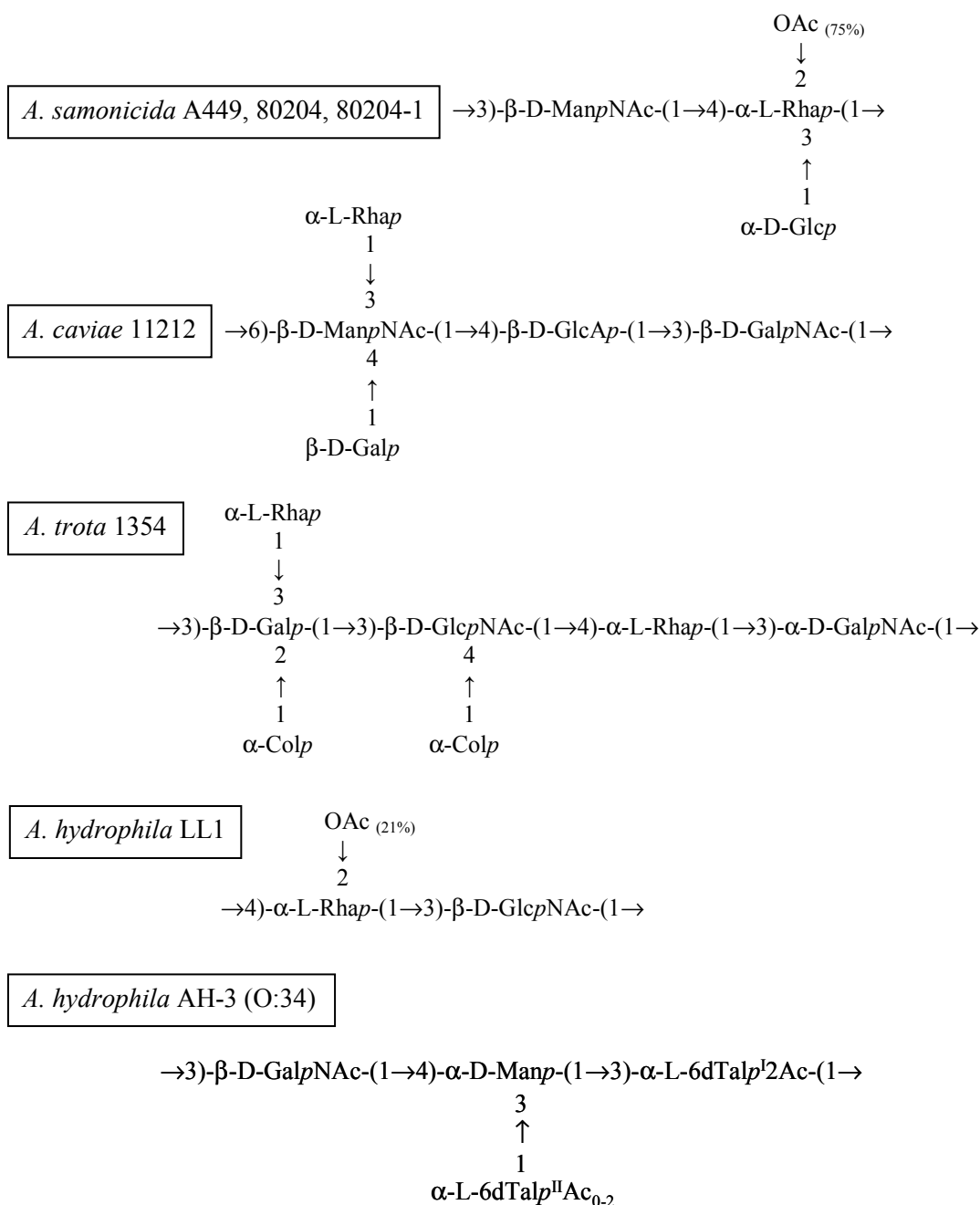
El número de antígenos O diferentes puede variar considerablemente de una especie a otra. En *E. coli* han sido identificados más de 180 antígenos O diferentes (Stenutz *et al.*, 2006) y en *S. enterica*, unos 54. La mayoría de los antígenos O de *E. coli* y *S. enterica* son heteropolisacáridos. En cambio, casi todos los antígenos O de *K. pneumoniae* son homopolisacáridos (Samuel y Reeves, 2003).

Dentro de las *Aeromonas* mesófilas, se definieron 44 serotipos O (Sakazaki y Shimada, 1984), que fueron ampliados posteriormente a 97 (Thomas *et al.*, 1990), entre los cuales, O:11, O:16 y O:34 destacan por su incidencia en infecciones en humanos (Janda *et al.*, 1996) y, junto con el serotipo O:18, están relacionados con más del 60% de los casos de septicemia (Janda y Abbott, 1998).

Varias estructuras químicas han sido descritas en el género *Aeromonas*, como la del antígeno O:11 de *A. hydrophila* LL1 (Shaw *et al.*, 1984) y la de los antígenos O de las cepas 11212 de *A. caviae* (Linnerborg *et al.*, 1996), *A. trota* 1354 (Knirel *et al.*, 1996) y *A. salmonicida* A449, 80204 y 80204-1 (Wang *et al.*, 2005) (Fig 1.15). En este último caso, la estructura resulta ser bastante diferente a la previamente descrita en la cepa SJ-15 (Shaw *et al.*, 1983). Curiosamente, la cepa 80204-1 de *A. salmonicida*, cuando es capaz de expresar la cápsula, produce un nuevo antígeno O que presenta una estructura idéntica a la del polisacárido capsular (Wang *et al.*, 2004b).

El antígeno O:34 de *A. hydrophila* AH-3 es un heteropolisacárido cuya unidad repetitiva consiste en un tetrasacárido que contiene D-manosa (D-Man), D-N-acetilgalactosamina (D-GalNAc) y dos residuos de 6-desoxi-L-talosa (L-6dTal). La 6dTal<sup>I</sup> está acetilada estequiométricamente en la posición 2 y la 6dTal<sup>II</sup> contiene cero, uno o dos grupos O-acetilo en cualquier posición (Fig 1.15) (Knirel *et al.*, 2002).



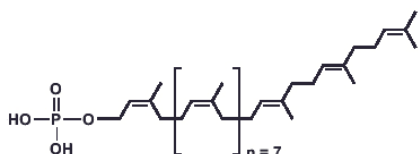


**Figura 1.15.** Estructura química de la unidad repetitiva del antígeno O de las cepas de *A. salmonicida* A449, 80204 y 80204-1 (Wang *et al.*, 2005), de *A. caviae* 11212 (Linnerborg *et al.*, 1996), de *A. trota* 1354 (Knirel *et al.*, 1996), de *A. hydrophila* LL1 (Shaw *et al.*, 1984) y de *A. hydrophila* AH-3 (O:34) (Knirel *et al.*, 2002). Ac y OAc: grupo *O*-acetilo; Col: colitosa (3,6-didesoxi-L-xilo-hexosa); Gal: galactosa; GalNAc: *N*-acetilgalactosamina; Glc: glucosa; GlcA: ácido glucurónico; GlcNAc: *N*-acetilglucosamina; Man: manosa; ManNAc: *N*-acetilmanosamina; Rha: ramnosa; 6dTal: 6-desoxitalosa; *p*: forma piranosa.

### 1.2.4.3 Biosíntesis del antígeno O

En la biosíntesis del antígeno O, se pueden diferenciar tres procesos. El primero implica la biosíntesis de los precursores azúcar nucleótido del antígeno O en el citoplasma.

En el segundo, se produce la transferencia secuencial mediante glicosiltransferasas de los diferentes azúcares a partir de sus precursores nucleotídicos para formar un oligo o polisacárido sobre un transportador lipídico, el undecaprenil-fosfato (Und-P) (Fig. 1.16), situado en la cara citoplasmática de la membrana interna. Y, por último, tiene lugar la translocación a través de la membrana interna y la polimerización, dependiendo este orden de la vía utilizada (Samuel y Reeves, 2003).



**Figura 1.16.** Estructura del undecaprenil-fosfato (poliisoprenoide de 55 átomos de carbono). Figura adaptada de Raetz *et al.*, 2007.

#### 1.2.4.3.1 Biosíntesis de los precursores azúcar nucleótido

Los precursores de varios de los azúcares comunes del antígeno O o del núcleo del LPS forman parte de otras rutas metabólicas de la bacteria, como la UDP-Glc (UDP-glucosa), la UDP-Gal (UDP-galactosa) y la UDP-GlcNAc (UDP-*N*-acetilglucosamina). Los genes implicados en la biosíntesis de estos azúcares nucleótido no se encuentran, normalmente, duplicados en las agrupaciones génicas *wb* responsables de la biosíntesis del antígeno O. En cambio, en ellas sí que se localizan aquellos genes implicados en la biosíntesis de los azúcares que forman parte de los antígenos O y no son esenciales para la bacteria. Algunos de los precursores permiten la incorporación directa del azúcar y/o sirven de intermediarios para la síntesis de otros monosacáridos activados. Se han descrito varias de las rutas de biosíntesis de los azúcares presentes en los antígenos O que parecen estar conservadas en un amplio rango de especies (Samuel y Reeves, 2003) (Fig 1.17).

La formación de la GDP-Man (GDP-manosa) requiere tres etapas sucesivas. La primera consiste en la isomerización de la fructosa-6-P a manosa-6-P mediante la acción de la fosfomanosa isomerasa codificada por el gen *manA*, que se halla fuera de la agrupación *wb*. A continuación, la fosfomanomutasa codificada por *manB* forma la manosa-1-P sobre la que actúa, por último, la GDP-manosa pirofosforilasa codificada por *manC*. En algunos casos, ManC es bifuncional y presenta también actividad fosfomanosa isomerasa (Samuel y Reeves, 2003) (Fig 1.17).

La L-6dTal (6-desoxi-L-talosa) se incorpora al antígeno O a partir de la dTDP-L-6dTal, cuya biosíntesis parte de la glucosa-1-P e implica la acción secuencial de cuatro enzimas: RmlA (glucosa-1-P timidiltransferasa), RmlB (dTDP-D-glucosa-4,6-

deshidratasa), RmlC (dTDP-4-deshidroramnosa-3,5-epimerasa) y Tll (dTDP-6-desoxi-L-lixo-4-hexulosa reductasa) (Nakano *et al.*, 2000). La proteína RmlD (dTDP-4-deshidroramnosa reductasa) presenta la misma actividad reductasa que Tll y actúa sobre el mismo producto producido por RmlC, pero da lugar al epímero dTDP-L-Rha (dTDP-L-ramnosa). Los genes *rmlA*, *rmlB*, *rmlC* y *rmlD*, necesarios para la síntesis del precursor de la L-Rha, ampliamente distribuida en los antígenos O, suelen hallarse juntos en el extremo 5' de la agrupación *wb* con diferente orden según la especie (Samuel y Reeves, 2003) (Fig 1.17).

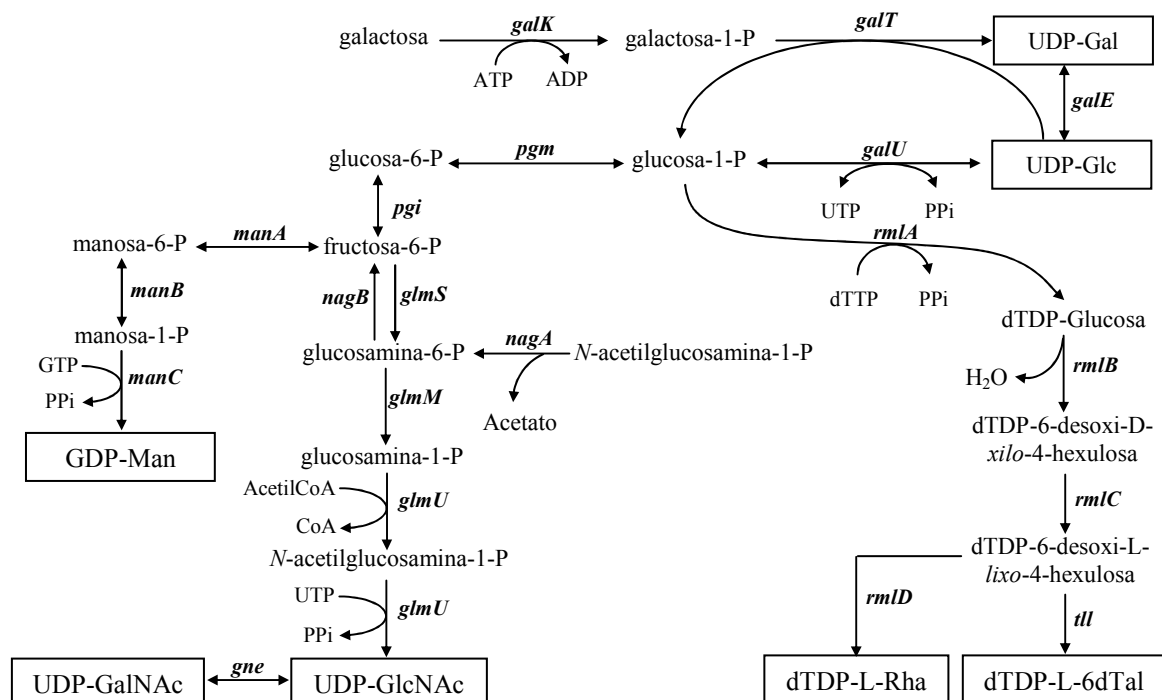


Figura 1.17. Rutas biosintéticas de algunos precursores azúcar nucleótido.

### 1.2.4.3.2 Biosíntesis de la unidad O

La síntesis de la subunidad repetitiva del antígeno O tiene lugar en la cara citoplasmática de la membrana interna en la que los precursores azúcar nucleótido del citoplasma están disponibles. La reacción inicial implica la transferencia de un azúcar-fosfato, a partir de su precursor, al transportador lipídico Und-P, formándose un enlace fosfodiéster y liberándose NMP. Las transferasas que catalizan esta reacción inicial presentan dominios transmembrana, no comunes en el resto de glicosiltransferasas, y pertenecen a la familia de las transferasas poliisoprenil-fosfato *N*-acetilhexosamina-1-fosfato (PNPT) o a la familia de las transferasas poliisoprenil-fosfato hexosa-1-fosfato

(PHPT). Las proteínas de la familia PNPT se han encontrado en eucariotas y procariotas, y un ejemplo es WecA, proteína bacteriana que transfiere GalNAc-P o GlcNAc-P al Und-P. En la familia *Enterobacteriaceae*, *wecA* no se localiza en la agrupación *wb*, sino en la de biosíntesis del antígeno común de las enterobacterias (ECA), en la cual participa. La familia PHPT, cuyos miembros han sido identificados sólo en bacterias, incluye a la proteína iniciadora WbaP, identificada en *S. enterica*, que transfiere la galactosa-1-P inicial a partir de UDP-Gal (Valvano, 2003).

Una vez se ha completado la reacción de iniciación, el resto de azúcares son añadidos en el extremo no reductor de la molécula de forma secuencial por glicosiltransferasas específicas, que se hallan en el citoplasma o asociadas a la membrana mediante interacciones electrostáticas, hasta que se sintetiza una unidad repetitiva o todas ellas (todo el antígeno O), dependiendo de la vía de ensamblaje y translocación utilizada. Se han descrito una gran variedad de glicosiltransferasas, que reflejan la diversidad observada en las estructuras del antígeno O. Las glicosiltransferasas son específicas del azúcar que deben unir, del azúcar aceptor y del carbono aceptor del enlace glicosídico (Samuel y Reeves, 2003).

#### **1.2.4.3.3 Translocación y polimerización**

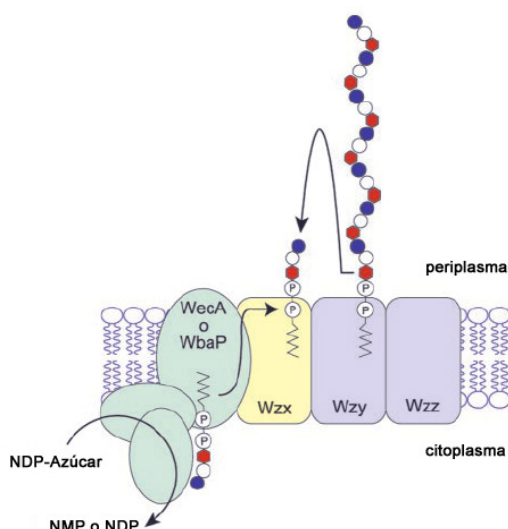
Hasta el momento, sólo se conocen tres rutas para la polimerización y translocación del antígeno O que se denominan: Wzy-dependiente, transportador ABC-dependiente y sintasa-dependiente (Raetz y Whitfield, 2002).

##### **1.2.4.3.3.1 Sistema Wzy-dependiente**

El sistema Wzy-dependiente (Fig 1.18) implica la acción de, al menos, tres proteínas: Wzx, Wzy y Wzz. Esta vía es característica de la síntesis de antígenos O que son heteropolisacáridos, muchos de los cuales presentan ramificaciones. Mediante esta vía, las subunidades repetitivas ligadas al Und-PP (undecaprenil-pirofosfato) sintetizadas individualmente son translocadas a través de la membrana interna por una proteína transmembrana con función flipasa denominada Wzx. El mecanismo exacto de transporte de las subunidades es desconocido, sin embargo se ha propuesto que Wzx podría reconocer y posiblemente interaccionar con el primer azúcar unido al Und-PP (Marolda *et al.*, 2004).

La polimerización de las subunidades repetitivas tiene lugar en la cara periplasmática de la membrana interna y es llevada a cabo por la polimerasa del antígeno

O, Wzy, proteína integral de la membrana que transfiere el extremo reductor del polímero en formación desde el transportador Und-PP al extremo no reductor de la nueva unidad de repetición ligada a su Und-PP. Mutantes en la proteína Wzy producen un LPS conocido como SR-LPS (*Semi-Rough*), con una única subunidad O unida al núcleo. En cada reacción de polimerización se incrementa la longitud de la cadena y se libera una molécula de Und-PP que debe ser reciclada a la forma activa monofosforilada, ya que dada su elevada utilización en este caso, su disponibilidad se convierte en un factor limitante. Este mecanismo de biosíntesis del antígeno O resulta inhibido por la bacitracina, que impide la reacción de desfosforilación que recicla el Und-PP (Valvano, 2003). Esta desfosforilación de reciclaje, a nivel de la cara periplasmática de la membrana interna, es llevada a cabo en *E. coli* por las proteínas de membrana PgpB, YbjG y LpxT con actividad pirofosfatasa, la última de las cuales cataliza la transferencia del grupo fosfato del Und-PP a la posición 1 del lípido A, que pasa a estar bifosforilada, lo que ocurre en un tercio de las moléculas (Valvano, 2008).



**Figura 1.18.** Esquema de la polimerización y translocación del antígeno O del LPS mediante el sistema Wzy-dependiente. Figura adaptada de Raetz y Whitfield, 2002.

Por último, otra proteína de la membrana interna, Wzz, actúa regulando la longitud de las cadenas polisacáridicas y generando la distribución modal específica de cada cepa (Valvano, 2003). El mecanismo de acción de Wzz no está claro, aunque se han propuesto dos modelos: el primero considera que podría interactuar con Wzy y modular su actividad alternándola entre un estado que favorecería la elongación de la cadena polisacáridica y otro que favorecería la terminación, mediante la transferencia del antígeno O a la ligasa WaaL (Bastin *et al.*, 1993). El segundo modelo sugiere que Wzz podría funcionar como una chaperona para ensamblar un complejo formado por Wzy, WaaL y el

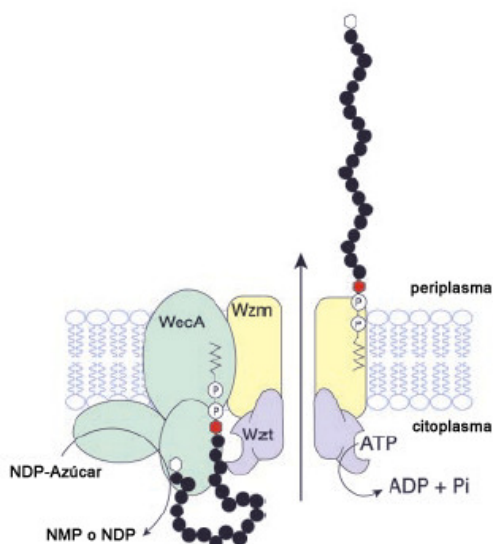
polisacárido unido a Und-PP, determinándose la modalidad por la proporción de Wzy y WaaL asociadas (Morona *et al.*, 1995). Sin embargo, la modalidad parece ser independiente de WaaL (Feldman *et al.*, 2005) y estar determinada antes de que tenga lugar el proceso de ligación (Daniels *et al.*, 2002). Estudios sobre el proceso de translocación llevado a cabo por Wzx sugieren la formación de un complejo junto con Wzz y Wzy (Marolda *et al.*, 2006). Recientemente, además, se ha demostrado la presencia de un dominio en la proteína WbaP de *S. enterica* que afecta la distribución modal, posiblemente, mediante una interacción con Wzz (Saldías *et al.*, 2008).

#### **1.2.4.3.3.2 Sistema transportador ABC-dependiente**

El sistema transportador ABC-dependiente (Fig 1.19) está implicado mayoritariamente en la síntesis de homopolisacáridos lineales, sin ramificaciones. No obstante, también ha sido descrito este mecanismo en algunos heteropolisacáridos (Izquierdo *et al.*, 2003b; Feng *et al.*, 2004). Hasta el momento, todos los antígenos O sintetizados por esta vía presentan homólogos de la proteína WecA como iniciadores. El Und-PP-GlcNAc que se forma actúa como cebador para la extensión de la cadena, de manera que, posteriormente, la GlcNAc será transferida a la estructura del núcleo-lípido A durante el proceso de ligación, y, aunque no forma parte de la subunidad repetitiva, se hallará un residuo por cada cadena de antígeno O. A continuación, una glicosiltransferasa específica del antígeno O transfiere un adaptador al Und-PP-GlcNAc, el cual también se hallará en la molécula final de LPS, necesario para la adición progresiva de los residuos que formarán subunidades repetitivas hasta completar la cadena del antígeno O en la cara citoplasmática de la membrana interna. Los azúcares se añaden a la cadena por el extremo no reductor del polímero en formación ligado al Und-PP, de forma que no es necesaria una actividad polimerasa, mediante transferasas que pueden ser monofuncionales o pueden añadir dos o más residuos con un enlace específico. Todo el proceso requiere una única molécula de Und-P por polímero, de manera que el reciclaje del Und-PP no es un factor limitante y la vía es resistente a la bacitracina (Raetz y Whitfield, 2002).

Una vez finalizada la polimerización del antígeno O, la translocación a través de la membrana interna es llevada a cabo por un transportador ABC de la subfamilia ABC-2, que consiste en una proteína integral de membrana, Wzm, y una proteína hidrofílica, Wzt, que contiene un dominio de unión al ATP en la región N-terminal (Raetz y Whitfield, 2002). En varios antígenos O sintetizados mediante esta vía, se han hallado residuos

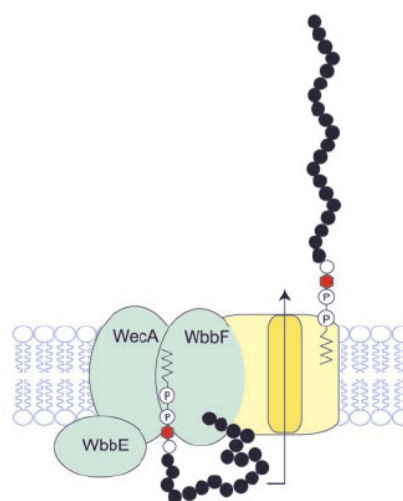
terminales no reductores, como, por ejemplo, grupos metilo, responsables de la terminación de la cadena y la regulación de su longitud. En los antígenos O8 y O9a de *E. coli*, se ha descrito, además, que esta modificación, producida por la proteína WbdD, es requerida para la translocación, acoplándose la terminación de la cadena y su transporte (Clarke *et al*, 2004) y que el dominio C-terminal de Wzt reconoce, concretamente, este residuo no reductor del extremo del polímero (Cuthbertson *et al*, 2007).



**Figura 1.19.** Esquema de la polimerización y translocación del antígeno O del LPS mediante el sistema transportador ABC-dependiente. Figura adaptada de Raetz y Whitfield, 2002.

### 1.2.4.3.3 Sistema sintasa-dependiente

El sistema sintasa-dependiente es únicamente conocido en el antígeno O:54 de *S. enterica* serovar Borreze (Fig 1.20). La síntesis de este homopolímero de *N*-acetilmanosamina (ManNAc) se inicia por la acción de WecA y, seguidamente, la transferasa específica WbbE añade el adaptador, que en este caso es el primer residuo de ManNAc, al Und-PP-GlcNAc. Una segunda transferasa específica, WbbF, lleva a cabo la extensión de la cadena mediante la unión de más residuos de ManNAc. WbbF es una proteína integral de membrana que actúa como una sintasa, catalizando de forma procesiva la reacción de polimerización de la cadena polisacáridica y translocándola, simultáneamente, a través de la membrana.



**Figura 1.20.** Esquema de la polimerización y translocación del antígeno O del LPS mediante el sistema sintasa-dependiente. Figura adaptada de Raetz y Whitfield, 2002.

Aunque se desconoce el mecanismo exacto de transporte del polímero, así como también el de terminación de la cadena (Keenleyside and Whitfield, 1996).

#### 1.2.4.4 Organización genética del antígeno O

Los genes necesarios para la biosíntesis del antígeno O se hallan generalmente localizados en una única agrupación génica denominada *wb* que, mayoritariamente, es cromosómica. El antígeno O:54 de *S. enterica* serovar Borreze, codificado en un plásmido, representa una excepción. El número de genes varía en función de la composición y complejidad del antígeno O. La mayoría de ellos presentan sus pautas de lectura solapadas y muchas veces se transcriben como una única unidad. Estos genes contiguos codifican las enzimas para la biosíntesis de los precursores azúcar nucleótido, las glicosiltransferasas y las proteínas implicadas en la translocación del antígeno O a través de la membrana interna y en su polimerización. Algunos antígenos O contienen componentes que no son azúcares y los genes relacionados con su biosíntesis o transferencia pueden estar presentes en la agrupación (Samuel y Reeves, 2003). Por otro lado, en algunas agrupaciones que codifican homopolisacáridos, se ha hallado el gen que codifica la enzima implicada en la modificación del extremo terminal del antígeno O (Clarke *et al.*, 2004).

La mayoría de las agrupaciones *wb* parecen expresarse constitutivamente y suelen estar precedidas por una secuencia JUMPStart que contiene la región *ops*, lo cual indica la actuación de un mecanismo de antiterminación de la transcripción de estos largos operones (ver apartado 1.2.3.4) (Raetz y Whitfield, 2002).

En el caso de *Y. enterocolitica* O:8, existe una regulación de la transcripción de la agrupación *wb* por la temperatura, de manera que a 20°C la transcripción es óptima y a 37°C, se produce muy poca cantidad de antígeno O. Se ha identificado un operón a 3' de la agrupación que contiene los genes *rosA* y *rosB*, que afectan, indirectamente, a esta regulación transcripcional. RosA y RosB constituyen una bomba de expulsión de péptidos catiónicos y un cotransportador antiporte de  $K^+/H^+$ , respectivamente. Su síntesis se activa a 37°C y el descenso en los niveles intracelulares de  $K^+$  y el aumento de  $H^+$  pueden ser la señal que afecte a la represión de la transcripción a nivel del promotor propio del gen *wzz* (Bengoechea *et al.*, 2002).

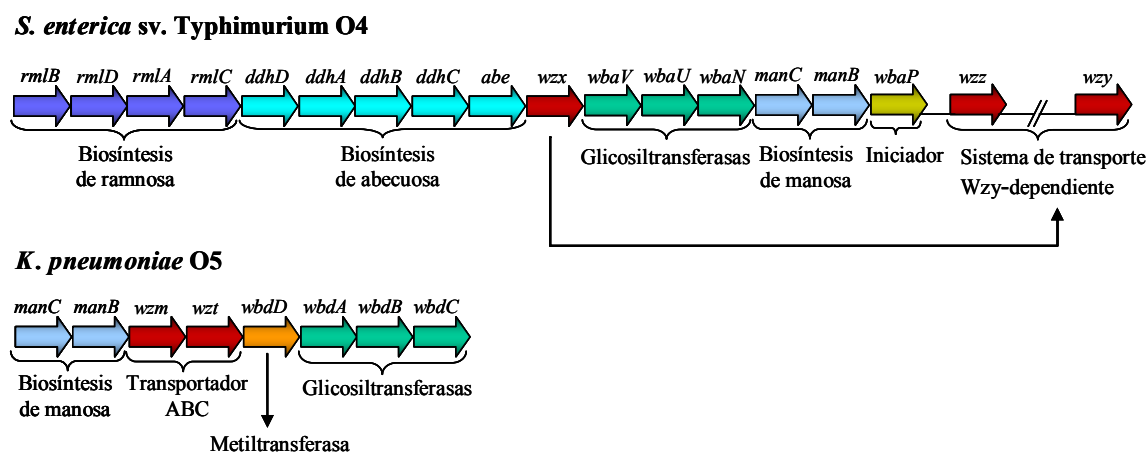
En *S. typhimurium*, la expresión del gen *wzz* de la agrupación *wb* está sujeta al control de varios sistemas reguladores de dos componentes, que inducen la transcripción



bajo diferentes condiciones ambientales, como la presencia de  $\text{Fe}^{3+}$  o de bajas concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  (Delgado *et al.*, 2006).

Varias bacterias producen una distribución bimodal de las cadenas del antígeno O, con dos tipos de grupos de longitudes diferentes, y dos genes *wzz* han sido identificados responsables de la regulación de cada una de ellas. Uno de los genes se halla en la agrupación *wb*, mientras que el otro presenta una localización cromosómica distinta, como ocurre en *S. typhimurium* (Murray *et al.*, 2003) o *P. aeruginosa* (Daniels *et al.*, 2002; Kintz *et al.*, 2007) o, en el caso de *Shigella flexneri*, una localización plasmídica (Stevenson *et al.*, 1995; Carter *et al.*, 2007).

La gran diversidad de estructuras de antígenos O diferentes se refleja, también, a nivel de las agrupaciones génicas *wb* (Fig. 1.21), las cuales muestran, en general, un bajo contenido de guanina y citosina (G+C) respecto a la media observada en el genoma correspondiente, lo que puede ser debido a transferencias horizontales entre especies, que podrían explicar, en parte, dicha diversidad. Los genes implicados en las rutas de biosíntesis de los azúcares nucleótido se encuentran, normalmente, agrupados dentro de la región *wb*, constituyendo módulos de genes separados, mientras que los que codifican glicosiltransferasas se suelen situar de forma dispersa. La asignación de una función específica a los genes de las agrupaciones del antígeno O resulta difícil en el caso de las glicosiltransferasas (Samuel y Reeves, 2003).



**Figura 1.21.** Esquema de las agrupaciones génicas *wb* de *S. enterica* sv. Typhimurium O4 (Liu *et al.*, 1995) y *K. pneumoniae* O5 (Merino *et al.*, 2000). Los genes que codifican las enzimas implicadas en la biosíntesis de los precursores activados se muestran en azul; los que codifican las glicosiltransferasas, en verde; el que codifica el iniciador, en amarillo; y los que están implicados en la polimerización y el transporte, en rojo. En naranja, se ha representado el gen que codifica la modificación terminal del homopolisacárido (Clarke *et al.*, 2004).

Hasta el momento, en *Aeromonas* spp., sólo se ha descrito la agrupación génica implicada en la biosíntesis del antígeno O de las cepas PPD134/91 y JCM3980 de *A. hydrophila* (serotipo O:18). Esta agrupación incluye 17 genes, entre los cuales han sido identificados, mediante el análisis de similitud de aminoácidos, siete genes que codifican las enzimas implicadas en las rutas de biosíntesis de los precursores azúcar nucleótido dTDP-ramnosa y GDP-manosa; seis genes que codifican putativas transferasas; y los genes *wzx* y *wzz*. La función de alguna de las pautas abiertas de lectura no ha podido ser asignada al no disponer de la estructura química (Zhang *et al.*, 2002).

### 1.2.5 Ligación del antígeno O al núcleo del LPS

El mecanismo de ligación del antígeno O al núcleo del LPS a nivel del periplasma no ha sido completamente caracterizado, y el producto del gen *waaL* es la única enzima que se conoce que es requerida para el proceso. Se trata de una proteína integral de membrana interna con ocho o más dominios transmembrana. Las secuencias primarias obtenidas de las diversas especies presentan entre ellas bajos niveles de similitud pero comparten una estructura secundaria muy conservada con dominios hidrofóbicos de similar distribución y longitud. Esta diversidad en su secuencia primaria se asocia a la especificidad de la ligasa en el reconocimiento de una estructura determinada de núcleo, dado que pueden unir a este aceptor antígenos O de otras especies bacterianas y que hay núcleos que requieren no sólo el residuo al que se une el antígeno O, sino también la presencia de otros residuos proximales específicos para que tenga lugar la ligación (Whitfield *et al.*, 1997).

Se ha propuesto que la ligación del antígeno O mediada por WaaL comprende el reconocimiento y la separación del antígeno O unido al Und-PP y la transferencia de éste al aceptor núcleo-lípido A. No obstante, no hay evidencia experimental que corrobore este modelo. Sin embargo, estudios más recientes, apuestan por un proceso de interacciones más complicado en el que la proteína WaaL no sería la única implicada en el reconocimiento del aceptor, en el que deben intervenir otros factores adicionales. Se ha sugerido que WaaL formaría parte de un complejo que interacciona de forma específica con intermediarios del antígeno O unidos a Und-PP y con el aceptor núcleo-lípido A (Kaniuk *et al.*, 2004). Anteriormente, había sido propuesto un modelo para la vía de biosíntesis del antígeno O Wzy-dependiente en el que un complejo formado por Wzx, Wzy y WaaL estaría implicado en reconocer los azúcares unidos al Und-PP (Feldman *et al.*, 1999). Wzz es otra de las proteínas de esta vía que se piensa que podría interaccionar con

WaaL, Wzy y los azúcares unidos al und-PP para formar un complejo y que diferentes proporciones de cada una de ellas podrían determinar la elongación o terminación de la cadena del antígeno O (Daniels y Morona, 1999). De esta manera, las variaciones en las secuencias de las ligasas podrían reflejar no sólo especificidad por la estructura del aceptor, sino también por las proteínas que formarían parte del complejo de biosíntesis (Raetz y Whitfield, 2002), sin embargo interacciones proteína-proteína en las que esté implicada WaaL no han sido demostradas.

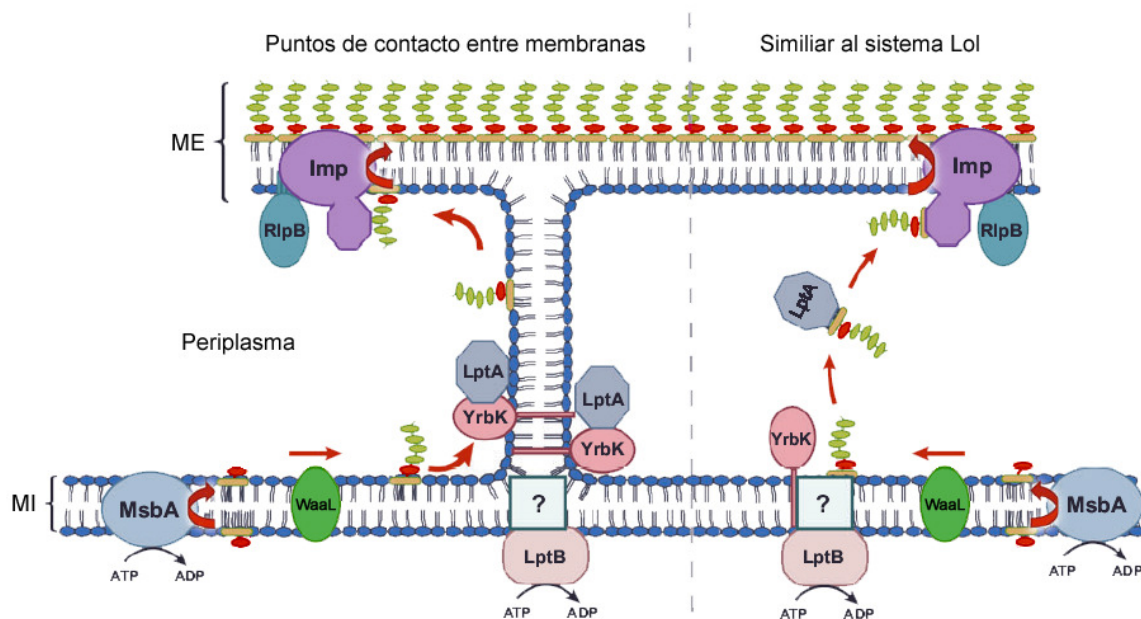
Análisis de los dominios conservados entre ligasas de diferentes especies revelaron la existencia de dos motivos conservados a nivel periplasmático, que resultaron cruciales para la reacción de ligación y que, por lo tanto, podrían estar implicados en la liberación del antígeno O del Und-PP y la transferencia al núcleo, más que en el reconocimiento de un aceptor específico. Por otro lado, también se describió que la región C-terminal de la ligasa de *V. cholerae*, que contiene un gran lazo periplasmático, sería la responsable de la discriminación entre diferentes estructuras de núcleo (Schild *et al.*, 2005). La existencia de un residuo de histidina conservado en este gran lazo periplasmático e indispensable para la función de la enzima también se ha observado en *P. aeruginosa*. Además, se ha descrito que la enzima WaaL de esta bacteria, la cual podría funcionar en forma de dímero, posee actividad ATPasa a bajas concentraciones de ATP, por lo que podría utilizar esta fuente de energía para formar el enlace glicosídico entre el antígeno O y el núcleo, y se han identificado dos putativos motivos de unión e hidrólisis de ATP (Abeyrathne y Lam, 2007).

### **1.2.6 Transporte del LPS a la membrana externa**

El destino final del LPS es la superficie externa de la membrana externa. Como ya se ha comentado, los diferentes constituyentes del LPS se sintetizan en la cara citoplasmática de la membrana interna y la estructura núcleo-lípido A y las subunidades del antígeno O se sintetizan y se transportan a través de dicha membrana de forma separada. Mientras que la translocación del núcleo-lípido A es mediada por el transportador ABC MsbA (ver apartado 1.2.3.3), las subunidades del antígeno O se transfieren a través de la membrana interna mediante la ruta Wzy-dependiente, transportador ABC-dependiente o sintasa-dependiente (ver apartado 1.2.4.3.3). La unión del antígeno O, después de su polimerización previa o no a la translocación, a la estructura núcleo-lípido A tiene lugar en

la cara periplasmática de la membrana interna mediante un proceso que, como mínimo, implica la acción de la ligasa WaaL (ver apartado 1.2.5).

Existen dos modelos para explicar el transporte del LPS a través del periplasma sin que ninguno de ellos haya sido probado o descartado de forma definitiva (Bos *et al.*, 2007). Una posibilidad es que se trate de un mecanismo semejante al sistema Lol de transporte de lipoproteínas, de manera que, la proteína citoplasmática LptB, junto con una proteína desconocida integral de membrana interna y, posiblemente, la proteína YrbK formarían el transportador ABC que entrega el LPS a la chaperona periplasmática LptA (Sperandeo *et al.*, 2007). El LPS sería transferido al dominio periplasmático del complejo formado por la proteína integral de membrana externa Imp y la lipoproteína RlpB, que lo transportaría a la superficie celular mediante una función flipasa, existiendo la posibilidad de que una de las dos fuese la aceptora del LPS y la otra la transportadora (Wu *et al.*, 2006) (Fig. 1.22). Un modelo alternativo postula que el transporte del LPS podría tener lugar en puntos de contacto entre la membrana interna y la membrana externa, conocidos como uniones de Bayer (Tefsen *et al.*, 2005). En este modelo, LptA, LptB, YrbK y una proteína de membrana interna podrían estar implicadas en la formación de estas zonas de adhesión (Bos *et al.*, 2007) (Fig. 1.22). LptA y LptB son dos proteínas implicadas en la biogénesis de la membrana externa que forman parte, junto con Imp y otras proteínas responsables del transporte y ensamblaje de OMP, del regulón  $\sigma^E$  de *E. coli* (Sperandeo *et al.*, 2007).



**Figura 1.22.** Modelos para el transporte del LPS a través del periplasma e incorporación en la membrana externa. Las vías de translocación a través de la membrana interna y de biosíntesis del antígeno O en el periplasma no están representadas. ME: Membrana externa; MI: Membrana interna. Figura adaptada de Bos *et al.*, 2007.