

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA

Tesi doctoral presentada per En/Na

Luis IZQUIERDO LÁZARO

amb el títol

**"Biosíntesis del lipopolisacárido de
Klebsiella Pneumoniae"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 21 de març de 2003

INTRODUCCIÓN	1
1.1 El género <i>Klebsiella</i>	3
1.2 El lipopolisacárido	9
1.2.1 Importancia biológica	9
1.2.2 Estructura química general del LPS	11
1.2.3 Biosíntesis del LPS	12
1.2.4 El lípido A	13
1.2.5 El núcleo del LPS	20
1.2.6 El antígeno O	29
OBJETIVOS	41
2 MATERIAL Y MÉTODOS	45
2.1 Cepas Bacterianas	47
2.2 Vectores utilizados	48
2.3 Medios de cultivo	49
2.4 Obtención de cepas bacterianas resistentes a la rifampicina	50
2.5 Estudios con bacteriófagos	50
2.6 Estudios de la superficie celular	50
2.7 Métodos inmunológicos	58
2.8 Obtención de suero no-inmune	60
2.9 Adherencia a células uroepiteliales (UEC)	60
2.10 Infección del tracto urinario en ratas	61
2.11 Dosis letal 50	61
2.12 Análisis de resistencia a antibióticos	61
2.13 Técnicas de genética molecular	62
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
3 Clonaje y secuenciación de la agrupación génica <i>wb_{O5}</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i>. Contribución del antígeno O5 a la virulencia.	79
3.1 Precedentes	79
3.2 Clonaje de la agrupación génica <i>wb_{KpO5}</i>	79
3.3 Secuenciación del clon CosKT4	80
3.4 Análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas de las ORFs ..	81
3.5 Construcción y caracterización de los mutantes KT769-1 (<i>wbdC</i>) y KT769-6 (<i>wzm-wzt</i>)	84
3.6 Contribución del antígeno O5 del LPS a la patogenicidad	

de <i>K. pneumoniae</i> KT769	85
3.7 Discusión	88
4 Caracterización de la agrupación génica <i>wb</i>_{O12} de <i>Klebsiella pneumoniae</i>.	
Estudios de complementación entre mutantes de <i>Serratia marcescens</i>	
N28b O4- y mutantes de <i>K. pneumoniae</i> O12-.	95
4.1 Precedentes	95
4.2 Clonaje de la agrupación génica <i>wb</i> _{KpO12}	95
4.3 Subclonaje de CosKT12 y secuenciación de la agrupación de genes <i>wb</i> _{KpO12}	96
4.4 Análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas de las ORFs ..	97
4.5 Componentes de <i>wb</i> _{SmO4} y de <i>wb</i> _{KpO12} que determinan la especificidad de uno y otro antígeno.....	99
4.6 Discusión	104
5 Caracterización de los genes responsables de la síntesis del núcleo del LPS en <i>Klebsiella pneumoniae</i> 52145 (O1:K2).	109
5.1 Precedentes	109
5.2 Secuencia de la agrupación génica <i>waa</i> en la cepa 52145.....	109
5.3 Construcción y determinación de algunas características fenotípicas de los mutantes de diversos genes de la agrupación <i>waa</i> ₅₂₁₄₅	111
5.4 Análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas de las ORFs y caracterización funcional	115
5.5 Construcción de un triple mutante en ORF4- <i>waaL</i> -ORF5 de <i>K. pneumoniae</i> 52145 y complementación con ORF4- <i>waaL</i> -ORF5 de <i>K. pneumoniae</i> C3	129
5.6 Discusión	131
CONCLUSIONES	141
BIBLIOGRAFÍA	145
ANEXO	163

1.1 El género *Klebsiella*

1.1.1 Taxonomía y hábitat

La primera mención de una especie del género *Klebsiella* fue realizada por von Frisch en 1881, que se refirió a un bacilo capsulado observado en muestras de pacientes con rinoscleroma. El género *Klebsiella* fue denominado así por Trevisan en 1885, en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs (1834-1913). La especie tipo de este género es *Klebsiella pneumoniae*, que fue descrita por Schroeter en 1886, y por Trevisan en 1887.

El género *Klebsiella* está formado por bacilos Gram negativos, anaeróbicos facultativos y oxidasa negativos. Pertenece pues a la familia *Enterobacteriaceae*, familia formada por una gran cantidad de especies bacterianas. Además de los rasgos ya mencionados, las bacterias del género *Klebsiella* se caracterizan por ser generalmente capsuladas, no móviles, productoras de la enzima lisina descarboxilasa pero no de la enzima ornitina descarboxilasa, y normalmente positivas a la prueba de Voges-Proskauer (Edwards y Ewing, 1986). El porcentaje de guanina-citosina del ADN de las especies del género oscila entre el 53 y el 58% (Ørskov, 1984).

La taxonomía de *Klebsiella* se caracteriza por una variada nomenclatura que refleja su compleja historia taxonómica. Inicialmente la importancia médica del género llevó a su subdivisión en tres especies, según las enfermedades que causaban: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis*. Conforme fue mejorando la taxonomía debido al desarrollo de nuevas metodologías, la clasificación de las especies dentro del género fue continuamente revisada. Actualmente resulta difícil la adopción de una nomenclatura consistente debido al hecho de que Gran Bretaña y los países de la antigua Commonwealth se adhieren a la clasificación de Cowan (Cowan *et al.*, 1960), mientras que la mayoría de los países europeos y Estados Unidos se decantan por la clasificación de Ørskov (Ørskov, 1984), más extendida mundialmente (Tabla 1.1).

Klebsiella spp. es ubicua en la naturaleza. Probablemente tiene dos hábitats comunes: el medio ambiente, en el cual se halla en aguas superficiales y residuales, en el suelo y sobre las plantas; y las superficies mucosas de mamíferos. En humanos portadores *K. pneumoniae* se encuentra en las vías respiratorias superiores y en el tracto intestinal (Podschun y Ullmann, 1998).

Clasificación de:	
Cowan	Ørskov
<i>K. aerogenes</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>K. edwardsii</i>	subesp. <i>pneumoniae</i>
subesp. <i>edwardsii</i>	subesp. <i>ozaenae</i>
subesp. <i>atlantae</i>	subesp. <i>rhinoscleromatis</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>
<i>K. ozaenae</i>	<i>K. terrigena</i>
<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. planticola</i> (sin. <i>K. trevisanii</i>)
	<i>K. ornithinolytica</i>

Tabla 1.1. Clasificación de las especies del género *Klebsiella* según dos sistemas taxonómicos diferentes.

1.1.2 Patogenia y epidemiología

La gran mayoría de las infecciones por *Klebsiella* están asociadas con la hospitalización, aunque en los continentes asiático y africano persisten como importantes causantes de diversas enfermedades adquiridas en la comunidad (Ko *et al.*, 2002). Como patógenos oportunistas que son, las especies del género *Klebsiella* infectan principalmente a individuos inmunocomprometidos que se hallan hospitalizados y padecen severas enfermedades subyacentes, como pueden ser la diabetes mellitus o la obstrucción pulmonar crónica. Las infecciones nosocomiales por *Klebsiella* son causadas principalmente por *Klebsiella pneumoniae*, la especie más importante del género desde el punto de vista médico y están asociadas a una alta morbilidad y mortalidad. Se estima que el género *Klebsiella* es el responsable del 8% de las infecciones nosocomiales bacterianas en los Estados Unidos y en Europa, lo cual lo sitúa entre los ocho patógenos infecciosos más importantes en hospitales. *Klebsiella pneumoniae* causa, principalmente, infecciones del tracto urinario y neumonías y es el segundo agente causal, tras *E. coli*, de septicemias nosocomiales por bacterias Gram negativas.

El porcentaje de individuos portadores de *Klebsiella* aumenta radicalmente en el ambiente hospitalario y la colonización en el paciente se asocia significativamente con la utilización de antibióticos (Podschun y Ullmann, 1998). Las terapias antimicrobianas, además, han sido a menudo responsables de la emergencia de cepas de *Klebsiella* resistentes a múltiples antibióticos en hospitales, lo cual ha generado un renovado interés en el estudio de *Klebsiella* como agente infeccioso. En los años setenta las cepas multirresistentes lo eran a aminoglicósidos (gentamicina, estreptomina, etc) principalmente, pero a partir de los años ochenta comenzaron a detectarse también

cepas productoras del β -lactamasas de amplio espectro (ESBLs), lo cual les confería resistencia a las cefalosporinas incluso de tercera generación (como la cefotaxima). Todo esto ha llevado a considerar que la prevención de las infecciones nosocomiales producidas por *Klebsiella* requiere de nuevas aproximaciones, tales como la vacunación de los principales grupos de riesgo, y en general un estudio más detallado de la virulencia de *Klebsiella*.

1.1.3 Factores de virulencia

Los principales factores de virulencia asociados a *Klebsiella pneumoniae* son los polisacáridos capsulares, las fimbrias o adhesinas, los sideróforos y el lipopolisacárido (Williams y Tomás, 1990). Todos ellos tienen una gran importancia y la patogenicidad de la bacteria es resultado de la acción conjunta de varios de estos factores, que permitirán a la bacteria entrar y multiplicarse en el interior del hospedador, resistir su sistema inmune (o simplemente no estimularlo) y producirle un daño.

1.1.3.1 Polisacáridos capsulares (CPSs)

Una de las características principales de *Klebsiella* es que, generalmente, es capsulada. Esta cápsula es una estructura superficial formada por exopolisacáridos complejos que han permitido clasificar a *Klebsiella* en 77 serotipos, ampliamente utilizados en investigaciones epidemiológicas, según el antígeno capsular (K) que presentan (Ørskov y Ørskov, 1984). El material capsular forma envolturas gruesas que recubren la superficie bacteriana, protegiendo a la célula de la opsonofagocitosis y de la actividad bactericida del suero. Desde el punto de vista de la opsonofagocitosis, el CPS provee a la bacteria de una barrera física antifagocítica que impide la interacción entre las opsoninas del complemento y los receptores del complemento de las células fagocíticas (Álvarez *et al.*, 2000). En cuanto a la actividad bactericida del suero, el CPS actúa enmascarando las moléculas de la superficie bacteriana sobre las cuales se deposita el componente C3 de la cascada del complemento (Cortés *et al.*, 2002). En ambos casos, la presencia de cadena lateral O en el lipopolisacárido de la bacteria también juega un papel importante, de forma que la resistencia al complemento depende, en gran medida, de ambos componentes.

Se han realizado diversos estudios que han permitido asociar una mayor virulencia de *Klebsiella* con ciertos tipos de antígeno capsular, como es el caso de los antígenos K1 y K2 (revisado en Williams y Tomás, 1990; y en Podschun y Ullmann,

1998). En este sentido, la mayoría de los análisis concuerdan en que el antígeno K2 se encuentra entre los antígenos capsulares más comúnmente hallados en pacientes con infecciones del tracto urinario, neumonía y bacteremia.

1.1.3.2 Pilis (Fimbrias)

La habilidad de la bacteria para adherirse y colonizar las superficies mucosas del organismo hospedador es una etapa crítica en el desarrollo de la infección. Las propiedades adhesivas en *Klebsiella*, y en la mayoría de las *Enterobacteriaceae*, son generalmente mediadas por diversos tipos de pilis (también conocidos como fimbrias), que son proyecciones filamentosas no flagelares que se hallan sobre la superficie bacteriana y que están compuestos por subunidades proteicas globulares (pilinas). Estas estructuras filamentosas se extienden desde la superficie bacteriana y permiten la unión a las células eucariotas a través de receptores específicos (Podschun y Ullmann, 1998).

De los diversos tipos de pilis descritos en las enterobacterias, *Klebsiella pneumoniae* produce principalmente:

- Pilis tipo 1: Permite la unión a trisacáridos de manosa de las glicoproteínas del hospedador. Son de especial relevancia para la virulencia de la bacteria, puesto que permiten la unión de ésta al mucus o a células epiteliales del tracto urogenital, respiratorio e intestinal. A nivel renal, estos pilis permiten la unión de la bacteria al túbulo proximal. Tras la colonización de la membrana mucosa, y una vez atravesada esta, los pilis de tipo 1 dejan de ser útiles para la bacteria, puesto que activan su fagocitosis por parte de los leucocitos. Normalmente, las bacterias superan esta forma de defensa del hospedador mediante un proceso de variación de fase, a través del cual inactivan la expresión de los pilis de tipo 1.
- Pilis tipo 3: Fueron originalmente descritos como orgánulos de adhesión de especies de *Klebsiella* que habitaban en raíces de plantas, aunque posteriormente se demostró que permitían la unión a varios tipos celulares humanos. Las cepas de *K. pneumoniae* que expresan pilis de tipo 3 tienen capacidad para adherirse a células endoteliales, al epitelio del tracto respiratorio y a células uroepiteliales. En los riñones estos pilis median la adhesión bacteriana a las membranas basales tubulares, a las cápsulas de Bowman y a los vasos renales. La función exacta de este tipo de fimbrias en el proceso de patogénesis es todavía desconocida, aunque han sido relacionadas

con la formación de ‘biofilms’ *in vitro* (Langstraat *et al.*, 2001) y con la unión al colágeno de tipo IV y tipo V (Sebghati *et al.*, 1998).

Además de las fimbrias mencionadas, se han descrito en *K. pneumoniae* otras adhesinas, algunas de ellas codificadas en plásmidos R (plásmidos que permiten la transferencia horizontal entre bacterias de resistencias a antibióticos). Asimismo, *Klebsiella pneumoniae* presenta en su superficie diversas macromoléculas que pueden contribuir considerablemente a la adhesión. Entre ellas destacaremos el polisacárido capsular, que participa en las últimas etapas de la colonización facilitando la formación de ‘biofilms’ sobre la superficie de las mucosas, y el antígeno O del lipopolisacárido, que confiere unas características físico-químicas específicas a la superficie celular con lo que juega un importante papel en todas sus interacciones (Williams y Tomás, 1990).

1.1.3.3 Sideróforos

El crecimiento de las bacterias en los tejidos del hospedador no sólo está limitado por los mecanismos de defensa de éste, si no también por la capacidad de la bacteria para adquirir nutrientes esenciales para su crecimiento como el hierro. La cantidad de hierro libre disponible para la bacteria en el interior del hospedador es extremadamente baja para el crecimiento normal de la bacteria, dado que este elemento se encuentra unido intracelularmente a diversas proteínas, como la hemoglobina, la ferritina, la hemosiderina y la mioglobina, y extracelularmente a proteínas de unión de hierro de alta afinidad, como la lactoferrina y la transferrina. Muchas bacterias tratan de asegurar su suministro de hierro en el hospedador secretando quelantes de hierro de alta afinidad y bajo peso molecular, denominados sideróforos, que son capaces de obtener hierro unido a las proteínas del hospedador. Diversos estudios han permitido acumular una gran cantidad de evidencias que indican que la capacidad de las bacterias para capturar hierro *in vivo* contribuye de forma importante a su virulencia.

En condiciones limitantes de hierro, las enterobacterias sintetizan sideróforos que pertenecen a dos grupos químicos diferentes, los de tipo fenolato y los de tipo hidroxiamato. En el género *Klebsiella* se ha demostrado la producción de enterobactina (de tipo fenolato), común a la mayoría de las cepas, y con mucha menor frecuencia de aerobactina (de tipo hidroxiamato). El papel que juega la síntesis enterobactina en la virulencia de *Klebsiella* es bastante incierto, mientras que la contribución de la aerobactina ha sido claramente demostrada. Además, existen cepas de *K. pneumoniae* que no sintetizan aerobactina, pero que son capaces de utilizarla como fuente de hierro,

dato que expresan el receptor de este sideróforo. Según parece, la alta afinidad de la enterobactina permite a la bacteria obtener el hierro unido a la transferrina, mientras que la fuente de hierro de la aerobactina son las células del hospedador. Así, la bacteria que sintetiza enterobactina, obtiene con la producción de aerobactina acceso a dos fuentes de hierro, lo cual facilita su crecimiento en el organismo hospedador y aumenta su virulencia (revisado en Williams y Tomás, 1990; y en Podschun y Ullmann, 1998).

En *K. pneumoniae* existen, además, otras proteínas de membrana externa reguladas por la presencia de hierro libre en el medio, cuya función es aún desconocida y que pueden funcionar como receptoras de sideróforos no sintetizados por la misma bacteria.

1.1.3.4 Lipopolisacárido (LPS)

El lipopolisacárido (LPS) es una molécula glucolipídica anclada en la cara externa de la membrana externa de la mayoría de las bacterias Gram negativas que consiste en una porción polisacarídica unida covalentemente al lípido A. La parte polisacarídica consta de dos regiones, el núcleo del lipopolisacárido y la cadena lateral O ó antígeno O. En *K. pneumoniae* se han descrito once estructuras diferentes en su antígeno O que pueden ser diferenciadas por métodos inmunológicos, aunque algunas similitudes estructurales producen reactividad cruzada de forma que el número actual de serotipos diferentes es de nueve: O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 y O12. El serotipo O1 es el antígeno O más comúnmente hallado en los aislados clínicos de *Klebsiella* (Hansen *et al.*, 1999).

Su contribución a la virulencia se debe, por un lado, a la actividad endotóxica producida por la parte lipídica, el lípido A, que provoca la activación de los macrófagos, induce la respuesta inflamatoria y tiene un efecto pirógeno. Por otro lado, la presencia de las cadenas polisacarídicas del antígeno O facilitan el proceso inicial de adhesión y confieren resistencia a la bacteria contra la actividad bactericida del suero no inmune. Éste último aspecto del antígeno O es quizás el más importante (Merino *et al.*, 1992). Las cadenas laterales O del LPS que no quedan cubiertas y protegidas por el polisacárido capsular son expuestas al medio exterior y en ellas se deposita el componente C3b del complemento, pero, dado que éste se une principalmente a las cadenas laterales O más largas, queda demasiado alejado de la membrana bacteriana, con lo que no se produce la formación del complejo de ataque a la membrana impidiendo, en última instancia, la formación del poro que provoca la muerte de la

bacteria. Así pues, las cadenas de antígeno O, representan una barrera física que impide la correcta actuación de la cascada de reacciones de las proteínas del complemento.

Es precisamente el estudio de diversos aspectos del lipopolisacárido el objetivo básico de esta tesis doctoral.

1.2 El lipopolisacárido

1.2.1 Importancia biológica

El LPS es indispensable para la supervivencia de las bacterias Gram negativas, puesto que juega un papel fundamental en el mantenimiento y la organización de la membrana externa de estas bacterias. La membrana externa de las bacterias Gram negativas es una bicapa lipídica asimétrica, la cara interna de la cuál está formada por los fosfolípidos que se hallan normalmente en las membranas bacterianas (Raetz y Whitfield, 2002). La cara externa, sin embargo, está constituida principalmente por LPS, orientado de forma que el componente hidrófobo de éste forma la parte exterior de la bicapa lipídica y queda oculto por los componentes polisacáridicos de la molécula. Esta situación hace que el LPS esté en contacto directo con el medio, de manera que constituye el antígeno superficial más importante de las bacterias Gram negativas y es uno de los principales blancos tanto de bacteriófagos como de los sistemas de defensa del organismo hospedador. A pesar de esto juega un importante papel en la virulencia bacteriana ya que puede conferir resistencia a la actividad bactericida del complemento y prevenir la activación de las defensas celulares.

Por otro lado, el LPS liberado durante la división o muerte bacteriana puede interactuar con diversos receptores expresados por células diana del LPS, como granulocitos, linfocitos y, en particular, monocitos y macrófagos. En respuesta al LPS, estas células secretan mediadores endógenos con diversas actividades que, en última instancia, provocan los efectos típicos de las endotoxinas y que pueden dar lugar a un shock irreversible conocido como shock séptico o endotoxemia. El componente esencial que conduce a la generación de estos efectos es la parte lipídica del LPS, el lípido A, y es por este motivo por el cual el LPS es también conocido como endotoxina (Rietschel *et al.*, 1996).

La complejidad estructural y la gran variedad de propiedades inmunológicas y biológicas del LPS, han determinado que sea ésta una de las moléculas bacterianas más

estudiadas, tanto desde el punto de vista de su estructura, como desde el de su biosíntesis y la organización genética de ésta.

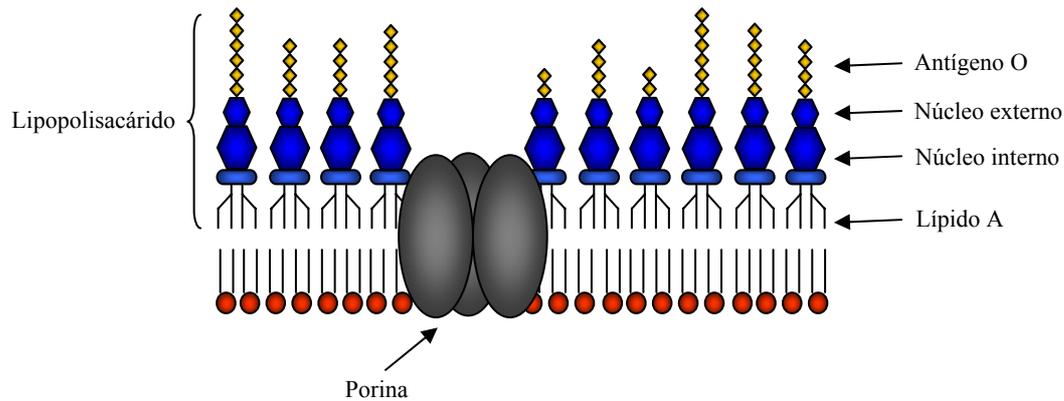


Fig. 1.1. Estructura y disposición del LPS en la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

1.2.1.1 Moléculas de unión y dianas celulares del LPS

Entre los factores humorales que interactúan con el LPS destacan las lipoproteínas de alta densidad (HDL), la proteína sCD14, forma soluble del receptor CD14, y, sobre todo, la LBP (*LPS binding protein*) que aumenta drásticamente la actividad del LPS y del lípido A. Las HDL actúan atenuando los efectos que provoca el LPS a nivel sistémico, ejerciendo una función detoxificadora, mientras que la sCD14, se une al LPS y activa la producción de citoquinas en células endoteliales, las cuales no expresan el receptor CD14. La proteína LBP transporta el LPS hacia diversas dianas celulares, actuando como un amplificador biológico que permite al hospedador detectar pequeñas cantidades de LPS, activar su sistema de defensa y afrontar la invasión del microorganismo (Rietschel *et al.*, 1996).

En cuanto a las diversas dianas celulares que pueden ser afectadas por la presencia del LPS, destacan los monocitos y los macrófagos tisulares, en los cuales el LPS es transferido a la proteína CD14, unida a la superficie celular, mediante la proteína LBP. Esto provoca la activación del receptor LTR4 (*toll like receptor 4*) que inducirá la biosíntesis de diversos mediadores de la inflamación, como el TNF- α (*tumoral necrosis factor α*) y la IL1- β , y de moléculas requeridas para la activación de la respuesta inmune adaptativa (Raetz y Whitfield, 2002). Además, el LPS estimula la capacidad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares (importante en los primeros pasos inespecíficos del sistema de defensa del hospedador); activa la proliferación, la

diferenciación y la secreción de anticuerpos en los linfocitos B; e induce la producción de diversas citoquinas por parte de las células endoteliales.

Todos estos efectos provocados por el LPS son deseables para la eliminación de infecciones localizadas. Sin embargo, la excesiva estimulación sistémica en el caso de infecciones severas y el efecto sinérgico de los diferentes mediadores producidos, puede hacer que los diversos mediadores y factores de coagulación generados provoquen un shock séptico, acompañado de daños irreversibles en vasos sanguíneos y órganos.

1.2.2 Estructura química general del LPS

La molécula del lipopolisacárido sigue el mismo principio estructural en la mayoría de las bacterias Gram negativas. Está constituido por una parte polisacáridica (polar) unida covalentemente a una porción lipídica (apolar), denominada lípido A. El lípido A está altamente conservado entre las diversas bacterias Gram negativas y se sitúa donde habitualmente se encuentran los fosfolípidos que forman las membranas biológicas, permitiendo el anclaje de la molécula del LPS a la membrana externa de la bacteria.

Normalmente en las bacterias Gram negativas la fracción polisacáridica consta de dos partes, una fracción más interna y conservada conocida como núcleo del LPS y una más externa y variable denominada cadena lateral O (Lüderitz *et al.*, 1982), o antígeno O por sus propiedades inmunogénicas. El núcleo del lipopolisacárido representa el punto de anclaje al cual se une el antígeno O y se divide a su vez en núcleo interno y núcleo externo. Estas tres regiones definidas se diferencian entre ellas por su estructura química, su grado de conservación, sus rutas biosintéticas y la determinación genética de éstas. La variabilidad estructural del LPS disminuye gradualmente desde la cadena lateral O, expuesta en la superficie, hasta el lípido A, cubierto por la región polisacáridica e inmerso en la membrana externa. La razón de esta gradación puede ser la presión evolutiva ejercida por las células fagocíticas y los anticuerpos sobre las bacterias Gram negativas (Nikaido, 1970). Es verosímil que los microorganismos traten de evadir esta presión mediante la variación de su estructura superficial más expuesta, es decir el antígeno O y, en menor medida, el núcleo externo (Rietschel *et al.*, 1996). Por otro lado, la elevada conservación de las características generales del lípido A y del núcleo interno puede reflejar las restricciones impuestas por su papel esencial en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa (Heinrichs *et al.*, 1998).

El antígeno O consiste en la repetición de una subunidad básica, que varía en función de las diversas especies y serotipos. Esta subunidad de repetición puede estar formada por un único monosacárido, o por diferentes monosacáridos formando subunidades lineales o ramificadas. Además de en la composición de las subunidades que forman el antígeno O, existe variabilidad en el número de repeticiones presentes en cada molécula de LPS, de forma que las moléculas existentes en un determinado cultivo bacteriano son heterogéneas en cuanto a su tamaño. Esta heterogeneidad puede observarse mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), en los que se visualizan una serie de bandas de diferentes pesos moleculares que corresponden a moléculas de LPS con distinto número de repeticiones de la subunidad básica que forma el antígeno O. El patrón visualizado es específico de cada cepa y, en algunos casos, de las condiciones de crecimiento a las que ésta se ha visto sometida.

Las moléculas de LPS que presentan lípido A, núcleo y antígeno O son conocidas como formas S del LPS, por el fenotipo liso (del inglés *smooth*) que muestran en placas de agar las colonias que sintetizan este LPS completo. Sin embargo, bacterias que han perdido la capacidad de sintetizar el antígeno O y en las que la fracción polisacáridica de su LPS tan solo consta un núcleo, completo o truncado, forman colonias con bordes rugosos cuando crecen en placas de agar, por lo que estas moléculas incompletas de LPS se denominan R (del inglés *rough*).

1.2.3 Biosíntesis del LPS

La amplia aplicación durante las dos últimas décadas de la genética molecular y de las técnicas del ADN recombinante al estudio del LPS han permitido grandes avances en el conocimiento de sus rutas biosintéticas. Sin embargo, aunque actualmente se están investigando los mecanismos de biosíntesis del LPS de un gran número de bacterias Gram negativas, hasta el momento las rutas biosintéticas mejor conocidas son las de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*.

La biosíntesis del LPS requiere de una serie de pasos individuales coordinados entre sí que incluyen: la síntesis en el citoplasma de los diversos precursores activados; la formación de las unidades polisacáridicas básicas, la polimerización de las unidades de repetición y la formación de cada uno de los dominios que componen el lipopolisacárido; la translocación a través de la membrana citoplasmática; el transporte

e integración en la membrana externa de las moléculas sintetizadas; y la regulación de todos los pasos individuales y del proceso completo.

Los estudios realizados de cada uno de estos pasos necesarios han permitido relacionar la enorme heterogeneidad química del LPS con un no menos amplio polimorfismo de muchos de los diversos genes implicados en su biosíntesis, lo cual enfatiza la gran flexibilidad de las bacterias Gram negativas para responder a las condiciones cambiantes del medio (Schnaitman y Klena, 1993). Sin embargo, a pesar de esta gran variabilidad estructural del LPS y de su polimorfismo genético, se pueden observar unos principios comunes en la biosíntesis del LPS.

La síntesis del LPS se divide en dos procesos claramente diferenciados: por un lado la formación del lípido A y del núcleo del LPS, y por otro la síntesis del antígeno O. Una vez sintetizados estos dos componentes tiene lugar la unión de los mismos, su modificación y su transporte hacia la membrana externa (McGrath y Osborn, 1991).

Algunos de los precursores requeridos para la biosíntesis del LPS no son exclusivamente utilizados para ello, sino que son intermediarios del metabolismo central de la bacteria y comparten diferentes rutas biosintéticas. Estos metabolitos corresponden, en su mayor parte, a monosacáridos activados, unidos a nucleótidos con alto poder energético, entre los cuales destacan la UDP-glucosa, la UDP-galactosa y la UDP-N-acetil-glucosamina. Estos azúcares activados, o bien se incorporarán directamente al LPS en formación o bien servirán como precursores para la síntesis de otros componentes específicos necesarios en la producción del LPS (Gabriel, 1987). Por todo esto, la regulación de todo el proceso biosintético del LPS es muy compleja y los conocimientos que se poseen sobre ella hasta ahora son bastante limitados.

1.2.4 El lípido A

1.2.4.1 Características principales

El lípido A es el responsable de las propiedades endotóxicas del LPS, por lo cual también es conocido como endotoxina (Galanos *et al.*, 1985). Es la parte más interna de la molécula y constituye el punto de anclaje hidrofóbico al cual toda molécula de LPS se halla unida. Químicamente es un fosfolípido basado en la glucosamina que forma la monocapa externa de la membrana externa de la mayoría de las bacterias Gram negativas (Raetz, 1990). Existen, aproximadamente, 10^6 residuos de lípido A y 10^7 de glicerofosfolípidos en una célula de *Escherichia coli* (Galloway y Raetz, 1990).

El lípido A, así como la parte interna del núcleo, es la región más conservada en el LPS de las bacterias Gram negativas. Pueden existir, sin embargo, pequeñas variaciones de especie a especie que afecten a sus propiedades biológicas. El elevado grado de conservación de esta molécula refleja su importante papel en el mantenimiento de la membrana externa, ya que es el principal responsable de su ensamblaje e interactúa de forma muy específica con algunas de las proteínas presentes en esta membrana (Vaara, 1993; de Cock *et al.*, 1999). Por todo esto, su presencia es indispensable para el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram negativas estudiadas hasta ahora (Galloway y Raetz, 1990). Esta indispensabilidad del lípido A en las bacterias Gram negativas, su elevada conservación, y el papel que juega como endotoxina han hecho de su biosíntesis un punto de gran interés, con el fin de conseguir nuevos agentes bactericidas y fármacos contra el shock séptico provocado por sus propiedades endotóxicas (Onishi *et al.*, 1996; Rietschel *et al.*, 1994).

1.2.4.2 Estructura química

La mayoría de las bacterias Gram negativas sintetizan un lípido A muy similar al de *E. coli*. Su estructura química básica consiste en un β 1-6 disacárido de glucosamina, acilado con residuos de R-3-hidroxiiristato en las posiciones 2, 3, 2' y 3' y fosforilado en 1 y 4' (fig. 1.2). Además los dos residuos de R-3-hidroxiacil de las posiciones 2' y 2 (o 3'), según el caso, se encuentran esterificados con otros dos grupos acil de 12 o 14 átomos de carbono (laureato y miristato) (Raetz, 1990). Asimismo se han descrito en *E. coli* y en *S. enterica* serovar typhimurium diversas modificaciones reguladas del lípido A como respuesta de la bacteria a variaciones del medio. Estas modificaciones son, básicamente, sustituciones del laureato por palmitato (15 átomos de carbono), adiciones de grupos de fosfoetanolamina, 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) y palmitato, y modificaciones y eliminaciones de algunas de las cadenas de miristato (Raetz y Whitfield, 2002).

En el caso concreto que nos atañe, *K. pneumoniae*, diversos estudios han arrojado luz sobre la estructura específica de su lípido A. En el lípido A de *K. pneumoniae* O3 se observó que los dos grupos fosfato, en las posiciones 1 y 4', se encontraban presentes parcialmente como fosfodiésteres con grupos L-Ara4N (Helander *et al.*, 1996). Sin embargo, el análisis de la estructura de una cepa de serotipo O1 mostró que carecía de esta sustitución en el fosfato 4'. Además, los residuos de hidroximiristato de las posiciones 2' y 3' se encontraban esterificados cada uno con un grupo de

hidroximiristato, y el residuo de la posición 2 se encontraba esterificado, de forma no estequiométrica, con un grupo hidroxiacil de 16 átomos de carbono (Süsskind *et al.*, 1998).

En la membrana externa bacteriana no existen moléculas de lípido A libres ya que la mínima estructura requerida para el crecimiento consiste en un lípido A glicosilado con dos residuos de ácido 3-deoxi-D-mano-octulosónico (Kdo) (Raetz, 1990), que ya forman parte del núcleo interno. Esta estructura mínima corresponde a un quimiotipo de LPS conocido como Re.

La naturaleza anfifílica y la limitada solubilidad del LPS hace muy difícil el análisis de la molécula intacta. Sin embargo, la hidrólisis ácida suave del LPS permite la separación de la porción polisacáridica y del lípido A, ya que rompe el enlace entre el residuo de Kdo I del núcleo interno y el lípido A. Una vez separadas las dos regiones, éstas pueden purificarse aprovechando las características físicas propias de cada una de ellas.

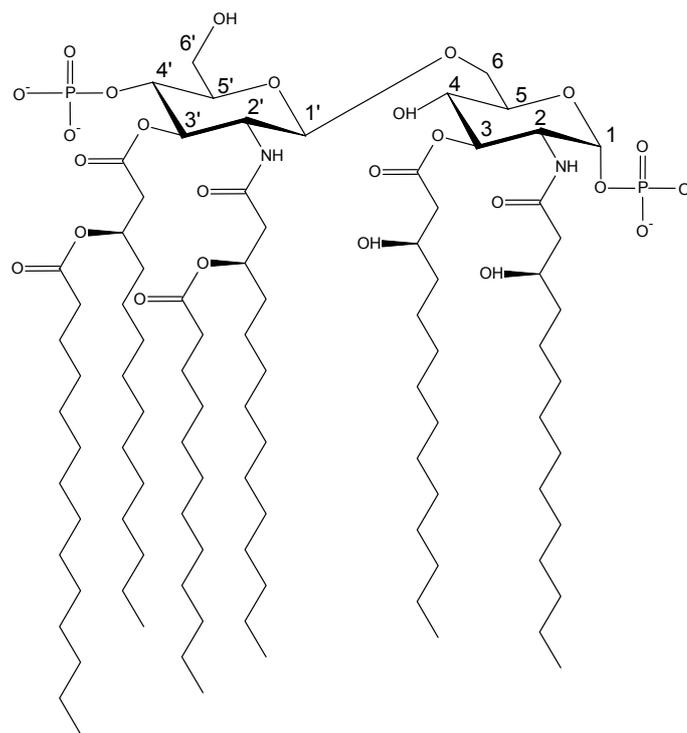


Fig. 1.2. Estructura química del lípido A de *Escherichia coli*. Raetz, 1990.

1.2.4.3 Biosíntesis

La biosíntesis del lípido A es un proceso complejo que implica la generación de una gran cantidad de productos intermedios y la colaboración de diversas enzimas,

que suelen estar localizadas en el citoplasma o en la cara interna de la membrana interna. Es *E. coli* la bacteria en la cual la ruta biosintética del lípido A está mejor caracterizada y existen fuertes evidencias que sugieren una gran conservación de esta ruta, sobre todo en las etapas iniciales, incluso en bacterias muy alejadas genéticamente.

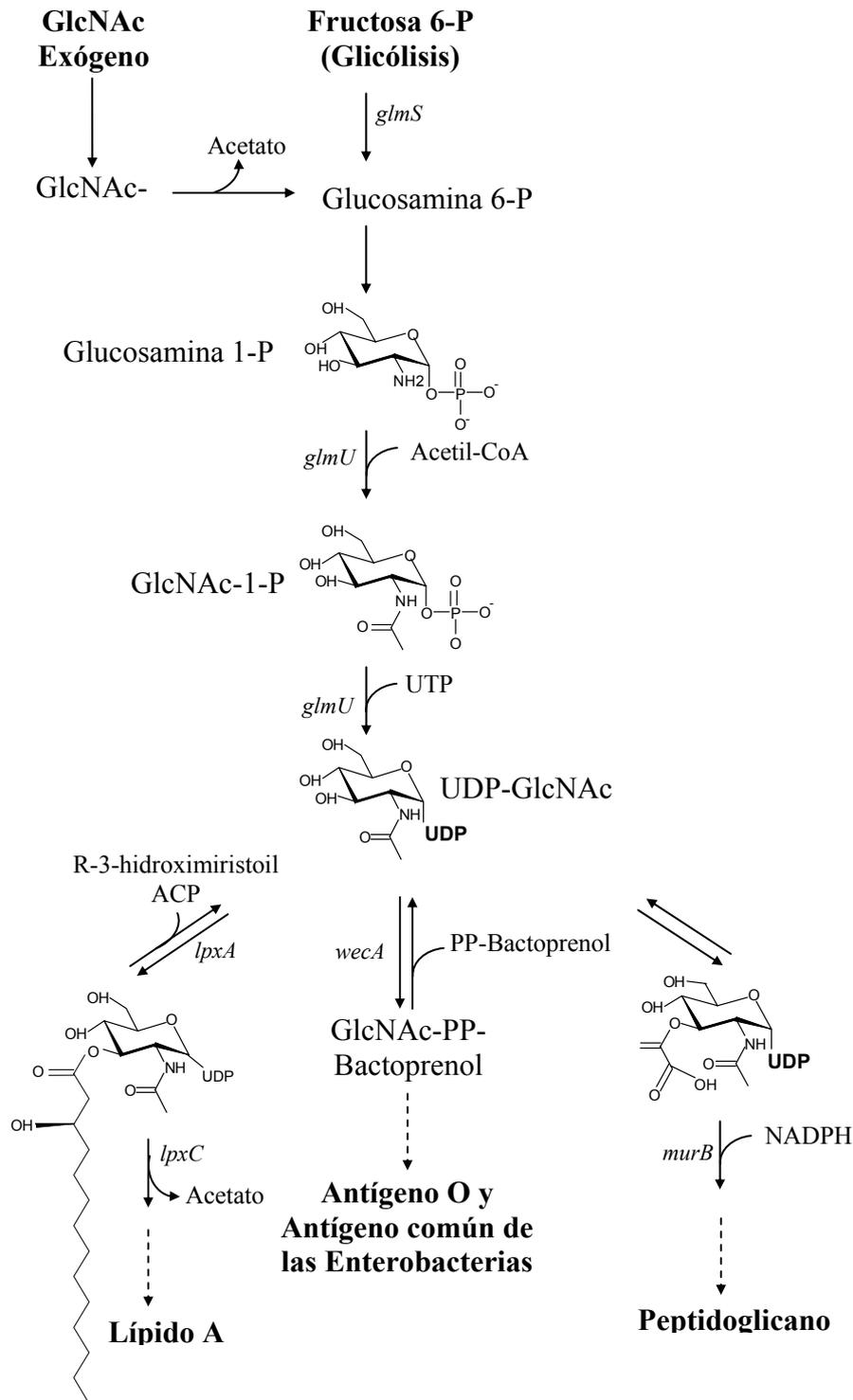


Fig. 1.3. Relación entre la ruta de biosíntesis del lípido A y la biosíntesis de otras estructuras

Los precursores necesarios para la síntesis del lípido A son: UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), R-3-hidroxi miristoil unido a una proteína transportadora de grupos acil (ACP, *acil carrier protein*), miristoil-ACP, lauroil-ACP, ATP y CMP-Kdo. Los precursores UDP-GlcNAc y R-3-hidroxi miristoil intervienen también en las vías biosintéticas de otros importantes compuestos bacterianos. Así la UDP-GlcNAc participa en la producción del peptidoglicano (Morrison y Ryan, 1992), del antígeno común de las enterobacterias (ECA) (Meier-Dieter *et al.*, 1992) y del antígeno O (fig. 1.3), mientras que el R-3-hidroxi miristoil es necesario para la síntesis de los fosfolípidos de la membrana (Raetz, 1996).

La formación del precursor UDP-GlcNAc está catalizada por una enzima bifuncional codificada por el gen *glmU*. Esta enzima, GlmU, cataliza la acetilación de la GlcN-1-P, dando lugar a la formación de GlcNAc. La misma enzima activa la GlcNAc, formando UDP-GlcNAc (Mengin-Lecreulx y Heijenoort, 1994).

La reacción inicial en la síntesis del lípido A, propiamente dicha, consiste en la transferencia del grupo acil del precursor R-3-hidroxi miristoil-ACP a la posición 3 de la UDP-GlcNAc. Esta acilación es catalizada por una UDP-N-acetilglucosamina-O-aciltransferasa codificada por el gen *lpxA* (Anderson y Raetz, 1987).

El siguiente paso es la desacetilación del compuesto formado, dando lugar a UDP-3-acil-glucosamina. El gen implicado en esta reacción se denomina *lpxC* y codifica una UDP-3-O-acil-N-acetilglucosamina desacetilasa (Young *et al.*, 1995). La constante de equilibrio de la reacción inicial de acilación catalizada por LpxA es

desfavorable, mientras que la desacetilación catalizada por LpxC es ya la primera reacción irreversible del proceso de biosíntesis del lípido A (Sorensen *et al.*, 1996).

La pérdida del grupo acetil en la posición 2 permite la transferencia de un segundo grupo R-3-hidroxi miristoil desde la proteína transportadora de grupos acil (ACP) hasta la molécula de UDP-3-acil-GlcN, dando lugar a UDP-2,3-diacil-glucosamina.

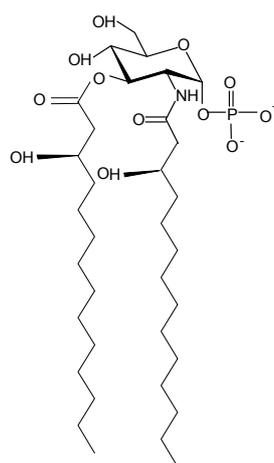


Fig. 1.4. Estructura química del lípido X La acil transferasa encargada de llevar a cabo esta función está codificada por el gen *lpxD* (Kelly *et al.*, 1993).

La UDP-2,3-diacil-GlcN es el sustrato de una reacción catalizada por una pirofosfatasa, codificada por el gen *lpxH*, que rompe su enlace pirofosfato, generando

UMP y 2,3-diacil-GlcN-1-P, o lípido X (Babinski *et al.*, 2002) (fig. 1.4). UDP-2,3-diacil-GlcN y lípido X son los dos precursores directos de la biosíntesis del lípido A, ya que la condensación de estas dos moléculas permite formar un disacárido de glucosamina, con enlace β 1-6, cuatro ácidos grasos y un grupo fosfato. La lípido A sintasa que cataliza este proceso está codificada por el gen *lpxB* (Crowell *et al.*, 1987).

Posteriormente, una quinasa específica unida a la membrana añade otro grupo fosfato en la posición 4', dando lugar a la formación de una molécula conocida como lípido IV_A, el primer intermediario de la ruta que exhibe algunas de las propiedades biológicas de la endotoxina (Raetz *et al.*, 1985). El gen que codifica para esta quinasa se denomina *lpxK* (Garrett *et al.*, 1997). Parece ser que la presencia de este grupo fosfato en la posición 4' es indispensable para la posterior transferencia a la molécula de dos residuos de Kdo, que ya forman parte del núcleo interno. Esto indica que existe una estrecha relación entre la síntesis del lípido A y del núcleo interno del LPS. El primer residuo se une a la GlcN mediante un enlace α (2-6), y el segundo, mediante un enlace α (2-4), al primer Kdo. Estos dos enlaces se forman a partir de dos moléculas de CMP-Kdo por la acción de una Kdo-transferasa bifuncional codificada por el gen *waaA* (Clementz y Raetz, 1991).

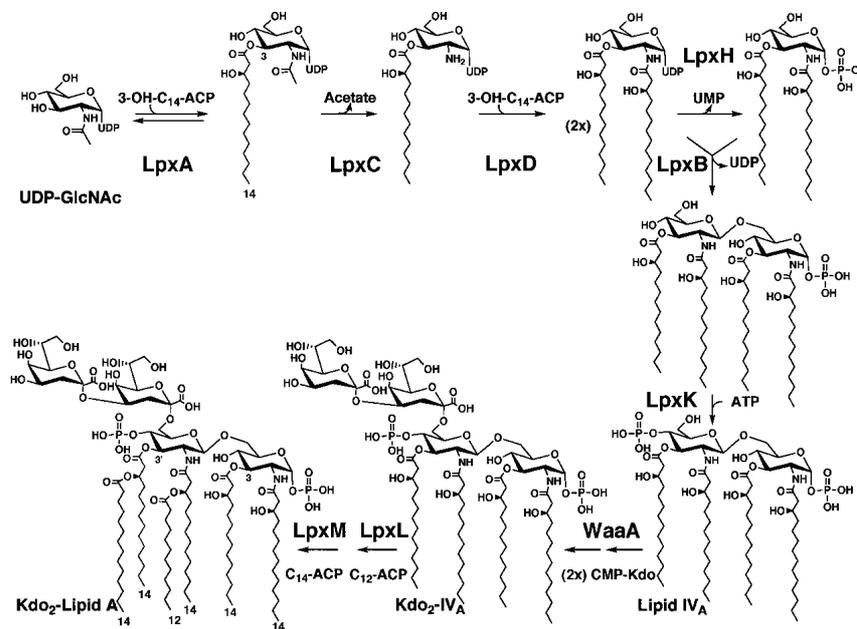


Fig. 1.5. Esquema resumen de las reacciones de biosíntesis del lípido A y de las enzimas implicadas en cada paso en *Escherichia coli* K12. Raetz y Whitfield, 2002.

La molécula madura de lípido A contiene dos residuos acil adicionales, lauroil y miristoil. Sin embargo, la adición de estos dos grupos no es posible sin la incorporación previa de los residuos de Kdo. Estas acil-transferasas finales también utilizan grupos acil unidos a la ACP, y están codificadas por los genes *lpxL* (la lauroil transferasa) y *lpxM* (la miristoil transferasa) (Raetz y Whitfield, 2002).

1.2.4.4 Organización genética

Tal y como se desprende de las secuencias de genomas bacterianos de las que se dispone actualmente, el sistema de síntesis del lípido A debe de haber evolucionado una sola vez, ya que se encuentra altamente conservado y los genes que codifican para las diversas enzimas de la ruta biosintética están presentes en una única copia (Raetz y Whitfield, 2002).

La localización y la organización de los genes implicados en la biosíntesis del lípido A es bastante complicada. Mientras que prácticamente todos los genes que determinan la síntesis del núcleo del LPS o del antígeno O se encuentran organizados en las agrupaciones génicas *waa* y *wb* respectivamente, en el caso del lípido A muchos de los genes necesarios para su producción se encuentran dispersos a lo largo del genoma bacteriano. Esta distribución se debe, seguramente, a la compleja interrelación con otras rutas biosintéticas de macromoléculas con las cuales el lípido A comparte intermediarios. Buena prueba de ello es el hecho de que los pasos iniciales de la biosíntesis del lípido A fueron descubiertos al estudiar los genes implicados en los estadios iniciales de la síntesis de glicerofosfolípidos (Takayama *et al.*, 1983). A pesar de esto, algunos de los genes que codifican para enzimas involucradas en la producción del lípido A se agrupan en un complejo operón denominado Operón de Síntesis Macromolecular II (OSMII) (Tomasiewicz, 1990). Este operón está formado por once genes, entre los cuales se localizan algunos que codifican para enzimas relacionadas con la replicación del ADN, y también para enzimas implicadas en la biosíntesis de glicerofosfolípidos y del lípido A (fig. 1.6).

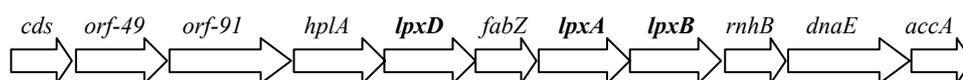


Fig 1.6. Esquema del operón OSMII en *E. coli* K-12

Los genes *lpxD* y *lpxA*, que codifican para acil transferasas, forman parte del OSMII y se hallan separados por el gen *fabZ*, el cuál codifica para una R-3-

hidroximiristoil deshidratasa relacionada con la biosíntesis del palmitato. De esta forma, se hallan agrupados y presumiblemente corregulados tres genes que codifican para enzimas que utilizan el mismo sustrato, una prueba más de la compleja interrelación de estas rutas biosintéticas (Schnaitman y Klena, 1993). Por otro lado, el gen *lpxB* que codifica para la disacárido sintasa, se ha identificado inmediatamente a continuación de *lpxA* y formando parte del mismo operón. Su organización genética sugiere que ambos genes se transcriben y traducen de forma acoplada. La secuenciación del genoma de *Haemophilus influenzae*, entre otros, puso de manifiesto el elevado grado de conservación de todos estos genes, ya que mantienen incluso el mismo orden dentro del operón y pueden sustituir funcionalmente a los genes de *E. coli*.

El resto de genes involucrados en la biosíntesis del lípido A se localizan en diferentes regiones del cromosoma. Así, por ejemplo, el gen *lpxC*, que codifica para la desacetilasa, se encuentra en el extremo 3' de una gran agrupación de genes relacionados con la división celular (*ftsQ*, *A*, *Z*) y con la secreción de proteínas (Schnaitman y Klena, 1993). Por otro lado, *lpxK* que codifica para la quinasa que permite la formación del lípido IV_A está localizada en un operón junto con el gen *msbA*, que ha sido involucrado en las etapas iniciales del transporte del lípido A y de los fosfolípidos (Garrett *et al.*, 1997).

Gen	Función del producto génico	Localización
<i>lpxA</i>	UDP-GlcNAc 3-O-aciltransferasa	OSMII
<i>lpxC</i>	UDP-3-O-acil-GlcNAc desacetilasa	Fuera de OSMII
<i>lpxD</i>	UDP-3-O-acil-GlcN 3-O-aciltransferasa	OSMII
<i>lpxB</i>	lípido A sintasa	OSMII
<i>lpxK</i>	lípido A 4' quinasa	Fuera de OSMII
<i>lpxL</i>	lauroil transferasa	Fuera de OSMII
<i>lpxM</i>	miristoil transferasa	Fuera de OSMII

Tabla 1.2. Función y localización de varios de los genes implicados en la síntesis del lípido A de *Escherichia coli*.

1.2.5 El núcleo del LPS

1.2.5.1 Características principales

El núcleo del LPS consiste en un oligosacárido heterogéneo de variabilidad restringida unido directamente al lípido A en la posición 6', que se encuentra presente en todas las bacterias Gram negativas estudiadas hasta el momento. En bacterias que producen LPS de tipo S, el núcleo se encuentra dividido en dos regiones: el núcleo

interno, próximo a lípido A y el núcleo externo. El núcleo externo, normalmente, suele ser el lugar de unión del antígeno O. Algunos patógenos de las mucosas, como *Neisseria* o *Haemophilus*, carecen de cadena lateral O y, en lugar de ello, producen una molécula denominada lipooligosacárido (LOS) que contiene un núcleo interno desde el cual se extiende una o más ramificaciones mono u oligosacáridicas, que equivaldrían al núcleo externo (Heinrichs *et al.*, 1998).

El núcleo del LPS no se considera un factor de virulencia en si mismo, aunque algunos estudios han descrito su relación con la adhesión de ciertas bacterias a células del hospedador (Jacques, 1996) y con un aumento de la actividad biológica de la endotoxina (Lüderitz *et al.*, 1989). De forma indirecta si que está implicado en la virulencia bacteriana, dado que sirve de anclaje al antígeno O, el cual es un importante factor de virulencia en muchas bacterias, y es esencial para el mantenimiento de la membrana externa.

Dentro de un género o familia bacteriana, la estructura del núcleo interno tiende a estar bien conservada, y el hecho de que los núcleos de bacterias lejanamente relacionadas compartan similitudes estructurales a nivel de esta región es un reflejo del importante papel que juega el núcleo interno en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa (Heinrichs *et al.*, 1998). Los residuos de Kdo, hallados en todos los núcleos estudiados y esenciales para la supervivencia de la bacteria, presentan cargas negativas en su grupo carboxil que pueden constituir un lugar de unión de cationes divalentes, muy importantes para el mantenimiento estructural de la membrana externa, dado que permiten interacciones cruzadas entre moléculas de LPS adyacentes.

Además, muchas bacterias estudiadas contienen heptosas en su núcleo interno que también son cruciales para el mantenimiento de la estructura de la membrana, pues a menudo están modificadas con grupos fosforilados cargados negativamente que también pueden interactuar con cationes divalentes. La falta de estos grupos, o de los residuos de heptosa a los que se unen, provoca grandes cambios estructurales en la membrana, que se traducen en una hipersensibilidad de la bacteria a antibióticos catiónicos (como la polimixina) y a detergentes, liberación de enzimas periplasmáticas al medio, etc. Este fenotipo pleiotrópico se conoce como *deep-rough* (Schnaitman y Klena, 1993). En algunas bacterias, como *Pseudomonas aeruginosa*, la falta de estos grupos fosforilados o de las heptosas impide su viabilidad (Walsh *et al.*, 2000). Por otro lado, en el caso de *K. pneumoniae* y de otras bacterias no existe fosforilación de las heptosas y las cargas negativas necesarias para el mantenimiento de la membrana

externa son provistas por la presencia de residuos de ácido galacturónico en el núcleo (fig. 1.8). Queda por determinar si la eliminación de estos residuos da lugar a un fenotipo *deep rough* (Raetz y Whitfield, 2002).

El núcleo externo muestra una mayor variabilidad estructural, puesto que es una región más expuesta a las presiones selectivas que provocan la respuesta inmune del hospedador, los bacteriófagos y el propio medio. Sin embargo, esta variabilidad dentro de una especie determinada, o incluso un género bacteriano, es todavía limitada en comparación con la hipervariabilidad que puede presentar el antígeno O, lo cual ha despertado interés en la posibilidad de utilizar el núcleo del LPS como vacuna (Stanislavsky *et al.*, 1997). Por ejemplo, en *E. coli* existen cinco tipos de núcleos 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). En el caso de *K. pneumoniae*, sólo ha sido descubierta una estructura y se halla distribuida entre los diferentes serotipos de la bacteria, aunque existe cierta variación en las sustituciones no estequiométricas (Vinogradov y Perry, 2001) y puede haber cierta diversidad adicional, si tenemos en cuenta que LPSs de algunas cepas de *Klebsiella* no mostraron reactividad con un anticuerpo monoclonal que reconocía un epítipo del núcleo externo específico del género (Trautmann *et al.*, 1997).

1.2.5.2 Estructura química

Tal y como ya hemos comentado, el núcleo del LPS es un oligosacárido sin unidades de repetición unido directamente al lípido A a través de un residuo de Kdo. El núcleo interno está formado principalmente por dos azúcares bastante inusuales: Kdo y heptosa, normalmente en su configuración L-glicero-D-manoheptosa (L,D-Hep), pero en algunos casos también en forma de D-glicero-D-manoheptosa (D,D-Hep) (Holst y Brade, 1992). Por su parte, el núcleo externo está formado por hexosas, entre las cuales se hallan, mayoritariamente, la glucosa, la galactosa y la N-acetilglucosamina. Por este motivo, núcleo interno y externo también se denominan en ocasiones región de las heptosas y de las hexosas, respectivamente.

La estructura del núcleo interno tiende a estar bastante conservada, especialmente dentro de una misma familia de bacterias (fig. 1.7). A pesar de ello, la decoración del núcleo con adiciones no estequiométricas de otros azúcares o grupos fosforilados es bastante común y contribuye a crear cierta heterogeneidad entre las moléculas de LPS presentes incluso dentro de un mismo cultivo bacteriano. Esta

heterogeneidad también puede provenir de variaciones en la cantidad de núcleos ‘completos’ y en la cantidad de moléculas de núcleo-lípido A cubiertas con antígeno O extraídas de un mismo aislado bacteriano, lo cual puede venir determinado por modificaciones en el Kdo del núcleo interno (Schnaitman y Klena, 1993).

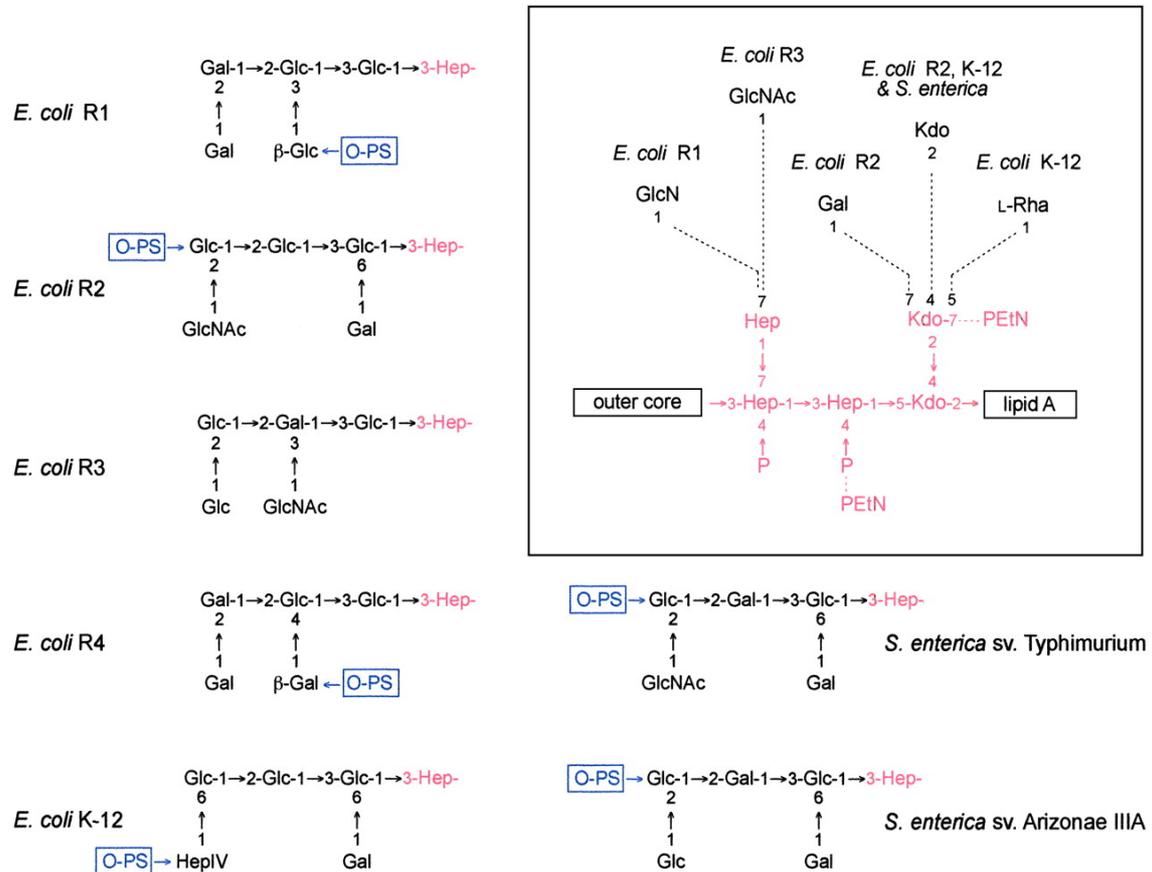


Fig 1.7. Estructuras de los núcleos conocidos de *Escherichia coli* y *Salmonella*. Los núcleos externos se muestran junto con el residuo de HepII del núcleo interno (en rojo). En los casos en los que se conoce se muestra el lugar de unión del antígeno O (O-PS). El recuadro muestra la estructura básica conservada del núcleo interno, y las modificaciones no estequiométricas específicas de los diversos tipos de núcleo están señaladas por líneas de puntos. Excepto en los casos señalados, todos los enlaces se producen en configuración α -anomérica. Raetz y Whitfield, 2002.

Además, alteraciones en el núcleo externo pueden variar la eficiencia de ligación del antígeno O al núcleo, de forma que existan diferencias significativas en las estructuras del núcleo del LPS según si éste lleva unida o no la cadena lateral O, tal y como se ha descrito en el caso de *K. pneumoniae*. Es posible que muchas de estas modificaciones del núcleo estén profundamente afectadas por las condiciones de crecimiento y diversos factores ambientales (Raetz y Whitfield, 2002).

En el caso específico de *K. pneumoniae* ha sido elucidada una estructura básica del núcleo (fig. 1.8), que se considera conservada en los diferentes serotipos de la bacteria (Vinogradov y Perry, 2001). Sin embargo, el núcleo de las moléculas de LPS

tipo R contiene dos heptosas en su región terminal y carece del residuo de Kdo en el núcleo externo que sirve como lugar de unión del antígeno O (Vinogradov *et al.*, 2002).

Klebsiella pneumoniae O1

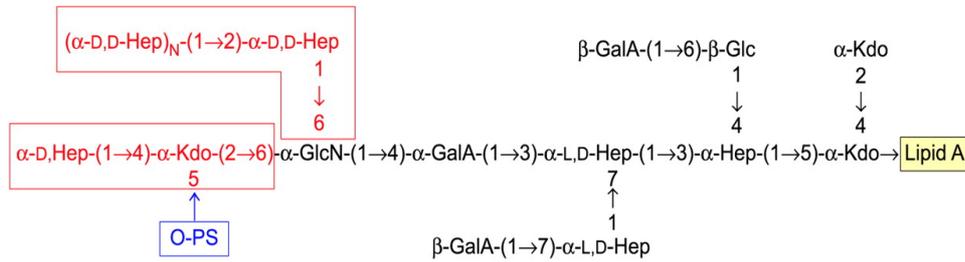


Fig. 1.8. Estructura química del oligosacárido que constituye el núcleo de *K. pneumoniae* O1. Los residuos de ácido β -galacturónico son no estequiométricos. Las regiones en rojo del núcleo externo son aquellas que pueden variar entre formas S y R del LPS. Raetz y Whitfield, 2002.

La presencia de diferentes especies de núcleo dentro de un mismo cultivo, algunas de ellas minoritarias en los crecimientos obtenidos en el laboratorio, y la posible existencia de estructuras lábiles a los tratamientos comúnmente utilizados para el análisis químico de las cadenas de carbohidratos, representan importantes escollos para la determinación completa de la estructura exacta del núcleo del LPS, de forma que, en el caso de muchas bacterias, tan solo se conoce la cadena oligosacáridica predominante para un determinado núcleo.

1.2.5.3 Biosíntesis

Como ya hemos comentado antes, el inicio de la síntesis del núcleo se intercala con el final de la biosíntesis del lípido A, puesto que en los pasos finales de esta última se requiere la unión de dos residuos de Kdo. Para la formación del Kdo activado (CMP-Kdo) es necesaria la participación de dos enzimas (fig. 1.9): la Kdo-8-fosfato sintasa, codificada por el gen *kdsA*, que cataliza la condensación de D-Arabinosa y fosfoenolpiruvato para dar lugar a Kdo-8-P; y la CMP-Kdo sintasa, codificada por el gen *kdsB*, que, tras la actuación de una fosfatasa específica para el Kdo, forma CMP-Kdo (Strohmaier *et al.*, 1995).

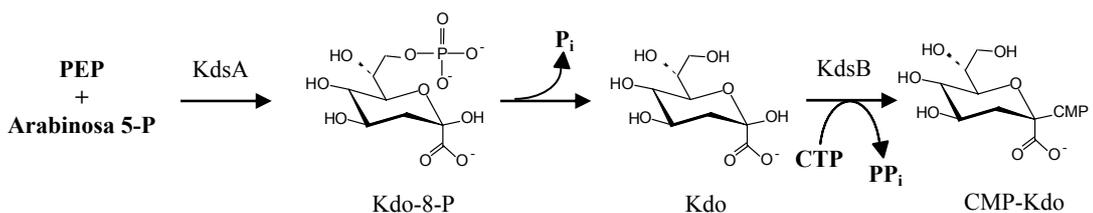


Fig 1.9. Biosíntesis del CMP-Kdo

La proteína responsable de la transferencia de los residuos de Kdo al lípido A es la Kdo transferasa, codificada por el gen *waaA*, que tiene una actividad bifuncional en *E. coli* (Belunis y Raetz, 1992). En otras bacterias se han descrito núcleos con tres residuos de Kdo o con uno sólo y se ha sugerido que, en estos casos, la Kdo transferasa puede tener una actividad tri o monofuncional, respectivamente.

El lípido A-Kdo₂ completo servirá de aceptor para la síntesis del núcleo del LPS. Las reacciones posteriores llevan, en muchos de los oligosacáridos estudiados hasta ahora, a la adición de residuos de heptosa, para lo cuál es necesaria su síntesis previa.

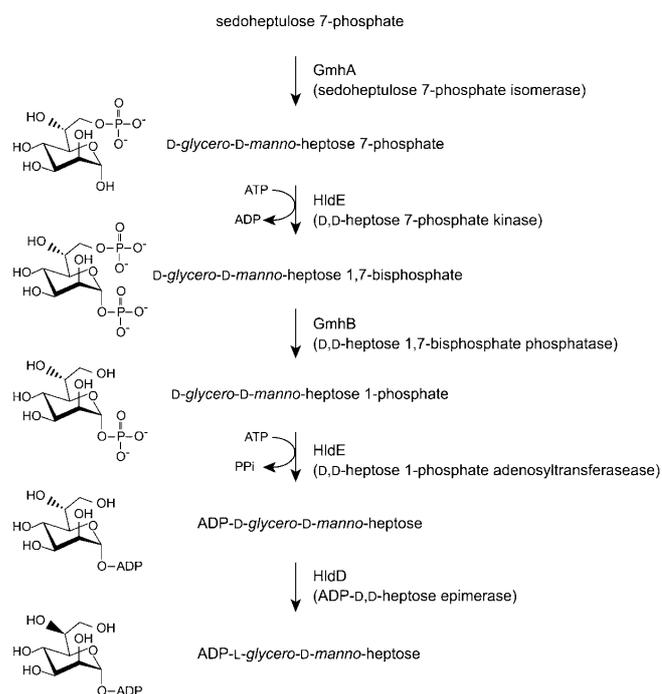


Fig. 1.10. Biosíntesis de la ADP-L-glicero-D-mano-heptosa en *E. coli*. Raetz y Whitfield, 2002

lugar a D,D-Hep 1-fosfato por la fosfatasa GmhB. Seguidamente, de nuevo la enzima HldE actúa generando ADP-D,D-Hep mediante su segunda función. Por último, la epimerasa HldD dará lugar a ADP-L,D-Hep.

La esencialidad del Kdo para la viabilidad de la bacteria y la importancia de las heptosas para el mantenimiento de la integridad de la membrana externa en una gran cantidad de bacterias, convierte las rutas de biosíntesis de estos dos azúcares en potenciales objetivos para el diseño de nuevos inhibidores con fines terapéuticos (Goldman *et al.*, 1987).

El núcleo del LPS se ensambla mediante transferencia secuencial de los distintos residuos a partir de precursores activados con nucleótidos. El proceso se lleva a cabo

La ruta biosintética de la L,D-Hep, configuración en la que más comúnmente se halla la heptosa en el núcleo, ha sido recientemente revisada (Kneidinger *et al.*, 2002) y se inicia mediante la acción de una isomerasa codificada por el gen *gmhA* (fig. 1.10). Esta isomerasa cataliza la conversión de la sedoheptulosa 7-fosfato a D,D-heptosa-7-fosfato. Posteriormente, una enzima bifuncional denominada HldE fosforila la heptosa produciendo D,D-Hep 1,7-bisfosfato, que a su vez será defosforilada para dar

por la actuación de una serie de glicosiltransferasas de forma coordinada en la cara citoplasmática de la membrana interna, lugar donde se encuentran disponibles tanto el aceptor como los precursores activados. Aunque se han identificado los genes implicados en el sistema de biosíntesis del núcleo en una gran cantidad de bacterias, debido a la diversidad de estructuras de núcleo existentes la función exacta de las transferasas para las cuales codifican no ha podido todavía ser asignada en muchos de los casos. El hecho de que el núcleo interno esté mucho más conservado ha facilitado el reconocimiento de las enzimas implicadas en la transferencia de los azúcares que componen esta región. Así pues, en la mayoría de los casos actualmente estudiados, las heptosiltransferasas codificadas por los genes *waaC* y *waaF* son las encargadas de transferir la L,D-HepI y la L,D-HepII a la cadena principal del núcleo del LPS.

En cualquier caso, el sistema mejor caracterizado hasta ahora es el responsable de la biosíntesis del núcleo del LPS de *E. coli* R1 (fig. 1.11) (Heinrichs *et al.*, 1998a; Yethon *et al.*, 1998). En el caso de *K. pneumoniae* o en el de *Serratia marcescens*, a pesar de que han sido clonados y secuenciados los genes relacionados con la biosíntesis de sus respectivos núcleos y existen bastantes datos sobre las estructuras químicas de estos, no ha podido ser asignada una función exacta para todas las glicosiltransferasas halladas. Aún así, se sabe que en *K. pneumoniae* la transferasa codificada por el gen *waaE* está implicada en la adición de una β -Glucosa a la HepI del núcleo interno, y que el gen *waaQ* codifica para una enzima que cataliza la unión de la HepIII ramificada a la HepII (fig. 1.8). Además, a través de comparaciones de secuencias han podido asignarse funciones putativas a algunas de estas transferasas (Regué *et al.*, 2001).

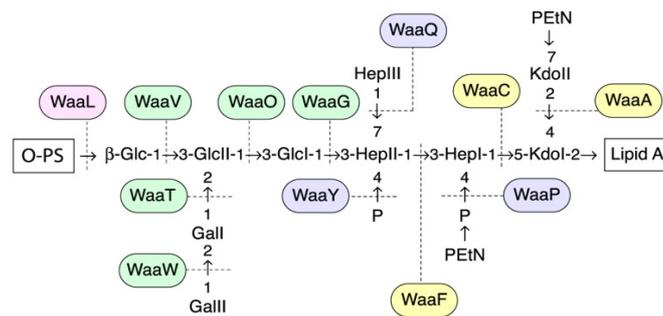


Fig 1.11. Transferasas implicadas en la biosíntesis del núcleo de *E. coli* R1. Las enzimas que forman el núcleo interno están marcadas en amarillo, mientras que las que modifican la estructura están en azul. Las verdes son las glicosiltransferasas del núcleo externo y la ligasa está marcada en rosa. Raetz y Whitfield, 2002.

La unión covalente del antígeno O al núcleo del LPS representa la parte final del proceso de biosíntesis y se produce en la cara periplasmática de la membrana interna.

La proteína MsbA es un transportador tipo ABC esencial para la supervivencia de la bacteria que parece estar involucrada en el transporte del núcleo-lípido A al periplasma y/o en el exporte del LPS completo a la membrana externa, aunque queda por determinar mecanismo por el cual se produce este transporte y si hay más proteínas que intervienen en él (Raetz y Whitfield, 2002). Por otro lado, tampoco ha sido completamente caracterizado el mecanismo exacto de ligación del antígeno O al núcleo, aunque parece ser que el producto del gen *waaL* es la única enzima requerida para el proceso. Esta enzima es una proteína integral, con ocho o más dominios transmembrana, que varía bastante entre las diversas especies bacterianas en las que se ha secuenciado. A pesar de estas variaciones en su secuencia primaria, las proteínas WaaL mantienen unas características físico-químicas muy similares. Dado que se ha comprobado que no discriminan entre la mayoría de los antígenos O que pueden unir al aceptor (pueden unir antígenos O pertenecientes incluso a otras especies bacterianas), se piensa que la gran variación en sus secuencias puede reflejar la especificidad de cada una por la estructura determinada del núcleo al cual unirán este antígeno O (Whitfield *et al.*, 1997).

1.2.5.4 Organización genética

En muchos casos, la mayoría de los genes necesarios para la biosíntesis del núcleo se agrupan formando operones en una agrupación génica localizada a nivel cromosómico denominada *waa*. Fuera de dicha agrupación se localizan los genes *kdsA* y *kdsB*, implicados en la síntesis del Kdo, y la mayoría de los genes relacionados con la síntesis de la L,D-Hep. Los genes implicados en estas dos rutas biosintéticas presentan un elevado nivel de conservación entre bacterias poco relacionadas.

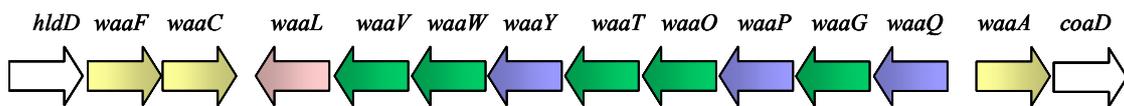
En *E. coli* R1 el locus *waa* consiste en tres operones definidos por el primer gen de cada unidad transcripcional: *hldD*-, *waaQ*- y *waaA*- (fig. 1.12). *hldD* y *waaF* y *waaC*, los genes pertenecientes al primer operón, codifican enzimas necesarias para el paso final de la biosíntesis de la L,D-Hep y para la transferencia de este azúcar al núcleo interno. La transcripción de este operón en *E. coli* K12 está regulada por un promotor sensible a la temperatura (*heat shock promoter*), lo cual quizá indicaría la importancia de la región de las heptosas para el crecimiento de la bacteria a elevadas temperaturas (Schnaitman y Klena, 1993).

El operón central, *waaQ*, contiene los genes implicados en la biosíntesis del núcleo externo y en la modificación del núcleo interno con otros azúcares o grupos

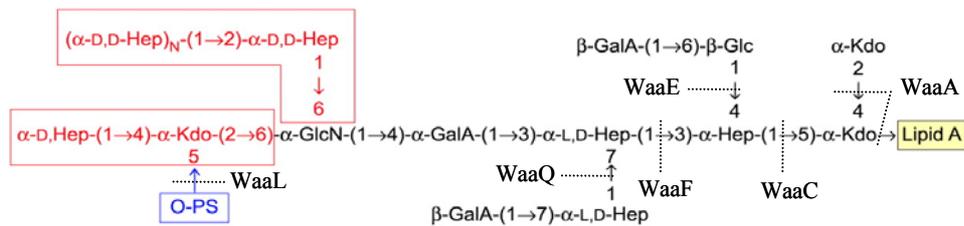
fosforilados, además del gen *waaL* cuyo producto se requiere para la unión del antígeno O al núcleo. Este operón viene precedido por una región de unos 39 pares de bases denominada JUMPStart (*Just Upstream of Many Polysaccharide-associated gene Starts*) que contiene la secuencia conservada de 8 pb conocida como *ops* (*operon polarity supressor*). En esta zona, la proteína reguladora RfaH puede interactuar con la proteína Rho y la ARN polimerasa para formar un complejo de transcripción que puede extenderse más allá de determinados elementos de terminación. Así pues, RfaH y el elemento *ops* funcionarían como un sistema de antiterminación en la biosíntesis del núcleo eludiendo las múltiples secuencias de terminación existentes a lo largo del operón (Nieto *et al.*, 1996, Bailey *et al.*, 1997).

El operón *waaA* contiene el gen *waaA*, que codifica para la Kdo transferasa bifuncional que coloca los dos residuos de Kdo del núcleo interno, y el gen *coaD*, que no está relacionado con la construcción del núcleo del LPS sino que está implicado en la biosíntesis de la coenzima A (Geerlof *et al.*, 1999).

Agrupación génica *waa* de *E. coli* R1



Klebsiella pneumoniae O1



Agrupación génica *waa* de *K. pneumoniae*

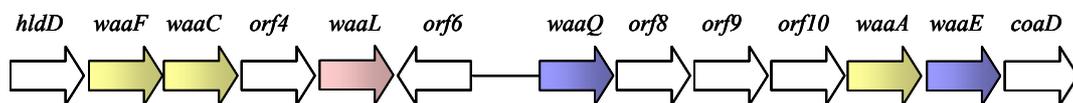


Fig. 1.12. Biosíntesis del núcleo de *K. pneumoniae*, con algunas posibles funciones asignadas a algunas de las glicosiltransferasas, y estructura de las agrupaciones génicas *waa* de *E. coli* R1 y *K. pneumoniae*. Los genes en amarillo codifican para transferasas que forman el núcleo interno, mientras que los genes de enzimas que modifican la estructura están en azul. Los verdes codifican para glicosiltransferasas del núcleo externo y el gen de la ligasa está marcado en rosa. En blanco se indican aquellos genes no relacionados directamente con la transferencia de azúcares al núcleo (*hldD*) o no involucrados en la biosíntesis del LPS (*coaD*), así como aquellas pautas de lectura que codifican para enzimas con función no asignada.

En el caso de *K. pneumoniae* el locus *waa* también parece constar de tres operones (fig. 1.12). El operón *hldD* contiene cinco genes, entre los que encontramos *hldD*, *waaF*, *waaC*, y *waaL*, implicados en la síntesis de la heptosa, y posiblemente en la transferencia de la HepI y la HepII al núcleo interno, y la ligación del antígeno O al LPS, respectivamente. Además, en este operón se encuentra una pauta abierta de lectura (*orf4*) sin una función clara asignada. La *orf6* aparentemente corresponde a un gen monocistrónico transcrito en dirección contraria al primer operón. Por último, el operón *waaQ* consta de siete genes o pautas abiertas de lectura: *waaQ*, que probablemente cataliza la unión de la HepIII ramificada a la HepII; *orf8*, *orf9* y *orf10*, con función desconocida, aunque se cree que la enzima codificada en *orf8* pueda estar involucrada en la unión del ácido galacturónico de la cadena principal a la HepII y se ha determinado que el producto de *orf10* tiene alguna implicación en la producción del polisacárido capsular mediante algún mecanismo desconocido; *waaA*, que codifica para la transferasa bifuncional que une los dos residuos de Kdo al lípido A; *waaE*, cuyo producto presuntamente transfiere una β -glucosa ramificada a la HepI del núcleo interno; y *coaD*, implicado en la biosíntesis de la coenzima A.

Las diferencias entre las diversas agrupaciones génicas *waa* secuenciadas hasta ahora, determinan importantes variaciones estructurales en el núcleo externo y en las modificaciones del núcleo interno, mientras que las regiones, o genes, altamente conservados dentro de estas agrupaciones se relacionan con las funciones críticas e inalterables del núcleo interno (Heinrichs *et al.*, 1998).

1.2.6 El antígeno O

1.2.6.1 Características principales

El antígeno O ó cadena lateral O es un polisacárido repetitivo expuesto en la superficie bacteriana unido normalmente a un residuo terminal del núcleo externo. Este polisacárido consiste en una serie de repeticiones, generalmente entre 10 y 30, de una unidad oligosacáridica básica. De hecho, dentro de un mismo cultivo bacteriano podemos encontrar moléculas de LPS que difieren en el número de repeticiones de esta unidad básica, lo cual produce el característico patrón de migración en ‘escalera’ al separar las moléculas de LPS por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Cada ‘escalón’ o nivel representa un complejo núcleo-lípido A con una subunidad O adicional completa y el espacio entre cada uno de estos ‘escalones’ viene

determinado por la medida de esta subunidad O, manteniendo cada cepa bacteriana un patrón de distribución específico (Whitfield *et al.*, 1997).

El antígeno O es la parte más externa del LPS y a su vez la más inmunogénica y variable. Esta variabilidad puede ser detectada por métodos inmunológicos, lo cual ha permitido agrupar las cepas de una especie bacteriana en diferentes serotipos.

El antígeno O del LPS está considerado como un importante factor de virulencia bacteriano, puesto que dota a la bacteria de una capa superficial hidrófila que puede enmascarar importantes epítomos antigénicos conservados presentes en la membrana externa bacteriana. Sin embargo, la principal característica del antígeno O es su capacidad de conferir resistencia al efecto bactericida del suero en aquellas bacterias que lo presentan, en función de la cantidad de moléculas de LPS cubiertas con cadena lateral O, así como de la composición y la longitud de las cadenas polisacáridicas. Aunque el mecanismo preciso por el cual la bacteria evita esta actividad bactericida no ha sido completamente elucidado y otros componentes superficiales como los polisacáridos capsulares están también implicados, estudios realizados en *K. pneumoniae* indican que el componente C3b del complemento tiende a depositarse sobre las cadenas polisacáridicas más largas, con lo que no se forma el complejo lítico de ataque a la membrana (C5b-9) y no se daña a la bacteria (Merino *et al.*, 1992). Por otro lado, la cantidad de C3b depositado sobre la bacteria también es importante y, mientras que las cepas sensibles al suero activan la vía clásica y la alternativa del complemento, el S-LPS de las cepas resistentes activa sólo la vía alternativa, reduciéndose así la cantidad de C3b depositado (Albertí *et al.*, 1996).

Además, las especiales características físico-químicas que confiere el antígeno O a la superficie bacteriana juegan un papel importante en las interacciones entre la bacteria y las células de los tejidos del hospedador, de forma que la presencia de antígeno O es también un factor fundamental en el proceso de adhesión (Williams y Tomás, 1990).

1.2.6.2 Estructura química

La diversidad estructural de los antígenos O es extraordinaria y han sido hallados más de 60 monosacáridos diferentes y 30 componentes no glicosídicos formando parte de antígenos O de diversas bacterias. Las subunidades repetitivas que forman los antígenos O pueden diferir en los monómeros que las forman, en la posición y la estereoquímica de los enlaces O-glicosídicos, y en la presencia o la ausencia de

substituyentes no glicosídicos. Además, estas subunidades pueden estar formadas por un sólo tipo de azúcar (formando homopolisacáridos) o por varios (formando heteropolisacáridos), y pueden ser lineales o ramificadas. Asimismo, las sustituciones no estequiométricas y otras modificaciones juegan un importante papel en la antigenicidad de la cadena lateral O, de forma que adiciones de grupos acetyl o de residuos de glucosa y modificaciones de los enlaces entre residuos pueden variar el serotipo de la bacteria. En muchos casos, estas modificaciones están ligadas a la presencia de bacteriófagos lisogénicos o crípticos que codifican para enzimas que alteran la biosíntesis del antígeno O (Schnaitman y Klena, 1993).

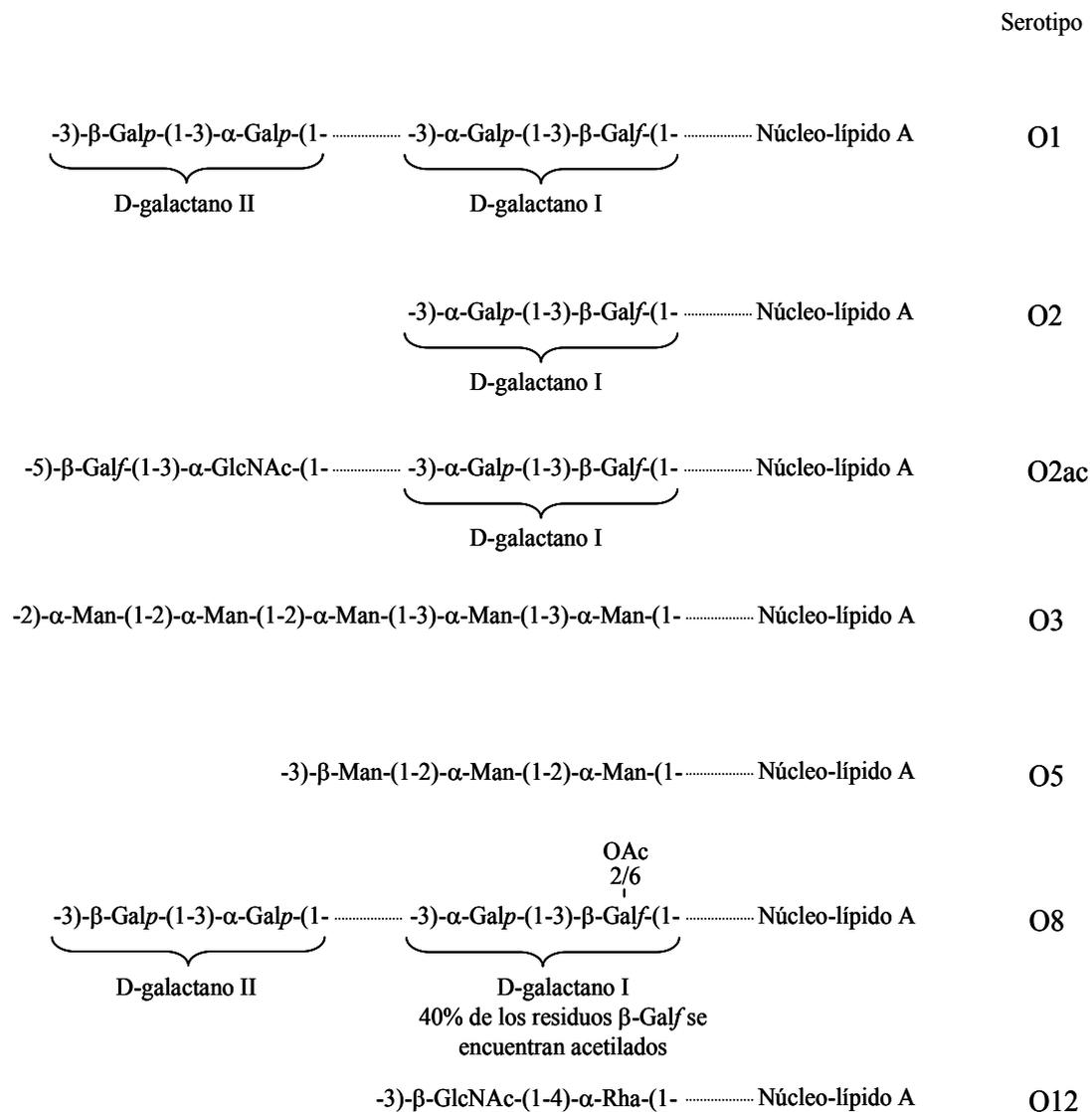


Fig. 1.13. Estructura química del antígeno O de varios serotipos de *Klebsiella pneumoniae*. En cada caso están representadas las unidades repetitivas básicas. En los casos de O1, O2ac y O8, el antígeno O está formado por dos dominios con una subunidad repetitiva diferente cada uno (Vinogradov *et al.*, 2002).

La estructura del antígeno O define el serotipo de la bacteria, pero el número de antígenos O diferentes puede variar considerablemente de una especie a otra. En el caso

de *K. pneumoniae* se han descrito once estructuras diferentes en su antígeno O, aunque algunas similitudes estructurales producen reactividad cruzada, de forma que el número de serotipos diferentes es de nueve: O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 y O12 (Hansen *et al.*, 1999). Varios de los antígenos O de *K. pneumoniae* se basan en una estructura repetitiva denominada D-galactano I (fig. 1.13), que da lugar al antígeno O2 cuando no contiene ningún tipo de modificación. En algunos casos, sin embargo, el D-galactano I puede estar unido a otros dominios estructurales o puede ser modificado con ramificaciones de grupos acetil o residuos de galactosa, generando nuevos antígenos únicos. Este sería el caso del antígeno O1, en el que las cadenas de D-galactano I están unidas a un dominio con una unidad repetitiva diferente denominado D-galactano II; o el caso del antígeno O8, con una estructura prácticamente similar a la del O1, pero con algunos residuos de β -galactofuranosa del D-galactano I acetilados. Los antígenos O3 y O5, por otro lado, son homopolímeros lineales de manosa y se diferencian en algunos de los enlaces entre los monosacáridos. El antígeno O12 es un heteropolímero de N-acetil glucosamina y manosa.

1.2.6.3 Biosíntesis

Algunos de los precursores necesarios para la síntesis de la cadena polisacáridica del antígeno O se obtienen del metabolismo central de la bacteria. Este es el caso de la UDP-glucosa, de la UDP-galactosa o de la UDP-N-acetilglucosamina, que, o bien se incorporan directamente al polímero en formación, o bien servirán de intermediarios para la síntesis de otros monosacáridos activados, entre los que se encuentran la GDP-manosa, la TDP-ramnosa y otros azúcares presentes exclusivamente en los diversos antígenos O. Estos precursores activados derivan generalmente de la glucosa-1-P y de un nucleótido trifosfato, y los genes necesarios para su síntesis se encuentran normalmente en la agrupación génica *wb*, que contiene los genes necesarios para la biosíntesis del antígeno O y de la cual hablaremos en el siguiente apartado.

A pesar de la gran diversidad que caracteriza a las cadenas laterales O, los mecanismos implicados en su síntesis conservan una serie de rasgos bastante conservados. En el ensamblaje de los antígenos O, los precursores activados no son transferidos directamente sobre una molécula de LPS, sino que, en lugar de ello, el antígeno O es sintetizado separadamente sobre un transportador lipídico denominado undecaprenil fosfato (und-P). La biosíntesis se produce, gracias a una serie de glicosiltransferasas, en la cara interna de la membrana plasmática de la bacteria, pero el

antígeno O es posteriormente transferido y unido covalentemente al lípido A-núcleo en la cara periplasmática de la membrana plasmática, de forma que el mecanismo de biosíntesis debe incluir un sistema de exporte que transporte al antígeno O sintetizado hacia el periplasma (McGrath y Osborn, 1991). Las tres rutas conocidas hasta ahora para la biosíntesis del antígeno O se distinguen por sus respectivos mecanismos de exporte y se denominan: Wzy-dependiente, transportador ABC-dependiente y, con una distribución mucho más limitada, sintasa-dependiente. A pesar de sus diferencias en el sistema de exporte, las tres vías poseen similares reacciones de iniciación y se completan con el mismo proceso de ligación del antígeno O al lípido A-núcleo del LPS (Whitfield *et al.*, 1997).

En el sistema Wzy-dependiente (fig. 1.14), exclusivo de heteropolisacáridos a menudo ramificados, la síntesis comienza con la unión de un primer residuo glucídico al und-P gracias a una galactosil-transferasa, WbaP, o a una N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, WecA. Una vez producida esta iniciación, el proceso continúa con la adición secuencial de los diferentes monosacáridos que constituirán una subunidad O. Estas reacciones se producirán en el citoplasma y serán catalizadas por diferentes transferasas, específicas para cada azúcar y tipo de enlace glicosídico, que actúan en la cara citoplasmática de la membrana interna. Cada subunidad ensamblada será exportada hacia el lugar de polimerización, en la cara periplasmática, por una proteína transmembrana con función flipasa denominada Wzx. El mecanismo exacto de transporte de las subunidades a través de la bicapa lipídica es por ahora desconocido. Una vez en el periplasma, las subunidades unidas al und-P polimerizarán mediante la transferencia del polímero en formación desde su und-P hasta el extremo no reducido de la nueva subunidad O. El efecto final es que el crecimiento se produce por el extremo reducido del polímero en formación. Esta polimerización está catalizada por la O-polisacárido polimerasa, Wzy (Collins y Hackett, 1991), que es, como Wzx, una proteína hidrofóbica con múltiples dominios transmembrana. Mutantes en esta proteína producen un tipo de LPS conocido como S-R (*semi-rough*), con una única subunidad O unida al núcleo. El und-PP liberado en cada reacción de polimerización debe ser reciclado, y dada su utilización intensiva en este caso, este mecanismo de biosíntesis es inhibido por la bacitracina, que impide la reacción de defosforilación que recicla el und-PP.

El componente final característico de la vía Wzy-dependiente es la proteína Wzz, que genera la distribución modal de la longitud de las cadenas polisacáridicas

específica de cada cepa, la cuál queda reflejada en el patrón de bandas característico en electroforesis en geles de poliacrilamida (Whitfield *et al.*, 1997). El mecanismo por el cual se produce esta regulación es desconocido, aunque han sido propuestos dos modelos: el primero considera que Wzz interactúa con la Wzy y modularía su actividad al alternar entre dos estados funcionales, uno que favorecería la elongación de la cadena polisacáridica y el otro que favorecería su transferencia a la ligasa (WaaL); el segundo sugiere que Wzz podría actuar como una chaperona que permite la formación de un complejo entre Wzy, WaaL y el polisacárido unido al und-P, determinándose la modalidad por la proporción de Wzy y WaaL asociadas.

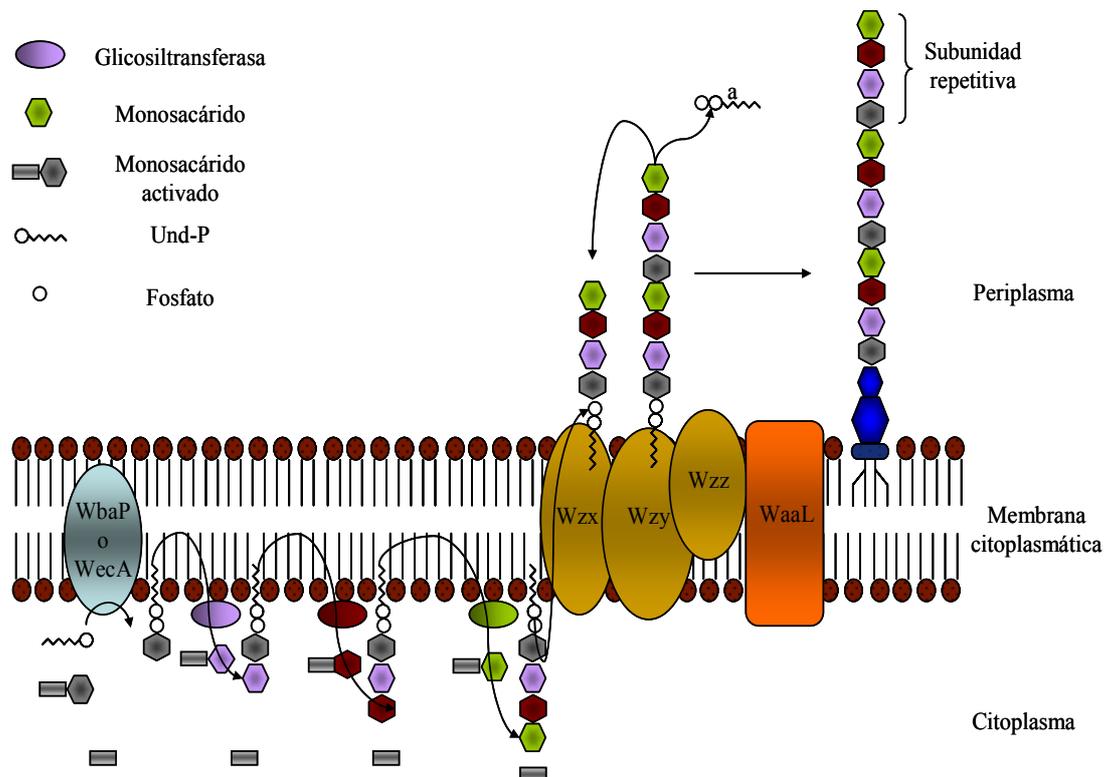


Fig. 1.14. Esquema del sistema de biosíntesis del antígeno O Wzy-dependiente. Las subunidades son exportadas al periplasma por separado, gracias a la proteína Wzx. Una vez allí, la proteína Wzy media la polimerización de éstas, uniendo el polímero en formación a la subunidad recién exportada. Así, el crecimiento del antígeno O se produce en su extremo reducido. Cada subunidad polimerizada supone la liberación de una molécula de und-PP (a), que debe ser reciclada a la forma und-P para su reutilización en la síntesis de nuevas subunidades.

El sistema transportador ABC-dependiente (fig. 1.15) es característico de la biosíntesis de antígenos O homopolímeros (Whitfield, 1995). La extensión del polisacárido tiene lugar por la adición progresiva de azúcares en el extremo no reducido de la cadena. No requiere de una polimerasa específica y el polímero se completa en la cara interna de la membrana citoplasmática. El transporte de la cadena a la cara externa para la posterior ligación al LPS se produce a través de un transportador tipo ABC (*ATP-binding cassette*), por lo que tampoco actúa la proteína Wzx. Un homólogo de

WecA inicia la biosíntesis del antígeno O colocando un residuo de GlcNAc en el Und-P, que actuara como ‘primer’ para la extensión de la cadena. En el paso siguiente, una glicosiltransferasa específica añade un adaptador a la GlcNAc, antes de que se inicie la sucesiva transferencia de residuos que formará la cadena. Tanto el residuo adaptador como el iniciador pueden ser detectados normalmente en la región que une el antígeno O al núcleo externo en la molécula final de LPS (Vinogradov *et al.*, 2002). Todo el mecanismo requiere de la participación de una única molécula de und-P por polímero, de forma que, al contrario que en el caso del sistema Wzy-dependiente, el proceso es resistente a la bacitracina.

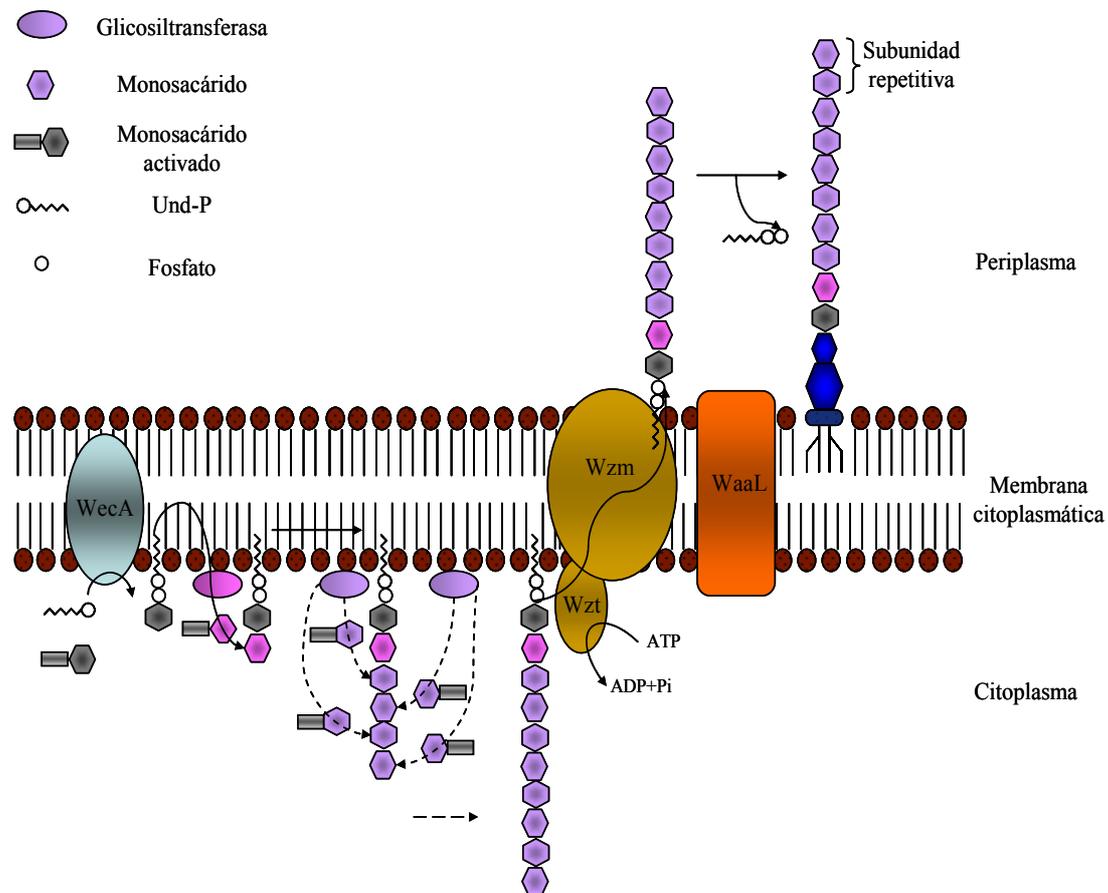


Fig 1.15. Esquema del sistema de biosíntesis del antígeno O ABC transportador-dependiente. El polímero completo, sintetizado en el citoplasma mediante transferencia sucesiva de azúcares por una serie de transferasas, es exportado al periplasma gracias al mecanismo ABC-transportador. El crecimiento del antígeno O se produce en su extremo no reducido. Sólo se utiliza una molécula de und-P por cadena sintetizada. Para hacer más comprensible el esquema no se muestran los nucleótidos liberados tras la transferencia de los monosacáridos activados.

El transportador ABC encargado del exporte de la cadena completa al periplasma consta de dos componentes: una proteína integral de membrana, Wzm, y una proteína hidrófila con un dominio de unión al ATP, Wzt. Se ha sugerido que la hidrólisis del ATP produce un cambio conformacional en Wzt que permite su inserción

en la membrana mediante una interacción con Wzm, introduciendo el polímero en el canal. Este modelo, sin embargo, no está demostrado (Raetz y Whitfield, 2002). En este tipo de mecanismo de síntesis la regulación de la longitud de las cadenas polisacarídicas no requiere de una proteína específica, tipo Wzz, y, según parece, se establece una competición entre la exportación y la extensión de la cadena, de forma que el transportador ABC podría jugar un papel importante en la determinación de la distribución de los tamaños de las cadenas. Además se han hallado residuos específicos terminales en algunos antígenos O que se sintetizan por este mecanismo (Vinogradov *et al.*, 2002), lo cual puede indicar la presencia de algún sistema desconocido que altere el proceso de elongación produciéndose la terminación de la cadena e iniciándose el transporte de ésta.

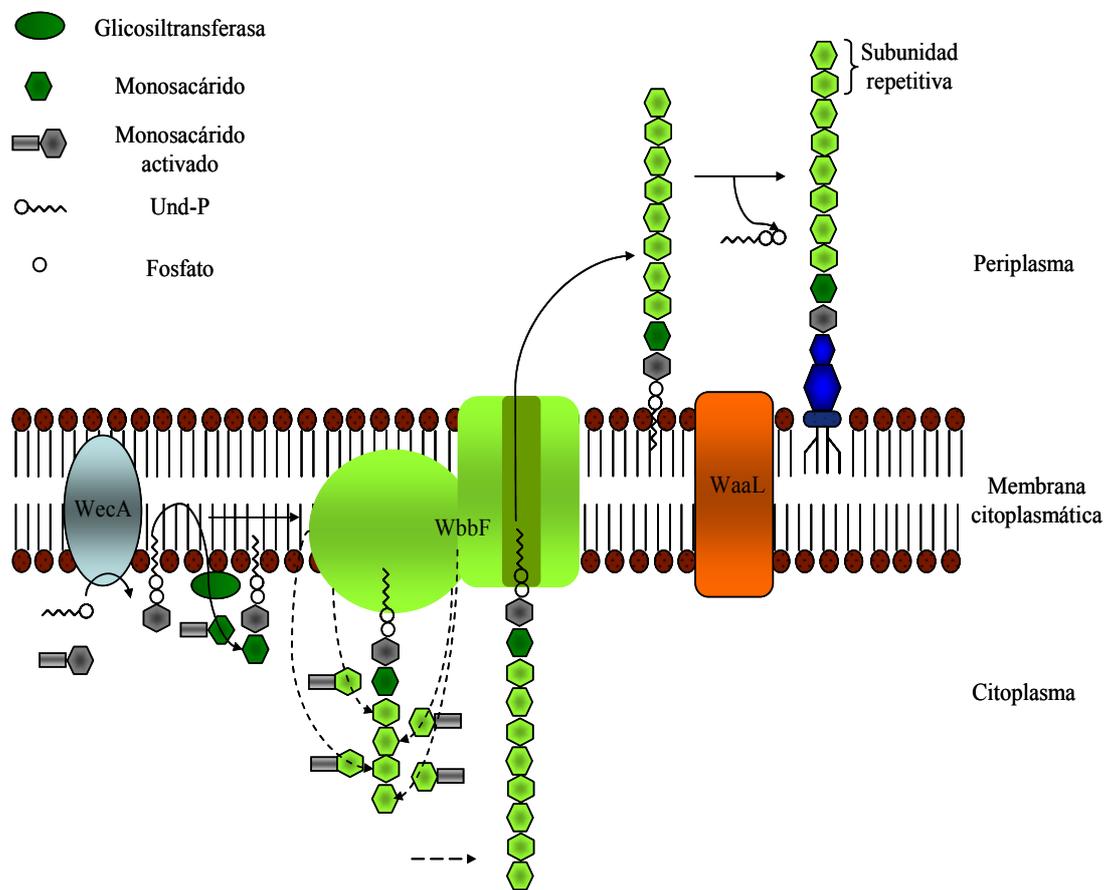


Fig. 1.16. Esquema del sistema de biosíntesis del antígeno O sintasa-dependiente. Tras la iniciación, mediada por WecA, la transferasa WbbE añade un nuevo residuo de ManNAc y WbbF sintetiza el resto de la cadena añadiendo nuevos residuos de forma sucesiva. Además, WbbF es también la encargada de transportar el polímero al periplasma para su ligación al núcleo-lípido A. Para hacer más comprensible el esquema no se muestran los nucleótidos liberados tras la transferencia de los monosacáridos activados.

El antígeno O:54 de *Salmonella enterica* serovar Borreze (fig. 1.16) es el único ejemplo conocido hasta ahora de síntesis por el sistema sintasa-dependiente (Keenleyside y Whitfield, 1996). La síntesis de este homopolímero de N-

acetilmanosamina se inicia por la acción de WecA, que añade un residuo de GlcNAc al und-P, y continúa por la adición de un residuo de ManNAc mediante la transferasa WbbE. 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 y parece ser que actúa también como una sintasa, extendiendo la cadena polisacáridica y exportando simultáneamente el polímero naciente a través de la membrana plasmática para su posterior ligación al lípido A-núcleo. Hasta ahora se desconoce el funcionamiento exacto del mecanismo de transporte del polímero, así como el de la finalización de la transferencia de residuos a la cadena polisacáridica.

1.2.6.4 Organización genética

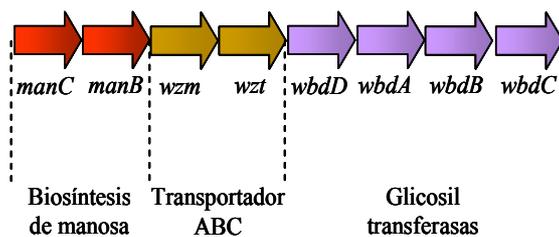
Los genes necesarios para la biosíntesis del antígeno O se localizan en una agrupación génica denominada *wb*, formada por una serie de genes contiguos cuyo número varía en función de la composición y complejidad de dicha molécula. La mayoría de las agrupaciones *wb* se localizan a nivel cromosómico, aunque el antígeno O:54 de *Salmonella enterica* serovar borreze, codificado en un plásmido, representa una excepción importante. La agrupación *wb* codifica las enzimas necesarias para la biosíntesis de los precursores activados, las glicosiltransferasas implicadas en la formación del antígeno O y las proteínas involucradas en los procesos de transporte de éste a la cara periplasmática de la membrana interna. La mayoría de los operones *wb* parecen expresarse constitutivamente y a menudo se hallan precedidos por un JUMPStart, con una secuencia *ops*, como en el caso del operón *waaQ* implicado en la biosíntesis del núcleo del LPS. Esto indica la actuación de un mecanismo de antiterminación (Bailey *et al.*, 1997).

A lo largo de la agrupación se hallan algunos genes muy conservados entre cepas o especies y otros mucho más variables. Así, en general, los genes implicados en la biosíntesis de los monosacáridos son los más conservados. Los genes que codifican para las glicosiltransferasas se describen como semiconservados, ya que las proteínas codificadas por estos genes están claramente relacionadas pero presentan un menor grado de similitud que las anteriores, puesto que se trata de enzimas que catalizan reacciones parecidas pero que reconocen substratos diferentes. Por último, los genes que codifican para las proteínas relacionadas con el reconocimiento específico de la estructura del antígeno O, la polimerización o el transporte son los menos conservados.

Las proteínas codificadas por estos genes se asemejan estructuralmente pero presentan un porcentaje de identidad de aminoácidos muy bajo (Schnaitman y Klena, 1993).

Como es de esperar, la gran diversidad de estructuras de los diferentes antígenos O queda reflejada en el enorme polimorfismo de las agrupaciones génicas *wb* (fig. 1.17). Existen estudios significativos sobre los efectos de la transferencia genética lateral y los eventos de inserción y delección en la evolución y la diversificación de los diversos tipos de antígenos O (Schnaitman y Klena, 1993). Una de las características de especial interés de la agrupación *wb* es su contenido de guanina y citosina (G+C), un 10% inferior al del resto del genoma, siendo aún menor en las zonas menos conservadas dentro de la agrupación. Esta observación hace pensar que estas agrupaciones pudieron haberse formado a partir de una serie de intercambios genéticos que involucraron a organismos muy alejados entre sí.

Agrupación génica *wb* de *Escherichia coli* O9



Agrupación génica *wb* de *Salmonella enterica* sv typhimurium O4

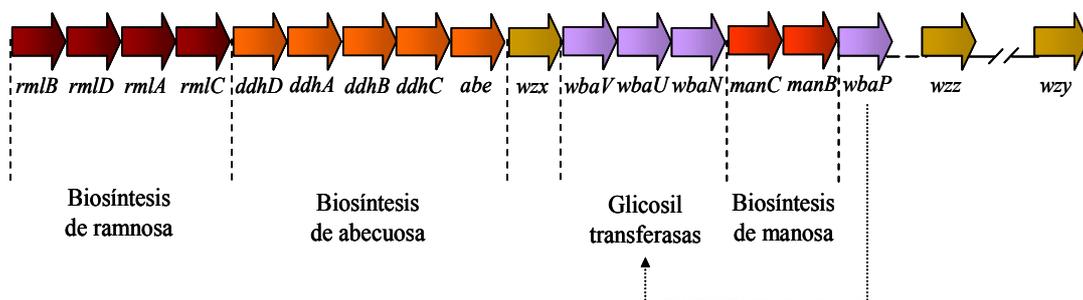


Fig. 1.17. Estructura de las agrupaciones génicas *wb* de *E. coli* O9 (transportador ABC-dependiente; Kido *et al.*, 1995) y *S. enterica* sv typhimurium O4 (Wzy-dependiente; Liu *et al.*, 1995). Los genes en marrón codifican para los respectivos sistemas de exporte del antígeno O. En rojo, naranja y marrón oscuro se representan los genes involucrados en la síntesis de los precursores activados necesarios para la síntesis de la cadena. Las transferasas están indicadas en color lila.

1.2.7 Futuros estudios

A pesar de la gran variabilidad que presentan las moléculas de LPS, asociada a una gran diversidad en los enzimas que están involucrados en su biosíntesis, los estudios realizados hasta la fecha demuestran que, en general, las rutas biosintéticas están bastante conservadas entre las diferentes bacterias. El análisis de los enzimas críticos de estas rutas y su mecanismo de actuación puede tener muchas aplicaciones prácticas en el ámbito clínico y facilitar la síntesis de nuevos agentes bactericidas. Además, el conocimiento en profundidad de la interacción de la molécula con los mecanismos de defensa del hospedador permitiría el desarrollo de nuevos antiinflamatorios, vacunas, y, en definitiva, facilitar la eliminación de las bacterias por parte del sistema defensivo. Por otro lado, los estudios estructurales que se están llevando a cabo con una gran cantidad de LPSs diferentes tienen también una gran importancia, puesto que permitirán establecer una relación entre la conformación química del LPS y su actividad, de forma que se pueda conocer que estructuras específicas juegan un papel crítico en la virulencia bacteriana y como determinan esta actividad.

Claramente, un punto poco conocido y que despierta un gran interés en el proceso biosintético del LPS tiene que ver con los mecanismos de transporte de los diversos componentes a través de la membrana plasmática y de exporte de las moléculas completas hacia la superficie bacteriana. Progresos recientes realizados en sistemas complejos involucrados en el exporte y secreción de algunas proteínas, sugieren algunos modelos y abren nuevas vías de investigación que pueden aplicarse al estudio de estos mecanismos. Por otra parte, también se requerirán grandes esfuerzos para la completa caracterización de los sistemas de regulación que actúan sobre la biosíntesis del LPS.

En cualquier caso, para asegurar avances importantes será necesaria una aproximación interdisciplinar a los futuros estudios realizados sobre el LPS, que combinen nuevas estrategias experimentales en desarrollo, como la biología estructural, con perspectivas más clásicas, como la enzimología, la química de carbohidratos y los ensayos de patogenicidad.

Tal y como hemos desarrollado en la introducción, el antígeno O del LPS es un importante factor de virulencia. En el caso de *Klebsiella pneumoniae* diversos estudios han demostrado su papel fundamental en la protección de la bacteria contra la actividad bactericida del complemento (revisado en Williams y Tomás, 1990; y Podschum y Ullman, 1998). Puesto que la gran mayoría de estos estudios han sido realizados en cepas que expresan el serotipo O1, existe poca información disponible respecto a la contribución de los serotipos restantes a la patogenicidad de *Klebsiella pneumoniae*. Es por este motivo por el que se decidió establecer el papel que un serotipo diferente, el O5, jugaba en la determinación de la virulencia de esta enterobacteria. Con el fin de realizar este análisis de la forma más estricta posible, se consideró oportuno contar con mutantes isogénicos de la bacteria genéticamente caracterizados incapaces de sintetizar el antígeno O, para lo cual se planteó la necesidad de clonar y secuenciar la agrupación génica *wb*, implicada en la biosíntesis de dicho antígeno.

En relación con el estudio de las cadenas laterales O de los diversos serotipos de *Klebsiella pneumoniae*, se había observado una cierta similitud entre la estructura química del antígeno O4 de *Serratia marcescens* y la del antígeno O12 de *Klebsiella pneumoniae*, ambos heteropolisacáridos no ramificados. La agrupación génica *wb* que contenía los genes implicados en la producción del antígeno O4 de *S. marcescens* N28b había sido analizada previamente por nuestro grupo de investigación (Saigí *et al.*, 1999). Se decidió averiguar si la similitud existente entre ambos antígenos se basaba en la similitud de sus respectivos conjuntos de genes *wb*. Así pues, nuestro objetivo fue clonar la agrupación génica *wb_{KpO12}* para, una vez comparada con *wb_{SmO4}*, proceder a comprobar que componentes de la agrupación estaban involucrados en la determinación de la especificidad de uno y otro antígeno. Para ello se hacía necesaria la construcción de mutantes que permitieran realizar los pertinentes estudios de complementación.

Por último, una parte del trabajo se centró en el estudio del núcleo del LPS de *Klebsiella pneumoniae* cepa 52145 (O1:K2). Trabajos previos habían descrito parcialmente la estructura de este oligosacárido en los serotipos O1 y O8 y fueron observadas ligeras diferencias entre ellos (Süsskind *et al.*, 1998; Severn *et al.*, 1996). Determinaciones posteriores de la estructura completa indicaban que ésta se hallaba conservada en los diferentes serotipos de *K. pneumoniae* (Vinogradov *et al.*, 2001; Vinogradov y Perry, 2001). Además, nuestro grupo de investigación había clonado y secuenciado el conjunto de genes *waa* de *K. pneumoniae* cepa C3, involucrado en la

síntesis del núcleo del LPS (Regué *et al.*, 2001). Nuestro objetivo principal fue la caracterización funcional de los diversos genes responsables de la síntesis del núcleo en la cepa 52145, mediante la construcción de mutantes y el análisis de las estructuras de núcleo incompletas que éstos generaran. Para ello, en primer lugar fue necesaria la secuenciación de la agrupación génica *waa* en *K. pneumoniae* 52145, con el fin de descartar posibles diferencias respecto a la secuencia de la cepa C3 de la cuál disponíamos.

2.1 Cepas Bacterianas

Cepa	Características Principales	Procedencia
<i>K. pneumoniae</i>		
KT769	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , serotipo O5:K57	I. Ørskov
KT769-1	Mutante de KT769 Rif ^r en el gen <i>wbdC</i> por recombinación en un punto con pJT80	Merino <i>et al.</i> , 2000
KT769-6	Mutante de KT769 Rif ^r en los genes <i>wzm-wzt</i> por doble recombinación con pJT86	Merino <i>et al.</i> , 2000
KT776	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , serotipo O12:K80	I. Ørskov
KT776-1	Mutante antígeno O ⁻ de KT776 en los genes <i>wzm-wzt</i> por doble recombinación con pKO3 Wzm-t	Este trabajo
KT776-2	Mutante antígeno O ⁻ de KT776 en el gen <i>wbbB</i> por doble recombinación con pKO3 WbbB	Este trabajo
52145	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , serotipo O1:K2	Nassif <i>et al.</i> , 1989
52145Δ <i>orf2</i>	Mutante de 52145 en el gen <i>orf2</i> por doble recombinación con pKO3 <i>orf2</i>	Este trabajo
52145Δ <i>orf3</i>	Mutante de 52145 en el gen <i>orf3</i> por doble recombinación con pKO3 <i>orf3</i>	Este trabajo
52145Δ <i>orf4</i>	Mutante de 52145 en <i>orf4</i> por doble recombinación con pKO3 <i>orf4</i>	Este trabajo
52145Δ <i>orf5</i>	Mutante de 52145 en el gen <i>orf5</i> por doble recombinación con pKO3 <i>orf5</i>	Este trabajo
52145Δ <i>orf6</i>	Mutante de 52145 en <i>orf6</i> por doble recombinación con pKO3 <i>orf6</i>	Este trabajo
52145Δ <i>orfY</i>	Mutante de 52145 en <i>orfY</i> por doble recombinación con pKO3 <i>orfY</i>	Este trabajo
52145Δ <i>orf7</i> (NC19)	Mutante de 52145 en el gen <i>orf7</i> por doble recombinación con pKO3 <i>orf7</i>	Regué <i>et al.</i> , 2001
52145Δ <i>orf8</i>	Mutante de 52145 en el gen <i>orf8</i> por doble recombinación con pKO3 <i>orf8</i>	Este trabajo
52145Δ <i>orf9</i>	Mutante de 52145 en el gen <i>orf9</i> por doble recombinación con pKO3 <i>orf9</i>	Este trabajo
52145Δ <i>orf10</i> (NC18)	Mutante de 52145 en el gen <i>orf10</i> por doble recombinación con pKO3 <i>orf10</i>	Regué <i>et al.</i> , 2001
52145Δ <i>orf12</i> (NC16)	Mutante de 52145 en el gen <i>orf12</i> por doble recombinación con pKO3 <i>orf12</i>	Regué <i>et al.</i> , 2001
C3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , serotipo O1:K66	I. Ørskov
<i>S. marcescens</i>		
N28b	<i>Serratia marcescens</i> , serotipo O4	Gargallo-Viola, 1989
N28b-2	Mutante antígeno O ⁻ de N28b en el gen <i>wbbL</i> por recombinación en un punto	Rubirés <i>et al.</i> , 1997
N28b-3	Mutante antígeno O ⁻ de N28b en el gen <i>wbbA</i> por recombinación en un punto	Saigí <i>et al.</i> , 1999
N28b-4	Mutante antígeno O ⁻ de N28b en los genes <i>wzm</i> y <i>wzt</i> por doble recombinación	Saigí <i>et al.</i> , 1999
N28bΔ <i>orf9, orf10</i>	Mutante de N28b en los genes <i>orf9-orf10</i> por doble recombinación	Nuria Coderch, tesis doctoral en preparación
<i>E. coli</i>		
DH5α	F ⁻ <i>endA hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁻) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96</i> φ80 <i>lacZ</i>	Hanahan, 1983
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> (F' <i>proAB lacI^qZ</i> ΔM15 Tn10)	Stratagene
MC1061	<i>Thi thr1 leu6 proA2 his4 argE2 lacY1 galK2 ara14 xyl5 supE44, λpir</i>	Wertman <i>et al.</i> , 1986
SM10	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu, Km^r, λpir</i>	Rubirés <i>et al.</i> , 1997
CLM4	<i>lacZ trp</i> Δ(<i>sbcB-rfb</i>) <i>upp rel rpsL ΔrecA</i>	Marolda y Valvano, 1993

Cepa	Características Principales	Procedencia
HB101	<i>Pro leu thi lacY str^r endoI recA^r</i>	Ditta <i>et al.</i> , 1985

2.2 Vectores utilizados

Vector	Características principales	Procedencia
pLA2917 SuperCos pFS100	Cósmido con resistencia a tetraciclina y kanamicina <i>cos</i> (2), Amp ^r , Km ^r Plásmido suicida derivado de pGP704, dependiente de λ pir y con resistencia a kanamicina	Allen y Hanson, 1985 Stratagene Rubirés <i>et al.</i> , 1997
pKO3	Plásmido con resistencia al cloramfenicol, termosensible para la replicación, <i>sacB</i>	Link <i>et al.</i> , 1997
pST-Blue	Vector para la clonación de fragmentos obtenidos por PCR. Contiene el gen <i>lacZ</i> . Km ^r	Novagen
pBR328	Amp ^r , Cm ^r , Tc ^r	Soberon <i>et al.</i> , 1980
pGEM-T easy	Vector para la clonación de fragmentos obtenidos por PCR. Contiene el gen <i>lacZ</i> . Amp ^r	Promega
pBCSK (+/-)	Vector de 3,4 Kb derivado de pUC19. Contiene el gen <i>lacZ</i> y es Cm ^r .	Stratagene
pRK2073	Plásmido facilitador de la conjugación derivado de pRK2013. Sp ^r	Ditta <i>et al.</i> , 1985
CosKT4	pLA2917 con inserto de 20 Kb que contiene la agrupación <i>wb_{KpO5}</i>	Merino <i>et al.</i> , 2000
pJT80	pFS100 con un fragmento interno (697 pb) del gen <i>wbdC</i> de <i>K. pneumoniae</i> KT769 (O5)	Merino <i>et al.</i> , 2000
pJT86	pKO3 con un inserto para mutar los genes <i>wzm</i> y <i>wzt</i> de <i>K. pneumoniae</i> KT769 (O5)	Merino <i>et al.</i> , 2000
CosKT12	pLA2917 con inserto de 20 Kb que contiene la agrupación <i>wb_{KpO12}</i>	Este trabajo
pSub6	Supercos con la agrupación completa <i>wb_{SmN28bO4}</i>	Saigí <i>et al.</i> , 1999
pST1	pST-Blue con los genes <i>wzm-wzt</i> de <i>K. pneumoniae</i> O12	Este trabajo
pST5	pST-Blue con el gen <i>wbbA</i> de <i>S. marcescens</i> N28b O4	Este trabajo
pST6	pST-Blue con los genes <i>wzm-wzt</i> de <i>S. marcescens</i> N28b O4	Este trabajo
pST7	pST-Blue con los genes <i>wzm-wzt-wbbA</i> de <i>S. marcescens</i> N28b O4	Este trabajo
pJTO12	pBR328 con la agrupación completa <i>wb_{KpO12}</i>	Este trabajo
pBR1	pBR328 con el gen <i>wbbL</i> de <i>K. pneumoniae</i> O12	Este trabajo
pBR2	pBR328 con el gen <i>wbbB</i> de <i>K. pneumoniae</i> O12	Este trabajo
pBR3	pBR328 con los genes <i>wzm-wzt-wbbB</i> de <i>K. pneumoniae</i> O12	Este trabajo
pKO3 Wzm-t	pKO3 con un inserto para mutar los genes <i>wzm-wzt</i> de <i>K.</i> <i>pneumoniae</i> KT776 (O12)	Este trabajo
pKO3 WbbB	pKO3 con un inserto para mutar el gen <i>wbbB</i> de <i>K.</i> <i>pneumoniae</i> KT776 (O12)	Este trabajo
pNur8	pLA2197 con la agrupación <i>waa</i> de <i>K. pneumoniae</i> C3	Regué <i>et al.</i> , 2001
pKO3 <i>orf2</i>	pKO3 con un inserto para mutar <i>orf2</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
pKO3 <i>orf3</i>	pKO3 con un inserto para mutar <i>orf3</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
pKO3 <i>orf4</i>	pKO3 con un inserto para mutar <i>orf4</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
pKO3 <i>orf5</i>	pKO3 con un inserto para mutar <i>orf5</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
pKO3 <i>orf6</i>	pKO3 con un inserto para mutar <i>orf6</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
pKO3 <i>orfY</i>	pKO3 con un inserto para mutar <i>orfY</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
pKO3 <i>orf7</i>	pKO3 con un inserto para mutar <i>orf7</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Regué <i>et al.</i> , 2001

Vector	Características principales	Procedencia
pKO3 <i>orf8</i>	pKO3 con un inserto para mutar <i>orf8</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
pKO3 <i>orf9</i>	pKO3 con un inserto para mutar <i>orf9</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
pKO3 <i>orf10</i>	pKO3 con un inserto para mutar <i>orf10</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Regué <i>et al.</i> , 2001
pKO3 <i>orf12</i>	pKO3 con un inserto para mutar <i>orf12</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Regué <i>et al.</i> , 2001
pKO3 <i>orf4-6</i>	pKO3 con un inserto para mutar <i>orf4</i> , 5 y 6 de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
pGLU	Vector pLS88 (Km ^r , Sm ^r , Sul ^r) con el gen <i>lgtF</i> de <i>Haemophilus ducreyi</i>	Filiatrault <i>et al.</i> , 2000
pGEMT <i>waaE</i>	pGEM-T easy con el gen <i>waaE</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Regué <i>et al.</i> , 2001
pGEMT _{Nuk1/KOR}	pGEM-T easy con <i>orf3</i> , <i>orf4</i> , <i>orf5</i> y <i>orf6</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
pGEMT _{Nuk5/Nuk8}	pGEM-T easy con <i>orf8</i> y <i>orf9</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
pST _{Nuk5/Nuk8}	pST-Blue con <i>orf8</i> y <i>orf9</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
pGEMT _{Nuk5.2/Nuc4.co7}	pGEM-T easy con <i>orfY</i> y <i>orf7</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
PGEMT _{S7/Nih5.A5}	pGEM-T easy con <i>hldD</i> y <i>orf2</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
pGEMT _{Nuk7/Nuk10}	pGEM-T easy con <i>orf10</i> , <i>orf11</i> y <i>orf12</i> de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
pGEMT _{NUK1F2/KORF1}	pGEM-T easy con <i>orf5</i> (<i>waaL</i>) de <i>K. pneumoniae</i> 52145	Este trabajo
pGEMT _{WaaL/OR/OF}	pGEM-T easy con <i>orf5</i> (<i>waaL</i>) de <i>K. pneumoniae</i> C3	Este trabajo

2.3 Medios de cultivo

En la mayoría de los casos se utilizó caldo Luria-Bertani (LB)-Miller o agar LB-Miller (Miller, 1972), cuya composición es:

- Peptona tríptica de caseína 10 g/l
- Extracto de levadura 5 g/l
- Cloruro sódico 10 g/l

El medio LB agar contenía, además, un 1.5% de agar. En el caso del ‘LB-agar blando’, se añadía sólo un 0.6% de agar al medio.

Por otro lado, para realizar la mutagénesis con el plásmido pKO3, el medio utilizado era igual que el LB-Miller, pero con 5 g/l de cloruro sódico, y fue denominado LB especial.

2.3.1 Antibióticos y otros suplementos

Cuando fue necesario el medio fue suplementado con los antibióticos ampicilina (Amp 100 µg/ml), cloramfenicol (Cm 25 µg/ml), rifampicina (Rif 100 µg/ml), espectinomicina (Sp 50 µg/ml), tetraciclina (Tc 20 µg/ml) o kanamicina (Km 50 µg/ml). En los casos en los que se hacían crecer bacterias con plásmidos que contenían el gen *lac* como sistema de selección de transformantes que habían ligado un inserto, se suplementaba el LB agar con Isopropil-B-D-tiogalactopiranosidasa (IPTG) a 0.5 mM, y

5-bromo-4-cloro-3-indol- α -D-galactosidasa (X-Gal 80 $\mu\text{g/ml}$). En el protocolo de mutagénesis con pKO3, por doble recombinación, para forzar la segunda recombinación se suplementaron placas de LB especial agar con sacarosa al 5%.

2.4 Obtención de cepas bacterianas resistentes a la rifampicina

Para la obtención de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a la rifampicina, se realizaron cultivos en LB líquido de éstas. Cuando este se encontraba en fase exponencial, 1ml del cultivo bacteriano fue centrifugado, resuspendido en 100 μl del mismo medio, y sembrado en placas de Petri de LB agar suplementadas con rifampicina (100 $\mu\text{g/ml}$), que se incubaron a 37°C durante 16-18h. Tras la incubación, las colonias que crecían sobre la placa eran resistentes a la rifampicina.

2.5 Estudios con bacteriófagos

Para estudiar la sensibilidad a bacteriófagos de las diversas cepas bacterianas se utilizó la técnica del test de la gota. A de 200 μl de cultivo en fase exponencial de la bacteria a analizar, se añadieron 2 ml de LB-agar blando (0,6 % de agar) y, una vez mezclado, se extendió sobre placas de LB-agar sólido para obtener un crecimiento bacteriano confluyente. Tras la solidificación del agar blando, se depositó una gota del fago (10^7 ufp/ml) en la placa y se incubó a 37°C. Tras 16-18 horas de incubación se observó la presencia o no de una calva de lisis bacteriana.

Los principales fagos que utilizamos en este trabajo fueron el fago Φ_2 , que reconoce el antígeno capsular K2 presente en *K. pneumoniae* 52145 (Geyer *et al.*, 1983), y el fago FC3-10 (α β), que tiene como receptor el núcleo del LPS de diversas *K. pneumoniae*, excepto el de 52145 y de otras cepas de su mismo tipo (Ciurana, 1990).

2.6 Estudios de la superficie celular

2.6.1 Análisis de la hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad superficial bacteriana fue estudiada por dos métodos diferentes. El primero fue la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) en fenil-sefarosa, descrita por Källenius *et al.*, 1985. Las bacterias crecidas en medio líquido fueron centrifugadas y resuspendidas en tampón fosfato salino 10 mM (PBS, pH 7,4) hasta alcanzar una densidad óptica a 470 nm ($\text{DO}_{470\text{nm}}$) de 1,0. La suspensión se pasó por una columna con una matriz de fenil-sefarosa y se eluyó con una solución de

cloruro sódico 4 M. El eluido fue recogido y se determinó su DO_{470nm} . Los resultados se expresaron como el porcentaje de bacterias retenidas en la matriz. La composición del PBS es:

- NaCl 8 g/l
- KCl 0,2 g/l
- Na₂HPO₄ 1,15 g/l
- KH₂PO₄ 0,2 g/l

El otro método utilizado para analizar la hidrofobicidad superficial fue el de la adherencia bacteriana a hidrocarburos (BATH), según Rosemberg *et al.*, 1980. Como en el caso anterior, se hicieron crecer las bacterias en medio líquido y, una vez alcanzada la fase estacionaria, se centrifugó el cultivo. El sedimento celular fue lavado dos veces con tampón fosfato-urea-magnesio (pH 7,1) y resuspendido en el mismo tampón hasta alcanzar una DO_{400nm} de 1,0. La suspensión fue mezclada vigorosamente con varios volúmenes del hidrocarburo utilizado y se dejó reposar hasta conseguir la separación de las fases. Se midió la DO_{400nm} de la fase acuosa y se comparó con los valores obtenidos para un volumen estándar de suspensión celular no tratada con el hidrocarburo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la absorbancia de la fase acuosa tras el tratamiento con el hidrocarburo relativo a la absorbancia inicial (suspensión no tratada). Se obtuvieron resultados de análisis con dos hidrocarburos diferentes: *n*-xileno y *n*-hexadecano. La composición del tampón fosfato-urea-magnesio utilizado es:

- K₂HPO₄ · 3H₂O 22,2 g/l
- KH₂PO₄ 7,26 g/l
- Urea 1,8 g/l
- MgSO₄ · 7H₂O 0,2 g/l

2.6.2 Análisis de la carga superficial bacteriana

Para determinar la carga superficial bacteriana, se midió el potencial zeta utilizando un Zetasizer II (de Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom). La carga se expresaba en milivoltios (mV).

2.6.3 Obtención de proteínas de membrana externa

Las proteínas de la membrana externa de las bacterias a estudiar se obtuvieron mediante el método de Filip *et al.*, 1973. Este método se basa en la insolubilización de las membranas externas en presencia del detergente iónico lauril sarcosinato sódico

(SLS). Para el aislado de las proteínas, fueron obtenidos crecimientos en fase estacionaria de las células a estudiar y fueron lavados con Tris-Mg pH 7,3 (Tris 10 mM y Cl_2Mg 5 mM). Posteriormente fueron lisados mediante el uso de *French press* a 16000 lb/in² (en el caso de volúmenes grandes, de 100 o más ml), o bien por sonicación de las muestras durante 5-10 minutos a intervalos de 1 minuto (en el caso de volúmenes de entre 500 μl y 1000 μl). Tras éste proceso, las células no lisadas fueron eliminadas por centrifugación a 10000 $\times g$ durante 10 minutos. El sobrenadante contenía las células lisadas, que fueron centrifugadas de nuevo a 10000 $\times g$ durante 2 horas. Esto permitió separar las membranas totales, que quedan en el sedimento. Seguidamente, éstas fueron solubilizadas con SLS al 0,5% y ultracentrifugadas a 100000 $\times g$ durante 2 horas, para obtener así un precipitado que contiene las membranas externas y un sobrenadante con las membranas internas. Por último, las membranas externas obtenidas fueron resuspendidas en Tris-Mg pH 7,3 y conservadas a -20°C para su posterior análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Para realizar esta electroforesis, un volumen de cada una de las muestras (según la concentración de proteínas) fue mezclado con un volumen igual de tampón de muestras (pH 6,8) y la mezcla fue incubada a 100°C durante 10 minutos. La composición del tampón de muestras es:

• Glicerol	5 g
• Dodecil sulfato sódico (SDS)	1,15 g
• Tris	0,38 g
• β -mercaptoetanol	2,5 ml
• H ₂ O bidestilada	hasta 50 ml
• Azul de bromofenol 0,1%	30 μl

2.6.4 Obtención del lipopolisacárido (LPS)

El LPS fue aislado y purificado según el método de Westphal modificado por Osborn (Westphal y Jann, 1965; Osborn, 1966). Se partió de cultivos bacterianos líquidos que fueron centrifugados para obtener los sedimentos celulares y lavados con agua fría para eliminar los restos del medio de cultivo. En primer lugar era necesario deshidratar las células, y para ello estas fueron resuspendidas con una solución de cloroformo y metanol al 50% y centrifugadas durante 10 minutos a 8000 $\times g$. Este proceso se repitió tres veces y, seguidamente, se resuspendió el sedimento celular con etanol, manteniéndose durante 16-18 horas. Posteriormente, las células fueron

centrifugadas y fueron realizados tres lavados con acetona, centrifugando a $8000 \times g$ entre cada uno de ellos. Finalmente, se resuspendieron las células en éter dietílico y se extendieron sobre un papel de filtro para permitir la evaporación del éter y quedarnos con las células deshidratadas.

Las células, una vez deshidratadas, se mezclaron con una solución, a partes iguales, de agua y fenol al 90% y se mantuvieron durante 20 minutos en un baño a 65°C con agitación. La mezcla se repartió en tubos de centrifuga de vidrio o teflón y se dejó enfriar antes de ser centrifugada durante 30 minutos a 4000 r.p.m. (a 0°C). Esta centrifugación permitió la formación de dos fases a partir de la mezcla anterior: una fase acuosa en la que se encontraba el LPS y que se guardó para su posterior procesado; y una fase fenólica que fue utilizada para realizar una segunda y una tercera extracción (añadiendo más agua y procediendo como se ha descrito hasta ahora). Las fases acuosas de las tres extracciones se dializaron juntas frente a agua bidestilada durante 48 horas a 4°C , con el objetivo de eliminar los restos de fenol presentes en la fase acuosa. Posteriormente esta fase acuosa es liofilizada y el liofilizado resuspendido en agua bidestilada y ultracentrifugado a $100000 \times g$ durante 4 horas. El precipitado obtenido corresponde al LPS. El sobrenadante fue ultracentrifugado de nuevo (dos veces más, para aumentar el rendimiento del protocolo), y los tres precipitados obtenidos se resuspendieron en agua bidestilada y se liofilizaron.

Para realizar obtenciones sencillas, con la finalidad de obtener LPSs de diversas cepas bacterianas a la vez de forma más rápida y poder analizar así muchas muestras mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se utilizó la extracción de LPS descrita por Darveau y Hancock, 1983. En este caso el sedimento celular de 200 μl de crecimiento bacteriano en fase estacionaria se resuspendió en 25 μl de tampón de muestras (ver 2.6.3) y se hirvió durante 10 minutos. Una vez frío se añadió el mismo volumen de proteinasa K (1 mg/ml) para degradar las proteínas y se incubó a 58°C durante 2 horas. Para el análisis por SDS-PAGE se utilizaban entre 10-15 μl de esta solución que contenía el LPS.

En los casos en los que se quiso obtener una mayor resolución de las fracciones de bajo peso molecular del LPS, se procedió tal y como acabamos de describir, pero utilizando tampón de núcleo, en vez de tampón de muestras, y se utilizaban entre 3-4 μl de la mezcla para el análisis. El tampón de núcleo estaba compuesto por:

- Tris-HCl (pH 8) 0,06 M
- EDTA 1 mM
- SDS 2 %
- B-mercaptoetanol 8%
- Azul de bromofenol 4%

2.6.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida

El estudio del perfil electroforético de las proteínas de la membrana externa bacteriana y del LPS se realizó en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) siguiendo el método de Laemmli modificado por Ames (Laemmli, 1970; Ames *et al.*, 1974). En la parte superior del gel (fase de compactación) se utilizó un porcentaje de acrilamida del 5%, mientras que en la fase inferior (fase de resolución) se utilizó un porcentaje del 12%. La electroforesis se realizó a 10 mA (60 V) hasta que las muestras superaron la fase de compactación, y a 20 mA (150 V) durante el paso de las muestras a través de la fase de resolución.

En los análisis de proteínas, los geles fueron fijados y teñidos con azul de Coomassie, según el método de Fairbanks *et al.*, 1971. Para el análisis del LPS los geles fueron teñidos con nitrato de plata, siguiendo las condiciones descritas por Tsai y Frasch, 1982.

Para obtener una mejor resolución de las fracciones de bajo peso molecular del LPS se utilizaron geles de Tris-Tricina (SDS-Tricine-PAGE), tal y como describen Pradel y Schnaitman, 1991. En estos casos, se utilizó un porcentaje de acrilamida del 4,5% en la fase de compactación y del 15% en la fase de resolución. La electroforesis se realizó a 10 mA durante el paso de las muestras por las dos fases del gel. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata.

2.6.6 Análisis químico del LPS

2.6.6.1 Hidrólisis con ácido acético

La hidrólisis suave con ácido acético permite la ruptura del enlace entre la glucosamina del lípido A y el KDO del núcleo (y también entre dos moléculas de KDO), liberándose así la fracción polisacáridica del LPS. Para realizar este procedimiento, se añadió ácido acético al 1% a una solución 10 mg/ml de LPS purificado. La mezcla se incubó a 100°C en agitación constante durante, aproximadamente, una hora y media, hasta observar la formación de un precipitado (la

parte lipídica). A continuación se centrifugó la muestra a baja velocidad para eliminar la mayor parte del precipitado y, posteriormente, el sobrenadante se centrifugó durante 4 horas a $10000 \times g$. El sobrenadante resultante de esta última centrifugación se recogió y se guardó liofilizado para su uso posterior.

2.6.6.2 Obtención de derivados acetato-alditol para la determinación de azúcares neutros

Se utilizó el procedimiento descrito por Vinogradov *et al.*, 1992, con algunas modificaciones en la hidrólisis. Mediante esta metodología se prepararon las muestras para su posterior análisis mediante cromatografía de gases. Se partió de 100 μl de una solución 5 mg/ml de LPS y se añadió 1 ml de HCl 0,1 M, manteniéndose durante 48 horas a 100°C (la hidrólisis también podía realizarse añadiendo 1 ml de ácido trifluoroacético, TFA, y dejando la muestra a 100°C durante 4 horas). Se dejó enfriar la muestra, se añadieron 30 μg del control interno (xilosa en nuestro caso), y se evaporó en el rotavapor. Para eliminar los ácidos grasos, se añadió 1ml de éter al 10% en hexano y se dejó evaporar (este proceso se repitió dos veces). Las muestras se alcalinizaron añadiendo 0,5 ml de agua bidestilada y se procedió a la carboxireducción por adición de 2 mg de NaBH_4 . Tras 4 horas a temperatura ambiente se neutralizó la solución con HCl 2 M y se evaporó al rotavapor. Seguidamente se realizaron tres lavados con ácido acético al 5% en metanol y dos con metanol, agitando vigorosamente en cada lavado y evaporando cada vez en el rotavapor. Posteriormente se realizó la peracetilación, añadiéndose a la muestra 0,2 ml de anhídrido acético y manteniéndola a 85°C durante 15 minutos. La muestra se secó bajo un flujo de N_2 y se añadieron 0,2 ml de piridina y 0,1 ml de anhídrido acético, incubándose esta vez la muestra durante 30 minutos a 85°C . Tras evaporar de nuevo con N_2 , se añadió a la muestra con cloroformo y se recogió la fase orgánica (los azúcares), que se transfirió a un vial de cromatografía, donde se realizó la última evaporación con N_2 . Finalmente se resuspendió la muestra en unos 40 μl de metanol, de los cuales se pinchaban en el cromatógrafo entre 0,5 μl y 1 μl .

2.6.6.3 Obtención de derivados acetato-alditol para la determinación de ácidos urónicos

Este procedimiento se basa en el mismo principio que el método para determinar los azúcares neutros. La principal diferencia consiste en añadir un paso de metanolisis, reacción específica para los ácidos urónicos (Süsskind *et al.*, 1998b). Habitualmente, el

ácido urónico derivatizado aparece en el cromatograma en la misma posición que el azúcar neutro del que deriva. Por tanto, la medida de la concentración del ácido urónico se realiza por diferencia con la concentración del azúcar neutro medido por el sistema descrito anteriormente. Se partió de 100 µl de una solución 5 mg/ml de LPS, se puso en un tubo de vidrio y se dejó secar en un secador. Una vez completamente seca la muestra, se añadieron 500 µl de una solución 0,5 M de HCl en metanol, tras lo cual se cerró el tubo herméticamente y se dejó 45 minutos a 85°C. Posteriormente, se evaporó el contenido del tubo en un rotavapor y se añadieron 500 µl de agua destilada y NaOH hasta un pH de 8. Se añadieron 3 mg de NaBD₄ y se dejó la muestra a temperatura ambiente durante 4 horas (o a 4°C toda la noche) y, gota a gota, se añadió HCl 2 M hasta que dejó de haber efervescencia. Se realizaron tres lavados con 500 µl de ácido acético al 5% en metanol, evaporando cada vez con el rotavapor, y dos lavados más con 500 µl de metanol (también evaporando tras ellos). A partir de este punto se procedió como en el método de los azúcares neutros, añadiendo a la muestra una segunda muestra de LPS de LPS no metanolizado (100 µl de una solución 5 mg/ml).

2.6.6.4 Cromatografía de gases

Las muestras, preparadas tal y como se describe en el apartado anterior, se analizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890, Serie II, utilizando He como gas portador. El programa de temperaturas fue: 175°C durante 2 minutos; 8°C/minuto hasta 240°C; 240°C durante 1 minuto; 8°C/minuto hasta 265°C; y 265°C durante 12 minutos.

2.6.6.5 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) de monosacáridos metilados y acetilados parcialmente

Se siguió el procedimiento descrito en Holst *et al.*, 1990. Este método, denominado permetilación, consiste en metilar todos los grupos hidroxil libres presentes en un oligosacárido. A continuación, éste es hidrolizado y los monosacáridos se derivan para la determinación de azúcares neutros (ver 2.6.6.5). Este método permite conocer las posiciones implicadas en los enlaces de los azúcares para formar el oligosacárido (en la muestra aparecerán como grupos acetyl). A partir de 6-10 mg de muestra seca, se añadieron 500 µl de DMSO anhidro, unos mg de NaOH y se cerró la muestra herméticamente, sometiéndola a una corriente de N₂ durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 500 µl de MeI y, tras permanecer unos 15 minutos a

temperatura ambiente en agitación, 300 μ l más de MeI, permaneciendo 1 hora más a temperatura ambiente en agitación. Los restos de MeI fueron eliminados bajo una corriente de N_2 y, a continuación, se llevó a cabo una extracción con agua y cloroformo para eliminar el DMSO. A continuación se recogieron las dos fases formadas por separado, lavando la fase acuosa tres veces con cloroformo y la fase clorofórmica tres veces con agua. Por último, la fase de cloroformo fue evaporada con N_2 . El resto del proceso continúa con el procedimiento habitual de preparación de los alditol-derivados para la determinación de azúcares neutros. Las muestras fueron analizadas mediante un Hewlett-Packard, modelo 5989 A, con una columna capilar HP-5. El gradiente de temperatura fue de 150°C a 320°C a 5°C/min. La espectrometría de impacto electrónico se llevó a cabo a 70 keV y en la ionización química se utilizó amoníaco como gas reactante.

2.6.6.6 Espectrometría de masas

Los análisis del núcleo del lipopolisacárido por espectrometría de masas fueron realizados por la doctora M. Michela Corsaro, del Departamento de Química Orgánica y Bioquímica de la Universidad Federico II (Nápoles, Italia). Un espectrómetro de masas consta de tres componentes básicos: Una fuente de iones donde se generan iones en fase gaseosa a partir de la muestra, un analizador donde los iones producidos son acelerados y separados según su relación masa-carga y un detector que produce una señal eléctrica proporcional al número de iones que llegan.

Los análisis se realizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight*). Este método de ionización permite transferir moléculas termolábiles a fase gaseosa como iones intactos para su análisis y detección. Se utilizó un espectrómetro de masas Voyager DE-PRO (Applied Biosystems) en modo reflectrón a un voltaje de 20kV disminuyendo un 25% en diez pasos sucesivos y con una extracción iónica retardada. Las calibraciones de las masas se realizaron utilizando una mezcla de maltooligosacáridos de jarabe de maíz (Sigma). Para determinar la composición del oligosacárido que forma el núcleo del LPS se llevaron a cabo experimentos de fragmentación mediante PSD (*Post Source Decay*). El PSD está basado en la descomposición metaestable de los iones desorbidos por el láser. El análisis por PSD del oligosacárido muestra una serie de fragmentos, provenientes de la descomposición del núcleo del LPS, a partir de los cuales se podía establecer la composición completa del oligosacárido en cuestión. Los espectros fueron

analizados y procesados por ordenador mediante la utilización del software *Applied Biosystems Data Explorer*.

2.7 Métodos inmunológicos

2.7.1 Obtención de suero inmune

La obtención de anticuerpos específicos se realizó mediante la inmunización de conejos hembra, tipo *White NewZealand* (de aproximadamente 1,5 Kg, suministrados por Isoquimem) con el antígeno específico para el que deseábamos obtener anticuerpos (Merino *et al.*, 1992; Tomás *et al.*, 1991). Como antígenos se utilizaron los LPSs purificados de las cepas de *K. pneumoniae* serotipos O12 (Este trabajo) y O5 (Merino *et al.*, 2000); de la cepa de *S.marcescens* serotipo O4 (Rubirés *et al.*, 1997); y de una cepa de *E. coli* serotipo O16 (Rubirés *et al.*, 1997).

Para la obtención del antisuero se utilizaron 50 µg de LPS purificado que fueron inyectados al conejo en una primera dosis junto con adyuvante de Freund completo. En dos intervalos sucesivos de quince días cada uno se realizaron una segunda y una tercera inmunización con la misma cantidad de LPS y adyuvante de Freund incompleto. Dos semanas después de la última inmunización se extrajeron 20 ml de sangre de la vena marginal de la oreja del animal. La sangre obtenida se incubó durante 1 hora a 37°C, se mantuvo 16-18 horas a 4°C y se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 20 minutos para eliminar la fracción celular. El sobrenadante obtenido, que fue utilizado como antisuero, se realizaron partes alícuotas que se conservaron a -80°C. La especificidad de los anticuerpos obtenidos se comprobó mediante Western-blot.

2.7.2 Inmunotransferencia (western-blot) sobre moléculas de LPS

Tras realizar electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE) con las muestras de LPS, estas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de poro mediante el sistema Semi-Dry Blot durante 30 minutos a 30V en frío (4°C), utilizando para ello tampón de transferencia (Towbin *et al.*, 1979). Una vez realizada la transferencia se realizaron dos lavados de 5 minutos con tampón NET y se bloquearon los lugares de unión inespecíficos de las membranas incubándolas en agitación durante 1 hora con NET 1% BSA (albúmina sérica bovina) a temperatura ambiente. Seguidamente se añadió el anticuerpo primario, es decir, el antisuero policlonal de conejo anti-O específico, a una dilución 1:500 en tampón NET con Tween-20 al 0,5% y BSA al 1%, y se mantuvo en agitación durante 1 hora. El anticuerpo sobrante se eliminó mediante 3

lavados de 10 minutos con NET 0,5% Tween-20. Posteriormente se incubó durante 1 hora en agitación con el anticuerpo secundario, inmunoglobulina G de cabra anti-conejo conjugada con fosfatasa alcalina, diluido 1:1000 en NET 0,5% Tween-20 1% BSA. De nuevo el anticuerpo sobrante se eliminó mediante 3 lavados de 10 minutos con el mismo tampón utilizado para eliminar el anticuerpo primario. Por último, se realizaron tres lavados de cinco minutos con tampón 3 para alcalinizar el medio y se revelaron las membranas con 5-bromo-4-cloro-indolilfosfato (BCIP) y disodio-nitroazul tetrazolio (NBT) que provocaron la reacción cromática de la fosfatasa alcalina.

Tampón de transferencia:	Tampón NET (pH 7,4)	Buffer 3:
• Tris 25 mM	• Na Cl 0,15 M	• Tris-HCl pH 9,5 0,1 M
• Glicina 190 mM	• EDTA 5 mM	• NaCl 0,1 M
• Metanol 20%	• Tris 50 mM	• MgCl ₂ 0,05 M

2.7.2 Inmunotransferencia a nivel colonial (colony-blot)

Las colonias pertenecientes a una genoteca en pLA2917 se sembraron ordenadamente en placas de LB suplementadas con tetraciclina (20µg/ml). Tras una incubación de 5 horas a 37°C, se mantuvieron 30 minutos a 4°C para facilitar la posterior transferencia. Ésta se llevó a cabo por simple contacto (1 minuto) entre las placas y membranas de nitrocelulosa de 85mm de diámetro y 0.45µm de tamaño de poro (Millipore). Una vez transferidas las colonias, se secaron los filtros durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se bloquearon con TBS (50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl) 1% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. De forma secuencial, se incubaron a temperatura ambiente en el anticuerpo específico (dilución 1:1000 en TBS, 0.5% Tween-20, 1% BSA) y en antirabbit conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1:1000 en TBS, 0.5% Tween-20, 1% BSA). Tras cada incubación se efectuaron lavados con TBS 0.5% Tween-20. Para proceder al revelado, se realizaron tres lavados con TBS y tres con buffer 3 (0.1M Tris-HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl, 50mM MgCl₂) para alcalinizar el medio. La reacción cromática de la fosfatasa alcalina se produjo por adición de los substratos NBT y X-fosfato.

2.8 Obtención de suero no-inmune

Para la obtención de suero no-inmune, se utilizaron también conejos hembra *NewZealand* (aproximadamente 1,5 Kg de peso, Isoquimem) no inmunizados. Se extrajeron 20ml de sangre de la vena marginal y se procedió como en la obtención de suero inmune, es decir, la sangre fue incubada durante 1 hora a 37°C, se mantuvo durante 16-18 horas a 4°C y se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 20 minutos para eliminar la fracción celular. El sobrenadante obtenido fue utilizado como suero no-inmune.

2.8.1 Ensayos de sensibilidad al suero no-inmune

Para determinar la sensibilidad al suero no-inmune se procedió tal y como se describe en Merino *et al.*, 1992. Cultivos bacterianos en fase exponencial fueron centrifugados y los sedimentos fueron resuspendidos en una solución al 90% de suero no inmune filtrado en PBS. La suspensión, que contenía, aproximadamente, 10^9 células, se incubó a 37°C en agitación durante 3 horas y se realizaron, cada 30 minutos, recuentos de bacterias viables. Como controles, que también fueron contados en los mismos intervalos de tiempo, se utilizó una suspensión bacteriana no incubada en suero no-inmune y una suspensión bacteriana en suero no-inmune inactivado por calor (que había sido previamente tratado durante 30 minutos a 56°C). Los resultados se expresaron como el porcentaje bacterias viables supervivientes tras los distintos tiempos de incubación respecto a las bacterias viables iniciales.

Con finalidad de estudio, o cribado, de gran cantidad de cepas bacterianas fueron utilizadas placas de microtitulación según el ensayo descrito por Vukajlovich, 1986.

2.9 Adherencia a células uroepiteliales (UEC)

La determinación de la adherencia de cepas de *K. pneumoniae* a células uroepiteliales se realizó tal y como está descrito en Falkowski *et al.*, 1986, y Merino *et al.*, 1997. Se incubaron muestras que contenían bacterias y UEC, en una proporción de 100:1, durante 1 hora a 37°C. Las muestras fueron filtradas con vacío a través de filtros con poro de 5 μ m y los filtros fueron solubilizados para lisar las células uroepiteliales. Las bacterias adheridas fueron contadas por determinación de viables en placa. En algunos casos la adherencia fue medida por visualización directa de los filtros teñidos

por gram al microscopio óptico ($\times 10000$ aumentos). En estos casos, se examinaban un mínimo de 40 células uroepiteliales.

2.10 Infección del tracto urinario en ratas

Los experimentos de infección del tracto urinario en ratas se realizaron según Camprubí *et al.*, 1993. Las bacterias fueron cultivadas en placas de LB-agar, se dejaron crecer durante 16-18 horas y fueron resuspendidas en PBS, hasta una concentración de aproximadamente 10^9 ufc/ml. En cada experimento fueron utilizadas 12 hembras de rata Wistar, de la cepa CFHB (peso 200-250 g, suministradas por Interfauna, UK), 10 de las cuales fueron infectadas y 2 utilizadas como control. La infección del tracto urinario se provocó, previo vaciado de la orina de la vejiga por leve presión en el abdomen, mediante inoculación, a través de la uretra, de 1 ml de la suspensión bacteriana. En el caso de las ratas control, se inoculaba una misma cantidad de PBS estéril. A los cinco días los animales fueron sacrificados y los órganos del tracto urinario, riñones y vejiga, fueron lavados y homogenizados. Fueron determinadas las bacterias viables en órgano homogenizado y en orina y los resultados se expresaron como el \log_{10} de ufc por g de órgano o por ml de orina, según el caso. Además, se indicaba el porcentaje de ratas infectadas, es decir, aquellas en las que los cultivos para contar las células viables fueron positivos.

2.11 Dosis letal $_{50}$

La dosis letal $_{50}$ (DL $_{50}$) fue calculada según el método de Reed y Muench, 1938, e indicó la cantidad mínima de bacterias necesarias para matar a la mitad de la población animal en estudio. El estudio se realizó con ratones hembra tipo Swiss-albino de entre 5 y 7 semanas. Los animales eran inyectados con 0,25 ml de solución que contenía 5×10^9 células viables por vía intraperitoneal y se controló la mortalidad durante más de una semana.

2.12 Análisis de resistencia a antibióticos

Los análisis de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los diversos antimicrobianos frente a distintas cepas fueron realizados por el doctor L. Martínez-Martínez, Profesor Titular del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla. Los datos fueron obtenidos mediante la utilización de tiras de Etest con diferentes agentes antimicrobianos en medio Mueller-Hinton agar. La placa era

incubada a 35°C en atmósfera aerobia y, al cabo de 20-22 horas, se observaba el halo de inhibición de crecimiento bacteriano provocado por la difusión del antibiótico desde la tira a través del agar.

Los cálculos de las CMI de la polimixina y otros detergentes frente a las células se realizaron en microplacas estériles U-form de 96 pocillos y en cada columna de la placa se estudió una cepa bacteriana. En cada pocillo se añadieron 200 µl de medio LB con la concentración deseada de antibiótico (utilizando el pocillo inicial de cada columna como control positivo, sin antibiótico). Seguidamente, se añadió a cada pocillo 2 µl de crecimiento bacteriano de la bacteria a estudiar en fase exponencial, con aproximadamente $1-2 \times 10^6$ ufc/ml. El pocillo final de cada columna se utilizó como control negativo, es decir, no se añadieron los 2 µl de crecimiento bacteriano. La placa fue agitada suavemente e incubada durante 16-18 horas a 37°C. La determinación del crecimiento se realizó por lectura de la DO_{600nm} , aunque también se anotó el primer pocillo en el que no había crecimiento bacteriano a simple vista (este pocillo permitía determinar de forma sencilla la concentración mínima de antibiótico que inhibía el crecimiento).

2.13 Técnicas de genética molecular

2.13.1 Aislamiento de ADN genómico

Se utilizaron dos métodos de aislamiento de ADN en función de la cantidad y la pureza requeridas. La obtención de gran cantidad de ADN genómico se llevó a cabo según el método descrito por Marmur (Marmur, 1961) que se basa en una lisis celular con SDS y una posterior precipitación con perclorato sódico 5M. Si se requería un material de elevada pureza, se utilizó el kit de Invitrogen para aislamiento de DNA total (*Easy chromosomal DNA extraction kit*), siguiendo el procedimiento indicado en el propio kit.

2.13.2 Aislamiento de ADN plasmídico

En este caso, también fueron utilizados sistemas diferentes de extracción según el número de copias del plásmido, la cepa portadora de dicho plásmido y la pureza requerida para los procedimientos posteriores. Así, la obtención de plásmidos de bajo número de copias o con finalidad de muestreo se realizó según el método basado en la lisis alcalina de Birnboim y Doly, 1979, descrito por Maniatis (Maniatis *et al.*, 1982) y con las modificaciones añadidas por Martínez y de la Cruz, 1988. Para realizar

extracciones de mayor pureza, y siempre que se realizaran a partir de *Escherichia coli*, se utilizaron columnas de purificación de ADN plasmídico: *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham Biosciences), en el caso de plásmidos de medio o alto número de copias; y *Qiagen plasmid midi-prep preparations*, cuando los plásmidos eran de un número bajo de copias o queríamos obtener una gran cantidad de estos. En ambos casos se siguieron las recomendaciones de la casa comercial.

2.13.3 Purificación del ADN por extracción fenólica

La fenolización del ADN permite extraer las proteínas que contaminan las preparaciones de ADN. Para ello, se resuspendió el ADN en tampón TE (10mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) y se añadió un volumen igual de fenol equilibrado. Después de agitar suavemente para obtener un emulsionado, se centrifugó brevemente para separar las dos fases. Se recuperó la fase superior (acuosa) y se le adicionó nuevamente un volumen igual de fenol:cloroformo (cloroformo:isoamilalcohol 1:24), se agitó y centrifugó igual que en el paso anterior. Con la fase acuosa obtenida se repitió el mismo proceso con cloroformo. Una vez recuperada la última fase acuosa se precipitó el ADN.

2.13.4 Precipitación del ADN

La precipitación de ADN se llevó a cabo mediante el método descrito por Maniatis *et al.*, 1982. Este método consiste en añadir acetato sódico en una proporción 1:10 respecto al volumen total en el que se encontraba el ADN. Seguidamente se agregó etanol 98% frío 2:1 respecto al volumen final obtenido en el paso anterior. Esta mezcla se mantuvo a -20°C durante 2 horas y se centrifugó a $10000 \times g$ durante 15 minutos. Se realizaron dos lavados seguidos con etanol 70% frío, centrifugando durante 10 minutos y extrayendo el sobrenadante entre cada uno de ellos, y se secó la muestra en el *Speed-Vac* (Savant).

2.13.5 Electroforesis del ADN en geles de agarosa

Se utilizaron concentraciones de agarosa entre 0,5% a 2%, según el tamaño de los fragmentos a separar (Maniatis *et al.*, 1982). La agarosa se gelificó en tampón TAE $\times 1$ (TAE $\times 50$: Tris 242 g/l, EDTA 0,05M pH 8 100 ml/l, ácido acético glacial 57,1 ml/l). Para visualizar el ADN, se añadió bromuro de etidio (agente intercalante) al gel, a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Las muestras de ADN se mezclaron para su carga en el gel, en una proporción 1/5 del volumen total, con tampón de muestras $\times 6$ (sacarosa 40%, azul de bromofenol 0,25%). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales

Mini de Ecogen aplicando voltajes de entre 5 y 10 V/cm (Lewis, 1986). Los geles se observaron y/o fotografiaron en un transiluminador de luz ultravioleta ($\lambda=302\text{nm}$; *Image Master VDS* de Pharmacia Biotech).

2.13.6 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

La purificación de fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante el sistema *QIAEX* (Qiagen) según el protocolo indicado en el kit.

En algunas ocasiones (obtención de fragmentos de cromosómico para construcción de genotecas), los fragmentos fueron purificados a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión (*NuSieve*, FMC Bio Products). Las bandas de interés debían contener un mínimo de 0.2 μg de ADN (Zupacnic *et al.*, 1988). El punto de fusión de la agarosa utilizada está comprendido entre 65°C-70°C, y se mantiene líquida a temperaturas superiores a 30°C. Por este motivo, el montaje y la electroforesis se realizaron en una cámara fría. Una vez realizada la electroforesis, se recortaron las bandas de interés y se fundieron a 65°C. Posteriormente se fenolizó y precipitó el ADN.

2.13.7 Cuantificación del ADN

La cuantificación del DNA se realizó gracias a la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio al intercalarse entre las bases de la doble hélice de DNA. En un mismo gel de agarosa (0.5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio) se cargaron distintas cantidades del DNA a cuantificar y 1 μg de DNA del fago λ digerido con la endonucleasa *HindIII*. Se cuantificó la concentración de DNA por comparación entre la intensidad de las bandas de las muestras respecto a las del patrón.

2.13.8 Procesamiento enzimático del ADN

2.13.8.1 Restricciones

Para la digestión enzimática del ADN se utilizaron diferentes enzimas de restricción suministradas mayoritariamente por Amersham Biosciences, según las condiciones indicadas por la casa comercial en cada caso. Por regla general se diluyó la cantidad de ADN a digerir en agua desionizada y se mezcló con la enzima correspondiente y el tampón adecuado (suministrado junto por el proveedor junto con la enzima). Después, se incubó durante 2 horas a 37°C.

2.13.8.2 Defosforilación

Con el fin de evitar la formación de religados espontáneos de los vectores utilizados en algunos experimentos de clonación y subclonación, se procedió a la eliminación de los grupos fosfato terminales mediante tratamiento con fosfatasa alcalina. Tanto la enzima como el tampón necesario para la reacción fueron suministrados por Amersham Biosciences. Las condiciones de defosforilación fueron las descritas por Sambrook (Sambrook, 1989), con alguna pequeña variación como la extensión del tratamiento a una hora y media, adicionando nueva enzima cada 30 minutos.

2.13.8.3 Ligación

Las reacciones de ligación se realizaron en una relación molar 3:1 (inserto: vector). En las ligaciones entre moléculas con extremos cohesivos, se mezclaron 0.01-0.1 µg de ADN total (inserto y vector) diluidos en agua con una unidad de enzima, tampón y agua hasta un volumen final de 20 µl. Si las ligaciones se daban entre moléculas de extremos no protuberantes, o si el vector utilizado era el cósmido pLA2917, se aumentó la cantidad de ADN y de enzima. Las incubaciones se realizaron a 15°C durante toda la noche. La enzima utilizada, T4 ADN-ligasa fue suministrada, junto con el tampón de ligación, por Invitrogen.

2.13.8.4 Obtención de extremos romos

Para obtener extremos romos a partir de fragmentos de ADN con extremos 5' protuberantes se utilizó la enzima *Klenow* polimerasa suministrada por Boehringer Mannheim, según las recomendaciones hechas por la casa comercial.

2.13.9 Técnicas de transferencia del ADN

Para la transferencia horizontal de ADN entre microorganismos se utilizaron dos técnicas: la electroporación, que es una técnica de transformación por la cuál se introduce el ADN desnudo en la célula bacteriana mediante la aplicación de un voltaje determinado; y la conjugación, que es una técnica de transferencia mediada por células bacterianas.

2.13.9.1 Transformación por electroporación

Las condiciones de preparación de las células bacterianas para la electrotransformación fueron las descritas por Dower *et al.*, 1988. Estas cepas fueron

electroporadas con 0,3-0,4 µg de ADN. Las condiciones de electroporación fueron la aplicación de un voltaje de 2 kV, con una resistencia de 129 Ω durante 5 milisegundos. El aparato utilizado fue un *BTX Electro Cell Manipulator 600* con cubetas *BTX* de 2 mm. Seguidamente, por adición de 1 ml de medio LB, se recuperaron las células de la cubeta y se incubaron 1 hora a la temperatura requerida por la cepa receptora para facilitar la expresión fenotípica. Transcurrido este tiempo, se sembraron en placas preparadas para la selección de los transformantes.

2.13.9.2 Conjugación en medio sólido

Se mezclaron, en placa de LB, crecimientos en fase estacionaria de la cepa donadora y de la receptora en diferentes proporciones (generalmente se utilizó una proporción 1:5). También se utilizó una cepa facilitadora de la conjugación: HB101 + pK2073, en una proporción 1:1:5 (donadora : facilitadora : receptora). La placa se incubó a 30°C durante 5-6 horas, o toda la noche si se requería aumentar la eficiencia de la conjugación. Posteriormente, se recogió el resultado de la conjugación con 1ml de LB y se sembraron diversas diluciones en placas preparadas para la selección de los transformantes que fueron incubadas a la temperatura requerida por la cepa receptora.

2.13.10 Construcción de una librería genómica

Para la construcción de genotecas fue necesaria la digestión del ADN cromosómico de la cepa bacteriana de la cual se iba a obtener dicha librería con una enzima de restricción de frecuencia de corte elevada. En nuestro caso se escogió la enzima *Sau3A* que tiene una diana de restricción de 4 pares de bases (y por tanto una frecuencia de corte elevada) y genera extremos cohesivos compatibles con los generados por las enzimas *BamHI*, *BglII*, *MboI* y *XhoI*. El ADN genómico se digirió parcialmente con *Sau3A*. La digestión parcial se consiguió diluyendo de manera seriada la cantidad de enzima de restricción añadida en cada reacción, manteniendo la cantidad de ADN genómico. Las restricciones se analizaron en geles de agarosa y se seleccionaron aquellas digestiones que mayoritariamente producían fragmentos de entre 15 y 20 Kb. El producto de estas digestiones se ligó con el cósmido pLA2917 digerido con *BglII*. Posteriormente se procedió al empaquetamiento *in vitro* de las ligaciones en el fago λ y a la infección en la cepa de *E. coli* DH5α, según el protocolo suministrado por la casa comercial suministradora del kit de empaquetamiento (*Gigapack III Gold Packaging Extract* de Stratagene).

2.13.11 Reacción en cadena de la polimerasa

2.13.11.1 Amplificación de fragmentos de ADN

Para amplificar fragmentos de ADN se utilizó generalmente la *Taq DNA polymerase* suministrada por Invitrogen, y se usó el kit acompañante así como las indicaciones del mismo: 5 μ l del tampón para PCR ($\times 10$), 1 μ l de una mezcla de nucleótidos 10 mM, 1,5 μ l de $MgCl_2$ 50 mM, 0,5 μ M de cada cebador, 2,5 U de enzima Taq polimerasa y el ADN que queríamos amplificar disuelto en agua desionizada, hasta conseguir un volumen final de reacción de 50 μ l. La concentración de $MgCl_2$ se optimizó en algunas ocasiones.

La PCR se realizó en un termociclador *GeneAmp PCR System 2400* de Perkin Elmer. Se llevó a cabo un ciclo inicial de desnaturalización de 94°C durante 3 minutos, para posteriormente realizar 25-30 ciclos de: 94°C - 45 segundos, temperatura de hibridación ADN/cebador - 30 segundos, 72°C - tiempo de elongación (1kb \approx 1 minuto). Finalmente se realizó un ciclo de 72°C - 10 minutos para completar la amplificación del fragmento.

También, de manera alternativa, se usó la *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen), que por indicación del fabricante necesita $MgSO_4$ en lugar de $MgCl_2$, además de funcionar según un ciclo inicial de desnaturalización de 94°C durante 30 segundos y 25-30 ciclos de: 94°C - 30 segundos, temperatura de hibridación ADN/cebador - 30 segundos, 68°C - tiempo de elongación (1kb = 1 minuto). El uso de esta enzima era aconsejada para aumentar la fidelidad de la amplificación y para la amplificación de fragmentos mayores de 4 Kb.

2.13.11.2 Secuenciación de fragmentos de ADN

Para la secuenciación de fragmentos de ADN, ya fuesen vectores o bandas amplificadas mediante PCR, se utilizó el protocolo descrito en el sistema *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits* de Perkin Elmer, que se basa en el método de los dideoxinucleótidos terminales de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), mezclando 2 μ l del kit con 0,25 μ g de ADN y 3,2 pmoles del cebador en un volumen final de reacción de 10 μ l.

Se realizó la secuenciación en un termociclador *GeneAmp PCR System 2400* de Perkin Elmer. Se llevó a cabo un ciclo inicial de 96°C durante 4 minutos, 25 ciclos de: 96°C - 30 segundos, temperatura hibridación ADN/cebador - 15 segundos y 60°C - 4

minutos. La temperatura de hibridación ADN/cebador se determinó generalmente según la siguiente fórmula: $[2 \times (A+T)] + [(G+C) \times 4]$

La obtención de la secuencia correspondiente, una vez precipitada con etanol la reacción anterior, fue llevada a cabo por los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona en un secuenciador *ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer*. El cromatograma se visualizó a través del programa Chromas (versión 1.43).

2.13.11.3 Cebadores utilizados en este estudio

Los cebadores utilizados, tanto en la amplificación de fragmentos de ADN por PCR, como en la secuenciación, fueron diseñados en nuestro laboratorio utilizando el programa informático *GCG (Wisconsin Package Version 9.0, Genetic Computer Group, Madison, Wisconsin)* y sintetizados por Amersham Biosciences. La tabla siguiente resume los cebadores utilizados, la temperatura de hibridación a la que fueron utilizados y su localización.

Nombre Cebador	5' Composición 3'	Tª uso	Localización
Vector pLA2917 CSpLA	gactgggcggtttatgg	56°C	Diana <i>Bgl</i> III del vector
RpLA	ccatctgttcaatcatgca	58°C	Diana <i>Bgl</i> III del vector
Vector pGEMT-easy Sp6	tatttagtgacactatag	50°C	Lugar de clonación del vector
M13 for	tgtaaacgacggccagt	54°C	Lugar de clonación del vector
Vector pBCSK T3	aattaaccctcactaaaggg	56°C	Lugar de clonación del vector
Vector pBR328 pBR _{Pst} ew	gctagagtaagtagtt	44°C	Diana <i>Pst</i> I del vector
pBR _{Pst} cw	aacgacgagcgtgac	48°C	Diana <i>Pst</i> I del vector
CosKT4 (<i>wb_{KpO5}</i>)			
5M13R16	tacagatgaccatcggttc	56°C	<i>manC</i>
5M13R15	atgccgttgtagttcatc	56°C	<i>manB</i>
5M13R14	ataccgttcgggaaatggc	58°C	<i>manB</i>
5M13R13	atccgctccttgatgaac	54°C	<i>manB</i>
5M13R12	atccgctccttgatgaac	54°C	<i>manB</i>
5M13R10	tcagtaccccagaacagag	58°C	<i>wzm</i>
5M13R9	ttcgcccatgctgtaatg	58°C	<i>wzm</i>
5M13R8	cttcgaaattaatgtcgtg	56°C	<i>wzt</i>
5M13R7	ataatcagcacatcaggac	54°C	<i>wzt</i>
5M13R6	taacctgcaagctgatcc	54°C	<i>wzt</i>
5M13R5	tccattttctgcacgttc	54°C	<i>wbdD</i>
WbdD1	aaaatcaagcagaccagag	54°C	<i>wbdD</i>

Nombre Cebador	5' Composición 3'	Tª uso	Localización
5M13R4	cctttaagcacatcgacc	54°C	<i>wbdD</i>
5M13R3	ctcgtactttagccccttc	58°C	<i>wbdD</i>
WbdD2	tagcaatgtgtagcagcc	54°C	<i>wbdD</i>
5M13R2	gatgaaaacctcatgtcg	52°C	<i>mtfA</i>
5M13R1	accagggaataagatcg	54°C	<i>mtfA</i>
5M13F1	ccattacgggtattcagca	54°C	<i>mtfA</i>
5M13F2	ccgtattctgtctcttcc	54°C	<i>mtfA</i>
5M13F3	agctcatatagctggcg	54°C	<i>mtfA</i>
5T3F3	cgtaaagtgtcaatgtcc	54°C	<i>mtfA</i>
5T3F2	aaactggatcacgatgac	52°C	<i>mtfA</i>
5T3F1	aaccagacgcaaacgaac	54°C	<i>mtfA</i>
5T3R1	gcatggcaacccaaaaac	54°C	<i>mtfA</i>
4T3R1	taatcatgtgttcacgc	59,5°C	<i>mtfA</i>
4T3F1	taccattaacgggcatc	54°C	<i>mtfB</i>
4T3F2	tccgcctgtcaactatcc	58°C	<i>mtfB</i>
4T3F3	tcttgaagcgtgtcttg	52°C	<i>mtfB</i>
mtfB	attagatcggcaacgag	54°C	<i>mtfB</i>
4T3F4	ttgaaatgcctccacac	54°C	<i>mtfC</i>
mtfC1	cactcggatattgtgaaac	54°C	<i>mtfC</i>
4T3F5	tactacaaggctgcac	54°C	<i>mtfC</i>
4T3F6	gggacctgttcattaac	54°C	<i>mtfC</i>
mtfC2	tctcaaacgacgacgc	54°C	<i>mtfC</i>
Primers para la construcción de mutantes en <i>wb_{Kp05}</i>			
ABC ₀₄ .A	cgcgatcccaggaagacgccatttacgg	62°C	<i>wzm-wzt Kp₀₄</i>
ABC ₀₄ .B	tgtttaagtttagtggatgggtgtaaacgagccataacgcg	62°C	<i>wzm-wzt Kp₀₄</i>
ABC ₀₄ .C	cccactcactaaactaaacagtcgttaaacggaacaacaag	62°C	<i>wzm-wzt Kp₀₄</i>
ABC ₀₄ .D	cgcgatcccaggtcccacgcttacattc	62°C	<i>wzm-wzt Kp₀₄</i>
<i>wbdC₀₄</i> .A	cactcggatattgtgaaac	54°C	<i>wbdC Kp₀₄</i>
<i>wbdC₀₄</i> .B	tctcaaacgacgacgc	54°C	<i>wbdC Kp₀₄</i>
CosKT12 (<i>wb_{Kp012}</i>)			
KT10	atatgacgaaccacggcag	58°C	<i>rmlB</i>
KT6	aacgagtagcgttactcc	58°C	<i>rmlB</i>
KTW1	tccggatcgtgatgca	54°C	<i>rmlB</i>
KTW2	atccgtgactgctgtat	50°C	<i>rmlB</i>
KTW3	cagctgctgcctatcta	50°C	<i>rmlA</i>
KTW4	aggcactgtccatcgag	54°C	<i>rmlA</i>
KTW5	atggtgtcggcgggaag	50°C	<i>rmlA</i>
KTW6	cccggatgtggtggtg	54°C	<i>rmlD</i>
KTW7	aactttgcaaacaccatgctcc	50°C	<i>rmlD</i>
KT5	actgccacgtcaaacacctc	50°C	<i>rmlC</i>
KT4	gagtatgtccccgagg	56°C	<i>rmlC</i>
KT2.1	ggagacttgatgtagctc	54°C	<i>wbbL</i>
KT1	ctcatcataggctgcatc	54°C	<i>wbbL</i>
KTW9	aacaactattgtccatgcc	54°C	<i>wbbL</i>
KTW8	tgcgtataataagcaagcc	56°C	<i>wbbL</i>
KTW10	aacgctgctgttatctc	54°C	<i>wzm</i>
KTW11	ggaagggatttgctgatg	54°C	<i>wzm</i>
KTW14	tcagatacggccagttc	58°C	<i>wzt</i>
KTW15	accgctcttctgaaacttg	56°C	<i>wzt</i>
KTW16	tcgggcgattacctaatac	56°C	<i>wzt</i>
KT11	caactcggaaatagattc	50°C	<i>wbbB</i>
KTW17	ttatacccttgagatcgg	54°C	<i>wbbB</i>
KT9	ggaatcgtcttctacctg	54°C	<i>wbbB</i>
KT8	cctgaatcgaaatattcc	54°C	<i>wbbB</i>
KT7	tcgggaaatcctaccagac	58°C	<i>wbbB</i>
KTW12	ggctattegttctattg	54°C	<i>wbbB</i>
KTW13	gtctcaataatgctgttgc	54°C	<i>wbbB</i>
KTW18	catgaagacctacaggatg	56°C	<i>wbbB</i>

Nombre Cebador	5' Composición 3'	Tª uso	Localización
KT12	gccatttagcctcaagtac	56,4°C	<i>wbbB</i>
Primers para amplificar genes y realizar complementaciones			
Sm1	aacaatggcgagcgagaag	56,5°C	<i>wbbA Sm_{O4}</i>
Sm2	ggtgaaagcaagtcgaaag	56,5°C	<i>wbbA Sm_{O4}</i>
Sm3	ctgccgtgatcatacaggg	60°C	<i>wzm-wzt Sm_{O4}</i>
Sm4	ctctaaagggtaagccgg	60°C	<i>wzm-wzt Sm_{O4}</i>
Kp1	aacaactattgtccatgcc	54°C	<i>wzm-wzt Kp_{O12}</i>
Kp2	ggaatcgctctctactctg	54°C	<i>wzm-wzt Kp_{O12}</i>
Kp3	cgccagctggtgctgtctctgctggag	58°C	<i>wbbL Kp_{O12}</i>
Kp4	cgccagctgggcaactactgcgcaccac	58°C	<i>wbbL Kp_{O12}</i>
Kp5	cgccagctgtcggcgattacctaatac	56°C	<i>wbbB Kp_{O12}</i>
Kp6	cgccagctggccatttagcctcaagtac	56°C	<i>wbbB Kp_{O12}</i>
Kp7	cgccagctgttggtaccatattcgtcc	56°C	<i>wzm-wzt Kp_{O12}</i>
Primers para la construcción de mutantes en <i>wb_{KpO12}</i>			
ABC _{O12} .A	cgcgatcctggtggtgctcagtgggc	56°C	<i>wzm-wzt Kp_{O12}</i>
ABC _{O12} .B	cccatccactaaacatgatgaaagtgttgatgagg	56°C	<i>wzm-wzt Kp_{O12}</i>
ABC _{O12} .C	tgtttaagtttagtggatggcggttaaaaatcattacaaatg	56°C	<i>wzm-wzt Kp_{O12}</i>
ABC _{O12} .D	cgcgatccacaatcccagcaactgg	56°C	<i>wzm-wzt Kp_{O12}</i>
<i>wbbB</i> _{O12} .A	cgcgatccttgatgatgctgctgctgc	60°C	<i>wbbB Kp_{O12}</i>
<i>wbbB</i> _{O12} .B	cccatccactaaacttaaacacctctgaacggatattggag	60°C	<i>wbbB Kp_{O12}</i>
<i>wbbB</i> _{O12} .C	tgtttaagtttagtggatggcggaattggggattatctc	60°C	<i>wbbB Kp_{O12}</i>
<i>wbbB</i> _{O12} .D	cgcgatcccggagcactaaaagaaagcc	60°C	<i>wbbB Kp_{O12}</i>
pGEMT _{Nuk1/KOR} (agrupación <i>waa_{Kp52145}</i>)			
NUK1F1	tatgtcgaagtgtgccg	56°C	<i>orf3</i>
NUK1F2	ttttacgcaagtatgcc	52°C	<i>orf4</i>
NUK1F3	caattatccagcttgcac	55°C	<i>orf4</i>
NUK1F4	aggctttccgcaaaaacgc	58°C	<i>orf4</i>
KORF4	tacagggaaacgtcagaagc	58°C	<i>orf5</i>
KORF3	atgccttgcacacattac	55°C	<i>orf5</i>
KORF2	taaatccccttcatcctc	52°C	<i>orf6</i>
KORF1	cccttgatttcattgaagc	54°C	<i>orf6</i>
NUK1	gtttaaatcggcatttagtcc	56°C	<i>orf2</i>
KOR	cttattgaatacagcgagc	56°C	<i>orfY</i>
S ₇	tgcaggcctgaatgaattat	56°C	<i>hldD</i>
Nih5.A5	ctaacagttcgttagctc	56°C	<i>orf2</i>
Nuk5	acgcggttggtttgattt	54°C	<i>orf7</i>
Nuk8	ggcgttttccagattaac	54°C	<i>orf10</i>
Nuk7	agatctggtggaagagttt	54°C	<i>orf9</i>
Nuk10	gataaacgaccactctttg	54°C	<i>coaD</i>
WaaLOR	ccgtatcactatcatcctcc	58,4°C	<i>orf4 Kp C3</i>
WaaLOF	ttttgctgttaccacc	58,4°C	<i>orf6 Kp C3</i>
Primers para la construcción de mutantes en <i>waa_{Kp52145}</i>			
ORF2.A	cgcgatccaaatcccgttctgtacgcc	60°C	<i>orf2</i>
ORF2.B	cccatecactaaacttaaacacatcatgtcgccacc	60°C	<i>orf2</i>
ORF2.C	tgtttaagtttagtggatgggttagcggaaaaaccgagcac	60°C	<i>orf2</i>
ORF2.D	cgcgatccgcagaaacaccagatagggc	60°C	<i>orf2</i>
ORF3.A	cgcgatccgcgcttttaacctgtctac	60°C	<i>orf3</i>
ORF3.B	cccatecactaaacttaaacacgatcaatacccgatcc	60°C	<i>orf3</i>
ORF3.C	tgtttaagtttagtggatgggcacacttaatatctccgacc	60°C	<i>orf3</i>
ORF3.D	cgcgatccgctccatgaccttttgac	60°C	<i>orf3</i>
ORF4.A	cgcgatccagcctgtttacaaccgcc	58°C	<i>orf4</i>
ORF4.B	cccatecactaaacttaaacattcgacaccaccatttttc	58°C	<i>orf4</i>
ORF4.C	tgtttaagtttagtggatgggactatcagcgaattctggatg	58°C	<i>orf4</i>
ORF4.D	cgcgatccggcctgtaatccgcttaatg	58°C	<i>orf4</i>
ORF5.A	cgcgcgccgcgatattgcaggcaaaaggcc	62°C	<i>orf5</i>
ORF5.B	cccatecactaaacttaaacaaagcaaccggcaaggtaag	62°C	<i>orf5</i>
ORF5.C	tgtttaagtttagtggatgggatgagaacctagtgacaag	62°C	<i>orf5</i>
ORF5.D	cgcgcgccgcgatattgacctgggaacgac	62°C	<i>orf5</i>

Nombre Cebador	5' Composición 3'	Tª uso	Localización
ORF6.A	cgcgccccgcgaccgctatcagggtttacg	62°C	<i>orf6</i>
ORF6.B	cccatccactaaacttaaacactgagtagaggtcgttgc	62°C	<i>orf6</i>
ORF6.C	tgtttaagtttagtgatgggaaacgccttctcagcttc	62°C	<i>orf6</i>
ORF6.D	cgcgccccgcggtatcagggtgattgctcg	62°C	<i>orf6</i>
ORFY.A	gaagatctcacgccagcatttaagaac	58°C	<i>orfY</i>
ORFY.B	cccatccactaaacttaaacaaacgtcctcaggccatac	58°C	<i>orfY</i>
ORFY.C	tgtttaagtttagtgatgggtaccagcgaaatgctaac	58°C	<i>orfY</i>
ORFY.D	gaagatctcactatttggcccagcac	58°C	<i>orfY</i>
ORF7.A	cgcagatctcacctgatacccgtattccac	64°C	<i>orf7</i>
ORF7.B	cccatccactaaacttaaacacagcttaatgaccaggatccg	64°C	<i>orf7</i>
ORF7.C	tgtttaagtttagtgatggggctatcaacaccaacaccgac	64°C	<i>orf7</i>
ORF7.D	cgcagatctcgtggtatcaatggcgttg	64°C	<i>orf7</i>
ORF8.A	cgcggatccccaccaacagcacaacc	58°C	<i>orf8</i>
ORF8.B	cccatccactaaacttaaacagacaaccgttctgcgcc	58°C	<i>orf8</i>
ORF8.C	tgtttaagtttagtgatgggagcagcagactctcaacc	58°C	<i>orf8</i>
ORF8.D	cgcggatccgcgaccgactgaaatcag	58°C	<i>orf8</i>
ORF9.A	cgcggatccagcgcgagattatcgaag	56°C	<i>orf9</i>
ORF9.B	cccatccactaaacttaaacagggtaaaccgtcaatcac	56°C	<i>orf9</i>
ORF9.C	tgtttaagtttagtgatgggtgacagcagtagcctcag	56°C	<i>orf9</i>
ORF9.D	cgcggatcctatgcgacaccgactcag	56°C	<i>orf9</i>
ORF10.A	cgcggatccccggacgggtgactacctgat	63,6°C	<i>orf10</i>
ORF10.B	cccatccactaaacttaaacagtagacggcagccacgatgct	63,6°C	<i>orf10</i>
ORF10.C	tgtttaagtttagtgatgggttccgttactctggcgcctg	63,6°C	<i>orf10</i>
ORF10.D	cgcggatcctggcagaccagcgggatct	63,6°C	<i>orf10</i>
ORF12.A	cgcggatcctgaagaacaatcatcctccag	58,3°C	<i>orf12</i>
ORF12.B	cccatccactaaacttaaacagatcatcaccaggaagc	58,3°C	<i>orf12</i>
ORF12.C	tgtttaagtttagtgatgggtcggagaagagtagcatcatgag	58,3°C	<i>orf12</i>
ORF12.D	cgcggatccttattgccgtcagtgccag	58,3°C	<i>orf12</i>

2.13.12 Técnicas de mutagénesis

2.13.12.1 Mutagénesis dirigida por doble recombinación

Para generar mutaciones cromosómicas dirigidas que mantuvieran la pauta de lectura dentro de una agrupación de genes, y minimizar así los posibles efectos polares que la mutación pudiera provocar en la expresión del resto de los genes, se utilizó el sistema basado en el plásmido pKO3 descrito por Link *et al.*, 1997. Básicamente, se utilizaron dos parejas de cebadores para sintetizar *in vitro* una copia delecionada del gen a mutar, procurando, además, que la deleción mantuviera la pauta de lectura del gen. Una pareja de cebadores, que denominamos A y B, amplificaba la región inmediatamente anterior al gen y los 5-10 primeros tripletes completos de éste. Los cebadores C y D amplificaban la región inmediatamente posterior al gen y los 5-10 últimos tripletes de este. Además, los cebadores B y C fueron diseñados con una ‘cola’ de 21 pares de bases complementarias, que permitirían posteriormente amplificar el gen delecionado. Fueron realizadas dos PCRs asimétricas con los cebadores A-B y C-D, respectivamente. Los productos amplificados fueron utilizados como molde para una última PCR con los cebadores A y D, de tal forma que se generó un fragmento de PCR

con la región anterior al gen a mutar, varios tripletes iniciales del gen, una región de 21 pares de bases aleatorios (que mantenía la pauta de lectura), varios tripletes finales del gen y la región posterior del gen a mutar (fig 2.1). Esta construcción era clonada en el plásmido pKO3.

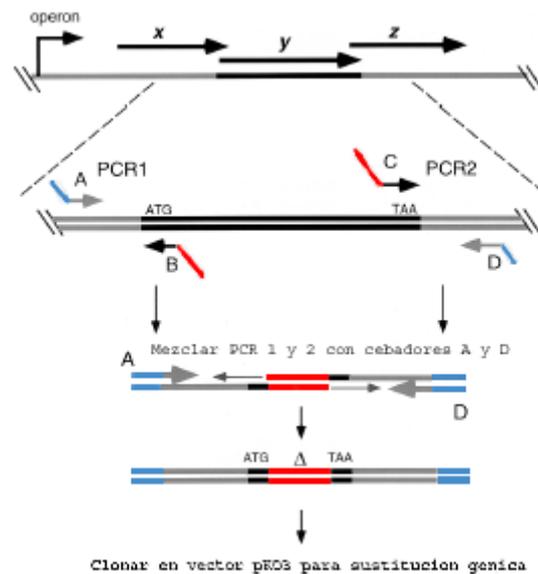


Fig. 2.1. Diseño de construcciones de delección en pauta. La línea superior representa una región del cromosoma donde los genes *x*, *y* y *z* forman un operón policistrónico. La segunda línea es una visión expandida del gen *y* y muestra las dos PCRs usadas para generar los fragmentos (PCR1 y PCR2) que formarán, una vez fusionados, una delección en pauta del gen *y*. Los cebadores B y C presentan 21 nucleótidos complementarios (líneas rojas) de tal forma que cuando los productos de las PCRs sean mezclados, las regiones complementarias hibridarán y en su zona 3' correspondiente a estos 21 nucleótidos, actuarán de cebadoras para una extensión 3' de la cadena complementaria. En la tercera línea, la molécula fusionada es amplificada por PCR mediante los cebadores A y D. Normalmente estos dos cebadores se diseñan con dianas de restricción en sus extremos 5' (líneas azules), para que así el producto final pueda ser digerido y clonado en pKO3. Link *et al.*, 1997.

Una vez clonada la construcción en pKO3, éste era transformado sobre la cepa a mutar. Tal y como se describe en Link *et al.*, 1997, se hacían crecer las células transformadas a temperatura no permisiva para el plásmido (42°C) en LB especial agar suplementado con cloramfenicol. Dado que el plásmido no se podía replicar a esta temperatura, las colonias que crecían debían haber integrado el plásmido en su cromosoma por recombinación homóloga. Posteriormente, estas colonias se hacían crecer en placas de LB especial agar suplementado con sacarosa al 5% a 30°C (Blomfield *et al.*, 1991) y, dado que pKO3 contenía el gen *sacB*, que es letal para la bacteria cuando crece en sacarosa, las cepas resistentes a la sacarosa (y a la vez

sensibles al cloramfenicol) habían eliminado el pKO3 integrado mediante una segunda recombinación homóloga. Tras esta segunda recombinación, en el cromosoma bacteriano quedaba una copia del gen, que podía ser la salvaje o la deleccionada (fig. 2.2). Esto último se determinaba mediante PCR, que nos permitía seleccionar los mutantes deleccionados. Además, normalmente la región deleccionada era secuenciada para comprobar que se mantuviera la pauta.

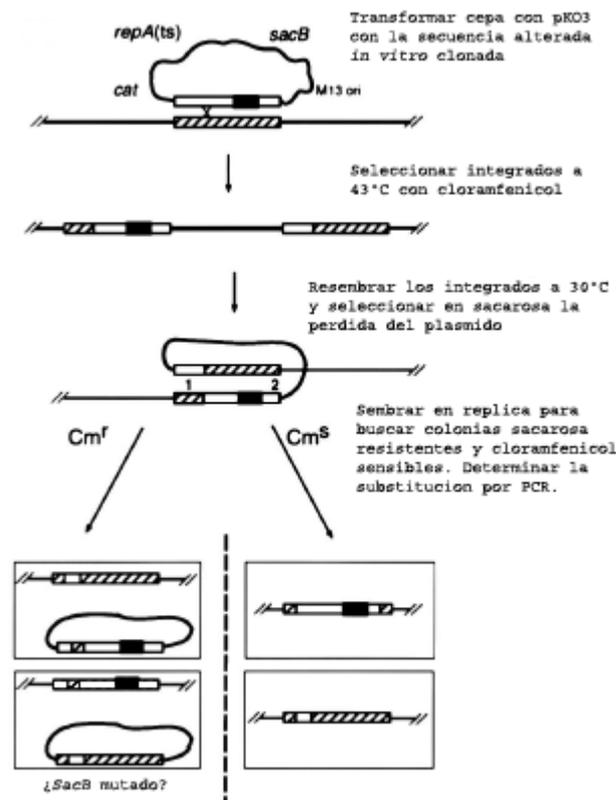


Fig. 2.2. Protocolo utilizado para sustituir secuencias salvajes en el cromosoma con secuencias alteradas *in vitro*. El vector con la secuencia alterada clonada es transformado en la cepa salvaje y se plaquea a la temperatura no permisiva para el plásmido (es termosensible, ts). Un evento de integración permitiría la replicación de las secuencias plasmídicas por el origen cromosómico. Una vez cultivadas las colonias a 30°C, el plásmido se escinde del cromosoma por los puntos de cruce 1 o 2, y el marcador contraseleccionable *SacB* sirve para seleccionar la pérdida de las secuencias del plásmido. En las colonias resistentes a la sacarosa se determina la resistencia al cloramfenicol picándolas en réplica en placas de LB y de LB suplementadas con cloramfenicol. La determinación de si la sustitución génica ha cambiado la secuencia salvaje por la alterada o ha mantenido la salvaje se acaba determinando por PCR. Los resultados del panel de la izquierda (“¿*SacB* mutado?”) se refieren a la pérdida de función del gen *SacB* por algún mecanismo desconocido, cosa que sucede en algunos casos. La línea delgada curvada representa las secuencias del vector de sustitución génica. La línea delgada recta representa el cromosoma de la cepa a mutar. Las cajas representan la secuencia homóloga clonada en el vector (vacía) y localizada en el cromosoma (rayada). La caja negra dentro de la secuencia homóloga clonada en el vector indica la deleción introducida *in vitro* a la secuencia. Link *et al.*, 1997.

2.13.12.2 Mutagénesis dirigida por recombinación en un punto

La obtención de mutantes por recombinación en un punto se realizó utilizando el vector suicida pFS100 según el protocolo descrito por Rubirés *et al.*, 1997. Este método se basa en clonar un fragmento interno del gen a mutar en el vector suicida pFS100 (Km^r), cuya replicación depende de la proteína λ pir. La construcción fue transformada en la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir), la cual fue utilizada para pasar el plásmido mediante conjugación a la cepa a mutar. Al seleccionar las bacterias con kanamicina, y dado que el plásmido no puede replicarse por no producir la cepa la proteína λ pir, las colonias resistentes lo eran por la integración del plásmido en el cromosoma mediante recombinación homóloga. Esta recombinación en un punto generaba dos copias truncadas del gen a mutar (fig. 2.3).

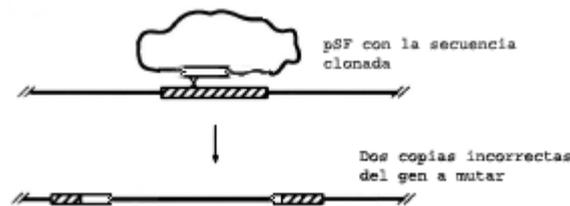


Fig. 2.3. Esquema de funcionamiento del sistema de recombinación en un punto. El vector con el fragmento interno del gen a mutar clonado es transformado en la cepa, que no produce la proteína λ pir. Al seleccionar las transformantes con kanamicina, tan sólo aquellas en las que el plásmido se haya integrado en el cromosoma podrán crecer. Al producirse esta integración por recombinación homóloga se generan dos copias incompletas del gen que queríamos mutar. La línea delgada curvada representa las secuencias del vector suicida pSF100. La línea delgada recta representa el cromosoma de la cepa a mutar. La caja vacía representa la secuencia homóloga del gen incompleto clonado en el vector y la rayada la secuencia del gen completo localizada en el cromosoma.

2.13.13 Software utilizado para el análisis de secuencias

Para el estudio y análisis de las diferentes secuencias obtenidas se utilizaron diferentes programas informáticos.

Para la detección de pautas abiertas de lectura, localización de dianas para enzimas de restricción, traducción de secuencias de ADN a proteína, detección de secuencias terminadoras y diseño de cebadores, se utilizaron indistintamente varios programas: *GCG (Wisconsin Package Version 9.0, Genetic Computer Group, Madison, Wisconsin)*, *Seqaid 3.81* (D. D. Rhoads y D. J. Roufa, Molecular Genetics Laboratory, Center for Basic Cancer Research, Kansas State University, 1991) o *Vector NTI 6.0* (InforMax, Inc.).

La búsqueda de secuencias de ADN y proteínas homólogas en las bases de datos GenBank, EMBL y *Protein Identification Resource* se realizó mediante el programa *BLAST* (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997). Las secuencias de aminoácidos también se compararon frente a bases de datos de Pirprot y Swiss-prot mediante el programa *FASTA* (Pearson y Lipman, 1988).

Los alineamientos entre secuencias se llevaron a cabo mediante el programa *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994) o *AlignX* (un componente de *Vector NTI 6.0*). Los perfiles de hidrofobicidad se calcularon de acuerdo al método de Kyte y Doolittle, 1982, gracias a los programas *PSORT* y *TMHMM* de ExPASy, que detectaban la localización celular de la proteína y sus posibles regiones transmembrana (Klein *et al.*, 1985), respectivamente. Con los programas *Prot Param* y *Prot Scale* de ExPASy se analizaron las principales características de las proteínas. La agrupación de las proteínas en familias según sus dominios conservados se llevó a cabo con la base de datos de familias proteicas *pFAM*, de Sanger Institute.

dotaba a la cepa DH5 α de la capacidad de producir antígeno O (fig. 3.1, A). Si la cepa era curada dejaba de producir antígeno O nuevamente. Por otro lado, no se observó ninguna diferencia significativa en cuanto a las proteínas de la membrana externa al realizar una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

El clon fue transferido a la cepa CLM4 (Marolda y Valvano, 1993), una cepa de *E. coli* con el conjunto de genes *wb* completamente deleccionado, y se observó que ésta era capaz de producir antígeno O5. El análisis por inmunotransferencia con antisuero específico contra el antígeno O5 de *K. pneumoniae*, indicó que, en todos los casos, CosKT4 confería la capacidad de producir este antígeno (fig. 3.1, B). Así pues, estos resultados sugerían que CosKT4 contenía toda la información genética necesaria para la producción del antígeno O5 de *K. pneumoniae*.

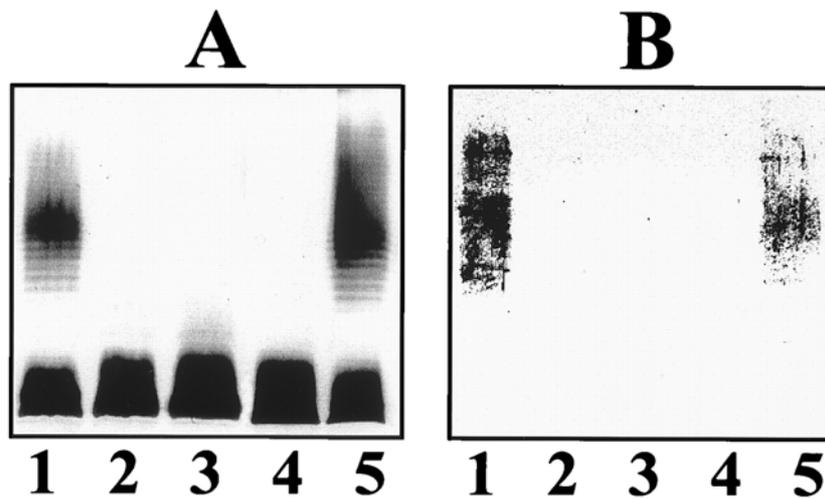


Fig. 3.1. (A) SDS-PAGE revelado mediante tinción con nitrato de plata del LPS de las cepas de *E. coli* a analizar. (B) Inmunotransferencia de estos mismos LPSs realizada con antisuero contra el antígeno O5 de *K. pneumoniae*. Las muestras de LPS se obtuvieron según el método de Darveau y Hancock, 1983. El antisuero se obtuvo tal y como está descrito en Material y Métodos, 2.7.1. Carriles: 1, DH5 α con CosKT4; 2, DH5 α ; 3, DH5 α con CosKT4 curada; 4, CLM4 (Δwb); 5, CLM4 con CosKT4.

3.3 Secuenciación del clon CosKT4

Mediante el uso de diversos enzimas de restricción y plásmidos, intentamos obtener un subclón que contuviera únicamente los genes responsables de la biosíntesis del antígeno O5 a partir de CosKT4, pero no nos fue posible. Por lo tanto, decidimos secuenciar el clon utilizando los cebadores CSpLA y RpLA (ver Material y Métodos 2.13.11.3), que flanquean la diana de restricción *Bgl*II, lugar donde se clonó el inserto, en el cósmido pLA2197. Una de las dos secuencias obtenidas mostró un elevado nivel de homología con el gen *hisIE*, cuyo producto está implicado en la biosíntesis de la

histidina, lo cual permitió iniciar la secuencia de la agrupación génica *wb* O5 mediante el diseño de cebadores que hibridaran en la región que separa la agrupación génica *his* y el final de la agrupación *wb*. Esta región se halla bastante conservada en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* que poseen conjuntos de genes *wb* involucrados en la síntesis de antígenos O homopolímeros de manosa (Sugiyama *et al.*, 1997). El resto de la secuencia se fue completando mediante el diseño de nuevos cebadores a partir de la secuencia que se iba obteniendo.

La secuencia permitió determinar un total de ocho pautas abiertas de lectura (*open reading frames*) completas (tabla 3.1) que se transcribían en la misma dirección. Delante de cada ORF se localizaron posibles secuencias de unión de ribosomas. Además, no fueron halladas secuencias similares a terminadores Rho-independientes entre las ocho ORFs. Esta característica, unida al solapamiento existente entre el codón de parada de la ORF5 y el de inicio de la ORF6, así como el corto espacio existente entre las ocho ORFs, parecía indicar que estas pautas abiertas de lectura formaban parte de una única unidad transcripcional. La última ORF, incompleta, era similar al gen *hisIE* de varias enterobacterias y no tenía relación con la agrupación génica *wb*_{O5}. Esta disposición, con el gen *hisIE* en dirección contraria al operón *wb*, es semejante a la hallada en otros conjuntos de genes *wb* descritos (Sugiyama *et al.*, 1997). La secuencia nucleotídica fue depositada en GenBank con el número de acceso AF189151.

Tabla 3.1. Agrupación génica *wb* de *K. pneumoniae* KT769 O5

Locus	Posición	% G+C	Proteína codificada (kDa)	pI ^b	GRAVY ^c
<i>manC</i> (ORF1)	1-1416	61,6	52,8	5,38	-0,273
<i>manB</i> (ORF2)	1436-2812	62,5	50,4	5,27	-0,236
<i>wzm</i> (ORF3)	2918-3607	46,3	26,0	9,17	+0,842
<i>wzt</i> (ORF4)	3607-4821	47,3	44,9	6,09	-0,172
<i>wbdD</i> (ORF5)	4821-6116	46,6	49,4	9,12	-0,310
<i>wbdA</i> (ORF6)	6100-9741	49,5	135,4	5,47	-0,124
<i>wbdB</i> (ORF7)	9809-10954	54,7	43,8	7,11	-0,212
<i>wbdC</i> (ORF8)	11255-12079	54,7	31,1	6,31	-0,247
<i>hisIE</i> (ORF9) ^a	12451-12731	ND ^d	ND	ND	ND

^a ORF truncada.

^b Punto isoeléctrico de la proteína calculado mediante ProtParam del servidor Expassy.

^c Hidrofobicidad de la proteína, según el método de Kyte y Doolittle, 1982.

^d ND, no determinado.

3.4 Análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas de las ORFs

Los productos de traducción de las ORFs halladas fueron sometidos a comparación frente a diferentes bases de datos de proteínas para localizar aquellas con

las cuales mostraran similitud. El análisis de las secuencias aminoacídicas mostró que los productos de ORF1 y ORF2 eran muy similares a dos enzimas involucradas en la síntesis de manosa (tabla 3.2). Así pues, *ORF1* y *ORF2* corresponderían a los genes *manC* y *manB*, que codifican para la GDP-manosa pirofosforilasa y para la fosfomanomutasa, respectivamente (Sugiyama *et al.*, 1994).

Tabla 3.2. Porcentajes de similitud e identidad de las secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas en las pautas de lectura ORF1 a ORF8 de la agrupación génica *wb* de *K. pneumoniae* KT769 comparadas con otras proteínas significativas.

Proteína	Nº de amino-ácidos	% Similitud ^a	% Identidad ^a	Número de acceso en Genbank
ORF1 (ManC)				
<i>K. pneumoniae</i> KT769 ManC	471			AF189151
<i>K. pneumoniae</i> O3 ManC	452	100	100	BAA28337
<i>E. coli</i> O9a ManC	471	99	99	BAA07745
ORF2 (ManB)				
<i>K. pneumoniae</i> KT769 ManB	458			AF189151
<i>E. coli</i> O9 ManB	460	99	98	I76771
<i>E. coli</i> O8 ManB	458	99	97	BAA28323
ORF3 (Wzm)				
<i>K. pneumoniae</i> KT769 Wzm	229			AF189151
<i>E. coli</i> O8 Wzm	264	98	96	BAA28324
<i>E. coli</i> O9a Wzm	261	81	66	BAA07747
ORF4 (Wzt)				
<i>K. pneumoniae</i> KT769 Wzt	404			AF189151
<i>E. coli</i> O8 Wzt	404	98	97	BAA28325
ORF5 (WbdD)				
<i>K. pneumoniae</i> KT769 WbdD	431			AF189151
<i>E. coli</i> O8	425	97	93	BAA28326
ORF6 (WbdA)				
<i>K. pneumoniae</i> KT769 WbdA	1213			AF189151
<i>E. coli</i> O8	704	98	95	BAA28328
ORF7 (WbdB)				
<i>K. pneumoniae</i> KT769 WbdB	381			AF189151
<i>E. coli</i> O9a WbdB	381	99	99	BAA07751
ORF8 (WbdC)				
<i>K. pneumoniae</i> KT769 WbdC	274			AF189151
<i>E. coli</i> O9a WbdC	274	99	96	BAA28289

^a Los porcentajes fueron obtenidos mediante comparaciones utilizando el programa Blast, en el servidor del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

ORF3 era similar a la proteína integral de membrana y ORF4 a la proteína de unión del ATP de un sistema de transporte tipo ABC-2 (*ATP Binding Cassette-2*). El

presunto componente de exporte del sistema (el producto de ORF3) mostró un nivel de similitud de aminoácidos del 96% con la proteína Wzm involucrada en el transporte del antígeno O hacia el periplasma en *E. coli* O8 (tabla 3.2). El putativo componente de unión del ATP presentaba una similitud del 98% con la proteína Wzt, que une el ATP en el sistema de transporte tipo ABC de *E. coli* O8, responsable del exporte de su antígeno O. Además, se realizaron análisis de hidrofobicidad para identificar los posibles dominios transmembrana (Klein *et al.*, 1985) del producto de ORF3 y se hallaron seis de estos dominios (entre los residuos aminoacídicos 29 y 51, 76 y 98, 112 y 134, 145 y 167, y 197 y 218), lo cual sugería que ORF3 codificaba realmente para una proteína integral de membrana. Por otro lado, se observó que ORF4 codificaba para la secuencia de aminoácidos GINGAGKS (residuos del 58 al 65), que correspondía a la caja A (*Walker A Box*), presente en las proteínas que unen ATP, y contenía también un motivo característico de las proteínas de la familia transportador-ABC entre los residuos 146 y 160 (YSSGMQVRLAFSVAT). Todos estos datos nos llevaron a denominar a ORF3 y ORF4 como *wzm* y *wzt*, respectivamente.

El producto de ORF5 era prácticamente idéntico a la proteína WbdD de *E. coli* O9a, con función desconocida, de manera que resolvimos darle el mismo nombre a la proteína para la cual codificaba ORF5. Los productos codificados por las ORFs 6, 7 y 8 mostraron elevadas similitudes con la manosil transferasa A, $\alpha\rightarrow 2$ -D-Manp1; la manosil transferasa B, $\alpha\rightarrow 3$ -D-Manp1; y la manosil transferasa C, $\alpha\rightarrow 3$ -D-Manp1 inicial, dependiente de *wecA*; implicadas en la síntesis del antígeno O8 y O9a de *E. coli* (Kido *et al.*, 1995). Los elevados niveles de similitud sugerían que las ORFs 6, 7 y 8 codificaban para los mismos enzimas en la biosíntesis del antígeno O5 de *K. pneumoniae*, por lo que los productos de estas ORFs fueron denominados WbdA, WbdB y WbdC, respectivamente.

Agrupación génica *wb* de *Klebsiella pneumoniae* O5

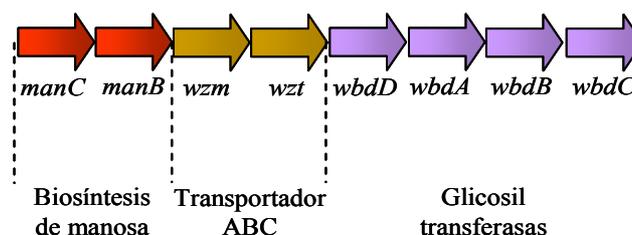


Fig. 3.2. Estructura de la agrupación génica *wb* de *Klebsiella pneumoniae* O5.

En resumen, las actividades enzimáticas propuestas mediante comparación de secuencias para la agrupación de genes *wb* secuenciada (fig. 3.2) coincidían con las requeridas para la biosíntesis del antígeno O5 del LPS de *K. pneumoniae*. Se observaban genes involucrados en la síntesis de la manosa que formará el homopolímero (*manC* y *manB*); genes que codifican para el sistema de exporte del antígeno O (*wzm* y *wzt*), tipo transportador ABC-dependiente, característico de antígenos homopoliméricos; y genes implicados en la transferencia de los residuos para la formación de la cadena (*wbdD*, *wbdA*, *wbdB* y *wbdC*).

3.5 Construcción y caracterización de los mutantes KT769-1 (*wbdC*) y KT769-6 (*wzm-wzt*)

Se construyeron dos mutantes diferentes de *K. pneumoniae* KT769. El mutante KT769-1 fue obtenido por recombinación en un punto utilizando el plásmido suicida pSF100 para generar dos copias incompletas del gen *wbdC*, mediante la inserción de un fragmento interno del gen (ver Material y Métodos 2.13.12.2). En el caso del mutante KT769-6, se realizó una mutagénesis dirigida por doble recombinación y se deleccionaron los genes *wzm* y *wzt*. En este caso, la mutación mantenía la pauta de lectura dentro de la agrupación de genes *wb*_{O5} para evitar los efectos polares que pudieran afectar a la expresión del resto de los genes del operón (ver Material y Métodos 2.13.12.1).

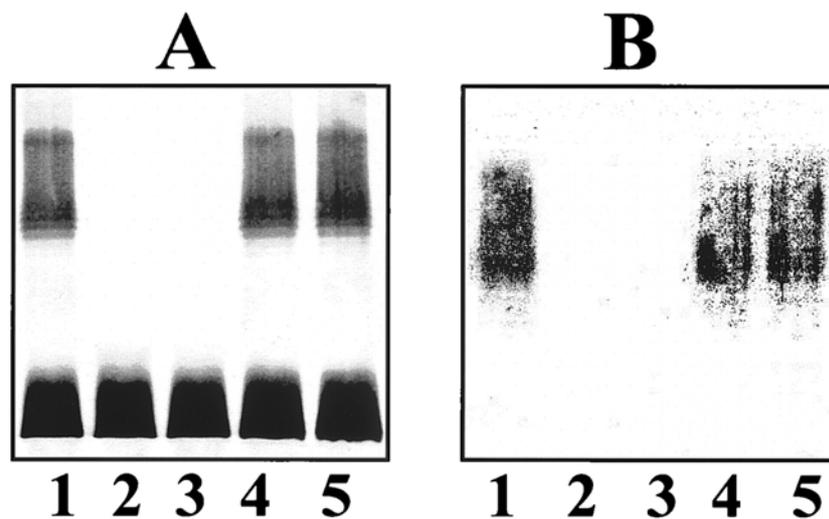


Fig. 3.3. (A) SDS-PAGE revelado mediante tinción con nitrato de plata del LPS de las cepas mutantes. (B) inmunotransferencia de estos mismos LPSs realizada con antisuero contra el antígeno O5 de *K. pneumoniae*. Carriles: 1, KT769 (O5:K57, salvaje); 2, KT769-1 (mutante *wbdC*); 3, KT769-6 (mutante *wzm-wzt*); 4, KT769-1C (mutante KT769-1 complementado con CosKT4); 5, KT769-6C (mutante KT769-6 complementado con CosKT4).

Se observó, mediante geles de LPS e inmunotransferencia con antisuero contra el antígeno O5 de *K. pneumoniae*, que ambos mutantes carecían del antígeno O5 (fig. 3.3). Los mutantes seguían manteniendo el polisacárido capsular, ya que reaccionaron con el antisuero contra K57, al igual que la cepa salvaje. Además, no se observó ninguna diferencia significativa en el perfil electroforético de las proteínas de la membrana externa entre los mutantes y la cepa parental. Cuando a los mutantes les era transferido el cósmido CosKT4, ambos recuperaban la capacidad de sintetizar el antígeno O5 del LPS.

3.6 Contribución del antígeno O5 del LPS a la patogenicidad de *K. pneumoniae* KT769

Mediante el uso de los mutantes obtenidos, que carecían del antígeno O5 del LPS, y de sus complementaciones con CosKT4, se realizaron diversos estudios para elucidar la contribución de esta molécula a la patogenicidad de *K. pneumoniae* KT769.

3.6.1 Implicación en la resistencia al suero no-inmune

En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos para determinar la sensibilidad al suero humano no-inmune. Las cepas mutantes, KT769-1 y KT769-6, eran sensibles a la actividad bactericida del suero, mientras que la cepa salvaje así como los mutantes complementados con CosKT4, KT769-1C y KT769-6C, mostraron resistencia a esta actividad (fig. 3.4). Dado que los mutantes presentaban un LPS que sólo carecía de antígeno O, quedaba demostrado que el antígeno O5 de *K. pneumoniae* es crítico para la resistencia a la acción del complemento.

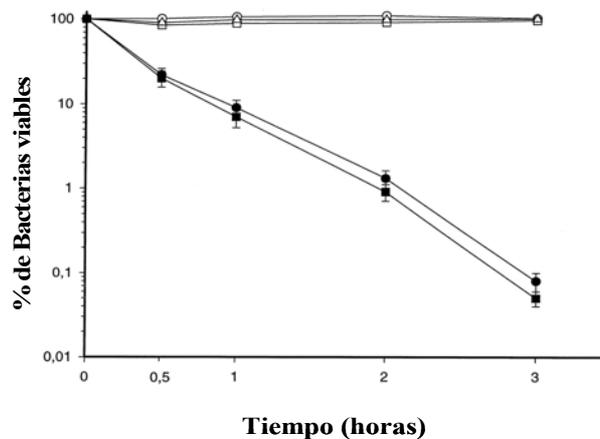


Fig. 3.4. Supervivencia de las cepas de *K. pneumoniae* en suero no-inmune. (Δ) KT769 (O5:K57, salvaje), (●) KT769-1 (mutante en *wbdC* por inserción, O5⁻), (■) KT 769-6 (mutante en *wzm-wzt* por delección, O5⁻), (○) KT769-1C (mutante KT769-1 complementado con CosKT4, O5⁺), (□) KT769-6C (mutante KT769-6 complementado con CosKT4, O5⁺). Los resultados son la media de un mínimo de tres experimentos independientes.

3.6.2 Efecto del antígeno O5 en las características físico-químicas de la superficie bacteriana

Los mutantes también mostraron un incremento en su carga superficial expresada en milivoltios, es decir una menor electronegatividad ($-40,6 \pm 0,4$ mV), en comparación con la cepa salvaje o los mutantes complementados con el cósmido CosKT4 ($-52,8 \pm 0,5$ mV). Este incremento podía explicarse por la pérdida de moléculas superficiales negativas, como las cadenas polisacáridicas del antígeno O5.

La variación en la carga superficial implicaba cambios en la hidrofobicidad superficial de los mutantes O5⁻. La hidrofobicidad en superficie de estos mutantes, medida por distintos métodos (tabla 3.3), era mayor en relación a las cepas O5⁺ (salvaje o mutantes complementados). De nuevo, el cambio podía explicarse por la pérdida en superficie de una molécula hidrófila como el antígeno O5.

Tabla 3.3. Hidrofobicidad superficial de las distintas cepas de *K. pneumoniae* medida por métodos diferentes.

Cepa	% Hidrofobicidad superficial ^a medida por:		
	HIC ^b	BATH ^c	
		Xileno	Hexadecano
KT769 (O5:K57, salvaje)	1,5 ± 0,3	74 ± 3,4	89 ± 5,1
KT769-1 (mutante <i>wbdC</i> , O5 ⁻)	28,4 ± 0,7	69 ± 2,8	78 ± 4,4
KT769-6 (mutante <i>wzm-wzt</i> , O5 ⁻)	29,3 ± 0,6	66 ± 2,6	74 ± 4,2
KT769-1C (KT769-1 complementado con CosKT4, O5 ⁺)	1,7 ± 0,2	75 ± 3,0	88 ± 4,9
KT769-6C (KT769-6 complementado con CosKT4, O5 ⁺)	1,6 ± 0,3	74 ± 3,6	85 ± 2,7

^a Media ± desviación estándar de tres determinaciones diferentes.

^b Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC): % de bacterias retenidas en el gel.

^c Adherencia bacteriana a hidrocarburos (BATH): % de absorbancia de la fase acuosa tras el tratamiento con el hidrocarburo (0,2 ml) en relación a la absorbancia inicial.

3.6.3 Contribución del antígeno O5 a la adherencia a células uroepiteliales

Las propiedades físico-químicas de la superficie bacteriana juegan un papel muy importante en las interacciones, de asociación o de adhesión, entre la bacteria y las células eucariotas de los tejidos del hospedador. Al determinar la adhesión de estas cepas a células uroepiteliales (UEC) hallamos que los mutantes mostraban una capacidad de adherirse a las UEC unas tres veces menor que las cepas O5⁺ (tabla 3.4). Por tanto, el antígeno O5 de *K. pneumoniae* es un importante factor de adhesión.

Tabla 3.4. Adhesión de las cepas de *K. pneumoniae* a células uroepiteliales

Cepa	% de bacterias adheridas ^a
KT769 (O5:K57, salvaje)	43,8 ± 3,9
KT769-1 (mutante <i>wbdC</i> , O5 ⁻)	17,3 ± 3,5
KT769-6 (mutante <i>wzm-wzt</i> , O5 ⁻)	16,7 ± 3,2
KT769-1C (KT769-1 complementado con CosKT4, O5 ⁺)	42,6 ± 3,4
KT769-6C (KT769-6 complementado con CosKT4, O5 ⁺)	43,2 ± 4,2

^a El porcentaje de bacterias que se adherían a las UEC fue calculado tal y como está descrito en Material y Métodos, 2.9. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Student's *t* test, P<0,01.

3.6.4 Influencia del antígeno O5 en la capacidad de colonización

Tabla 3.5. Infección experimental del tracto urinario de ratas por las distintas cepas de *K. pneumoniae*

Cepa	Dosis de infección (UFC/rata)	Muestra	Infección ^a medida por:	
			% de ratas infectadas ^b	Contaje de viables ^c
KT769 (O5:K57, salvaje)	1,2 × 10 ⁹	Riñón	100	6,8 ± 0,7
		Vejiga	100	6,5 ± 0,5
		Orina	100	8,6 ± 0,5 (6) ^a
KT769-1 (mutante <i>wbdC</i> , O5 ⁻)	0,9 × 10 ⁹	Riñón	30	3,8 ± 0,3
		Vejiga	20	3,6 ± 0,5
		Orina	20	5,8 ± 0,4 (2)
KT769-6 (mutante <i>wzm-wzt</i> , O5 ⁻)	1,1 × 10 ⁹	Riñón	30	3,9 ± 0,4
		Vejiga	30	3,2 ± 0,7
		Orina	20	5,6 ± 0,2 (2)
KT769-1C (KT769-1 complementado con CosKT4, O5 ⁺)	1,0 × 10 ⁹	Riñón	90	6,9 ± 0,6
		Vejiga	90	6,3 ± 0,5
		Orina	100	8,4 ± 0,8 (4)
KT769-6C (KT769-6 complementado con CosKT4, O5 ⁺)	1,2 × 10 ⁹	Riñón	100	7,0 ± 0,8
		Vejiga	100	6,5 ± 0,3
		Orina	100	8,3 ± 0,6 (6)

^a Un total de 20 riñones y 10 vejigas fueron estudiados en cada grupo. Los números entre paréntesis indican el número de muestras de orina estudiadas.

^b Porcentaje de cultivos positivos. El menor número de organismos detectable por el método era de 50 UFC por g (riñón o vejiga) o por ml (orina). Los valores para los mutantes O5⁻ corresponden al porcentaje de animales infectados.

^c Los valores representan la media del log₁₀ UFC por g o por ml ± desviación estándar de los cultivos positivos. Todos los análisis fueron realizados como mínimo por triplicado.

Por último, esperábamos que los cambios en la capacidad de adhesión de la bacteria provocaran a su vez variaciones en la habilidad de la bacteria para colonizar los

tejidos del hospedador. Se realizó una infección experimental del tracto urinario de ratas en la que se determinó el número de animales infectados y se contabilizaron las bacterias viables halladas en orina, vejiga y riñones (Material y Métodos, 2.10). Se observó una reducción drástica en la capacidad de los mutantes para provocar infección en relación a la cepa salvaje y a las cepas mutantes complementadas (tabla 3.5). Así pues, el antígeno O5 del LPS de *K. pneumoniae* es un importante factor de colonización, como mínimo en infecciones del tracto urinario, y este hecho se basa, al menos en parte, en el papel que juega en la adhesión a células uroepiteliales.

3.7 Discusión

Algunos estudios habían demostrado el papel fundamental que juega el antígeno O del LPS en la capacidad de resistir a la actividad bactericida del suero no inmune que poseían diversas bacterias Gram negativas (Frank, 1990). En el caso de *K. pneumoniae*, había sido claramente demostrada la relación existente entre el antígeno O1 y la resistencia al suero (Merino *et al.*, 1992). Sin embargo, poco se sabía respecto a la contribución de otros antígenos de *K. pneumoniae* a esta característica, ni se conocía exactamente el papel que jugaban en la determinación de la patogenicidad de *K. pneumoniae*. La cepa KT769 de *K. pneumoniae* (O5:K57) presenta un antígeno O formado por un homopolímero de manosa y es resistente a la actividad bactericida del suero, circunstancia que permitió clonar en *E. coli* DH5 α la agrupación génica *wb_{KpO5}*, que contiene los genes implicados en la biosíntesis del antígeno O5 de *K. pneumoniae*.

La agrupación génica *wb_{KpO5}* contiene ocho pautas de lectura completas que codifican para las proteínas necesarias para la síntesis del antígeno O5 de *K. pneumoniae*. Dentro del operón se hallan los genes *manC* y *manB*, implicados en la síntesis de la GDP-manosa, que es el precursor a partir del cual se formará el polímero. Estos dos genes han sido encontrados también en otras agrupaciones génicas *wb* que determinan la síntesis de otros antígenos homopolímeros de manosa (Sugiyama *et al.*, 1994).

Dentro del conjunto de genes *wb_{KpO5}* también se localizan dos genes, *wzm* y *wzt*, que codifican para proteínas involucradas en el transporte del antígeno O hacia el periplasma. Estas proteínas forman un sistema de exporte de tipo ABC-2 (dependiente de ATP), de manera que la ruta de biosíntesis del antígeno O5 de *K. pneumoniae* es del tipo transportador ABC-dependiente, característica de antígenos O homopolímeros (Whitfield *et al.*, 1997).

Las transferasas, responsables de la incorporación de los monosacáridos al polímero en formación se hallan en la segunda mitad del conjunto de genes, codificadas por los genes *wbdA*, *wbdB* y *wbdC*. En el caso del antígeno O9 de *E. coli*, WbdC es la primera enzima en actuar y transfiere la manosa a la N-acetilglucosamina-und-P, que hace de iniciador de la biosíntesis. Esta reacción suministra el aceptor necesario para la subsiguiente elongación de la cadena mediante la actividad secuencial de WbdB, que transfiere una unidad de manosa a la posición 3 de la anterior, y WbdA, que transfiere manosa a la posición 2 de la manosa previa (Kido *et al.*, 1995).

Los serotipos O8 y O9 de *E. coli* poseen la misma estructura química específica en sus homopolisacáridos de manosa que los serotipos O5 y O3 de *K. pneumoniae*, respectivamente, y las agrupaciones génicas *wb* de todos ellos están muy relacionadas evolutivamente. De hecho, se postula que la agrupación génica *wb* de *E. coli* O9a proviene de un evento de recombinación de parte de la agrupación génica *wb* de *K. pneumoniae* O3 en un ancestro de *E. coli* O9a (Sugiyama *et al.*, 1998). En las agrupaciones génicas de todas estas cepas, la región específica de cada serotipo está flanqueada por dos regiones comunes, la región formada por los genes *manC* y *manB*, y la región del gen *wbdC* (Sugiyama *et al.*, 1994). El hecho de que la región del gen *wbdC* estuviera tan conservada en estos operones, con un espacio de 38 pares de bases entre el codón de parada del gen *wbdC* y el del gen *hisIE*, que también puede observarse en la agrupación *wb_{KpO5}*, permitió el diseño del cebador a partir del cual se inició la secuenciación los genes implicados en la síntesis del antígeno O5 de *K. pneumoniae*. La existencia de estas regiones o bloques en el conjunto de genes *wb_{KpO5}* puede constatarse observando los porcentajes de G+C de los distintos genes del conjunto (tabla 3.1): los genes *manCB* presentan un valor más elevado que el valor esperado en general para las especies del género *Klebsiella*; los cuatro genes centrales de la agrupación génica (*wzm-wzt-wbdD-wbdA*) presentan unos valores más bajos que los de los genes anteriores y más bajos también que el valor esperado en especies de este género; por último, los dos últimos genes, *wbdB* y *wbdC*, tienen un porcentaje de G+C más acorde con el valor medio de los genomas del género. Estas variaciones indican que estos conjuntos de genes se han formado mediante transferencia génica horizontal entre bacterias con distintos porcentajes de G+C (Reeves, 1993; Kido *et al.*, 1995).

Los mutantes construidos en la cepa KT769 de *K. pneumoniae* (O5:K57), incapaces de producir el antígeno O5, son sensibles a la actividad bactericida del suero humano no inmune y recuperan la resistencia al suero al recobrar la producción del

antígeno O5. Dado que estos mutantes presentan una molécula completa de R-LPS, es decir el LPS completo sin el antígeno O5, queda demostrado que éste juega un papel crítico en la resistencia al complemento. Los motivos por los cuales el antígeno O5 es capaz de conferir esta facultad a la bacteria pueden ser los mismos que los descritos en el caso del antígeno O1 de *K. pneumoniae*: el componente C3b del complemento se deposita sobre las cadenas polisacáridicas más largas, impidiéndose la formación del complejo lítico de ataque a la membrana (C5b-9) (Merino *et al.*, 1992). Si esto es así, cobraría especial importancia el mecanismo encargado de la determinación de la longitud de las cadenas polisacáridicas, y, precisamente en el antígeno O5 de *K. pneumoniae*, se ha observado la presencia de un residuo terminal de 3-O-metil-D-manosa en su extremo no reducido (Jansson *et al.*, 1985), lo que podría sugerir que algunos elementos estructurales pueden actuar como señales terminadoras de la extensión del polisacárido durante su biosíntesis.

La variación en la carga superficial que presentan los mutantes O5⁻ implica cambios en su hidrofobicidad que pueden explicarse por la pérdida del antígeno O5, una molécula hidrófila, en su membrana externa. La hidrofobicidad de los mutantes es mayor que la de la cepa salvaje y que la de las cepas complementadas (tabla 3.3). La determinación de la hidrofobicidad mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) parece ser más sensible que la técnica de la adherencia bacteriana a hidrocarburos (BATH), que a su vez es más sensible cuando se utiliza xileno que cuando se utiliza hexadecano. Esto último tal vez podría explicarse porque el xileno es un agente más penetrante que el hexadecano y estos mutantes carecen del antígeno O5 pero siguen siendo capsulados.

La alteración de la carga superficial y de la hidrofobicidad de los mutantes O5⁻ interfiere de forma crítica en la asociación de la bacteria a las células eucariotas, que es un paso primordial para su adhesión. Por este motivo, el antígeno O5 de *K. pneumoniae* es un importante factor de adhesión para la bacteria, tal y como había sido descrito en el caso del antígeno O1 de *K. pneumoniae* (Merino *et al.*, 1997). A su vez, la adhesión a las células eucariotas es un paso decisivo para la posterior colonización, o infección, bacteriana. Es por ello que los mutantes O5⁻, con una importante reducción en la capacidad de adherirse a células uroepiteliales respecto a la cepa salvaje o a los mutantes complementados (tabla 3.4), mostraban también una drástica disminución en su habilidad para infectar el tracto urinario de ratas (tabla 3.5). Este hecho también

había sido constatado en el caso del antígeno O1 de *K. pneumoniae* (Camprubí *et al.*, 1993).

Los resultados obtenidos muestran una importante correlación entre la presencia del antígeno O5 del LPS y la virulencia. Las bacterias con antígeno O5 muestran una mejor adherencia a células UEC y son resistentes al suero no inmune, por lo que son más virulentas que las bacterias O5⁻. Por tanto, al igual que el antígeno O1, el antígeno O5 de *Klebsiella pneumoniae* cepa KT769, juega un importante papel en la virulencia de esta bacteria.

4 Caracterización de la agrupación génica *wb*_{O12} de *Klebsiella pneumoniae*. Estudios de complementación entre mutantes de *Serratia marcescens* N28b O4⁻ y mutantes de *K. pneumoniae* O12⁻.

4.1 Precedentes

La estructura química del antígeno O12 de *Klebsiella pneumoniae* ha sido descrita como un heteropolímero de ramnosa y N-acetilglucosamina (fig. 1.13): -3)-β-GlcNAc-(1-4)-α-Rha-(1-. El antígeno O4 de *Serratia marcescens* es también un heteropolímero, pero en este caso la unidad repetitiva está formada por L-ramnosa unida a D-glucosa mediante un enlace α1-4, -4)-β-D-Glc-(1-4)-α-L-Rha-(1-. Si la relativa similitud estructural entre estas dos cadenas está determinada por una maquinaria biosintética semejante, es decir, por unos conjuntos de genes *wb* parecidos, la comparación entre ellos debería permitir averiguar que componentes de estos conjuntos de genes generan estas diferencias en la estructura. Para ello es necesario clonar y secuenciar el conjunto de genes *wb*_{KpO12}, puesto que el conjunto *wb*_{SmO4} ya ha sido caracterizado por nuestro grupo de investigación (Saigí *et al.*, 1999).

4.2 Clonaje de la agrupación génica *wb*_{KpO12}

Como en el caso del antígeno O5 (Resultados, 3.1.2), la capacidad de resistir al suero no inmune de la cepa KT776 de *K. pneumoniae* (O12:K80) permitió clonar la agrupación génica *wb* de esta bacteria en *E. coli* DH5α, dada la importancia del antígeno O en la protección de la bacteria contra la actividad bactericida del suero. Se construyó una genoteca de la cepa KT776 que fue transformada en *E. coli* DH5α. Los clones recombinantes se seleccionaron en placas de LB agar suplementadas con tetraciclina y fue comprobada su sensibilidad al suero no inmune (Material y Métodos, 2.3.10 y 2.8.1). Se obtuvo un clon, que fue denominado CosKT12, capaz de dotar a DH5α de resistencia al suero. Se caracterizó el perfil electroforético en geles de poliacrilamida de las proteínas de la membrana externa y del LPS de la DH5α que contenía el cósmido CosKT12 y, mientras que no se hallaron variaciones en las proteínas de la membrana externa, se observó que el clon confería a *E. coli* DH5α la capacidad de producir el antígeno O12 de *K. pneumoniae* (fig. 4.1, A y B). Cuando el CosKT12 era curado de la DH5α, la cepa perdía la capacidad de producir antígeno O12.

4.3 Subclonaje de CosKT12 y secuenciación de la agrupación de genes

*wb*_{KpO12}

Se trató de subclonar CosKT12 en DH5 α utilizando diversos plásmidos y digestiones parciales. Con la enzima *Pst*I se clonó un fragmento de unas 13 Kb en el vector pBR328. Este subclón, al cuál denominamos pJTO12, mostraba una reacción positiva en una inmunotransferencia a nivel colonial realizada con antisuero específico contra el antígeno O12 de *K. pneumoniae*. Tal y como se observó por geles de LPS e inmunotrasferencia, el plásmido pJTO12 dotaba a *E. coli* DH5 α de la capacidad de producir el antígeno O12 de *K. pneumoniae* (fig. 4.1, A y B). Además, el subclón fue transferido a la cepa CLM4, que carece completamente del grupo de genes *wb* (Marolda y Valvano, 1993), y ésta fue capaz de producir antígeno O12. Todos estos datos indicaban que pJTO12 contenía toda la información genética necesaria para la producción del antígeno O12 de *K. pneumoniae*.

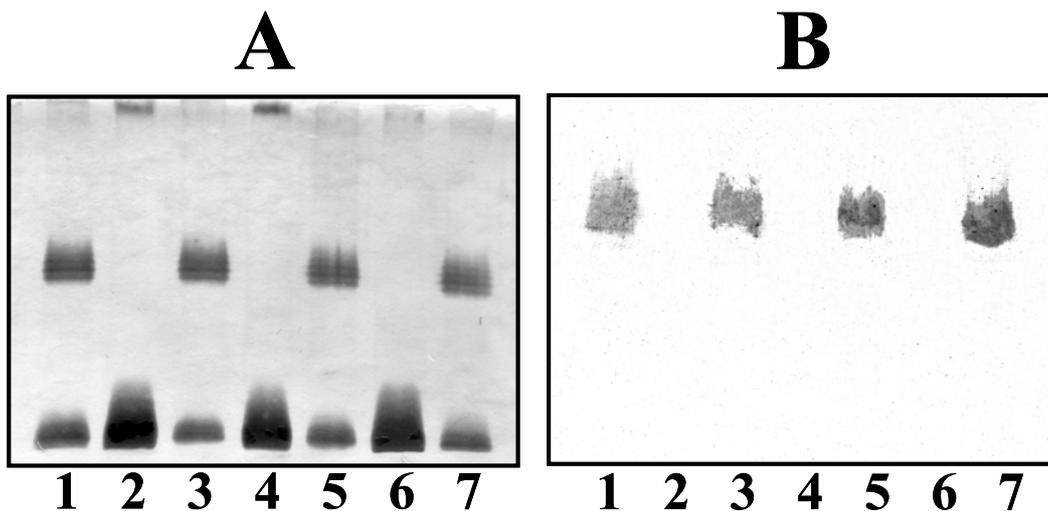


Fig. 4.1. (A) SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de muestras de LPS de las diversas cepas de *E. coli*. (B) Inmunotransferencia de las muestras de LPS realizada con antisuero específico contra el antígeno O12 de *K. pneumoniae*. Las muestras de LPS se obtuvieron según el método de Darveau y Hancock, 1983. El antisuero se obtuvo tal y como está descrito en Material y Métodos, 2.7.1. Carriles: 1, *K. pneumoniae* KT776; 2, *E. coli* DH5 α ; 3, DH5 α con CosKT12; 4, cepa curada del carril 3; 5, DH5 α con pJTO12; 6, *E. coli* CLM4 (Δ *wb*); 7, CLM4 con pJTO12.

La secuencia de ADN se inició con los cebadores pBR_{Pstcw} y pBR_{Pstccw}, que hibridan a ambos lados de la diana de restricción *Pst*I del plásmido pBR328, lugar donde se clonó el inserto en el subclón pJTO12. El resto de la secuencia se completó mediante el diseño de nuevos cebadores a partir de la secuencia de nucleótidos que se iba obteniendo. Se determinaron un total de ocho ORFs completas que se transcribían en la misma dirección (tabla 4.1) y se localizaron posibles secuencias de unión de

ribosomas a la distancia apropiada de los codones de inicio de cada ORF. El hecho de que las ORFs se solaparan y de que no se hallaran entre ellas secuencias similares a terminadores Rho-independientes, daba a entender que estas pautas abiertas de lectura formaban parte de una única unidad transcripcional. La secuencia de nucleótidos obtenida fue depositada en GenBank con el número de acceso AY130997.

Tabla 4.1. Agrupación génica *wb* de *K. pneumoniae* KT776 O12

Locus	Posición	% G+C	Proteína codificada (kDa)	pI ^a	GRAVY ^b
<i>rmlB</i> (ORF1)	1-1065	57,8	39,4	6,1	-0,287
<i>rmlA</i> (ORF2)	1083-1988	55,6	33,1	5,3	-0,106
<i>rmlD</i> (ORF3)	1985-2875	61,3	31,7	5,8	-0,065
<i>rmlC</i> (ORF4)	2890-3444	54,4	20,2	5,7	-0,217
<i>wbbL</i> (ORF5)	3536-4366	34,5	32,1	8,7	-0,187
<i>wzm</i> (ORF6)	4396-5229	37,5	31,2	9,7	+0,978
<i>wzt</i> (ORF7)	5219-6541	43,8	48,2	6,1	-0,084
<i>wbbB</i> (ORF8)	6545-9346	39,9	106,8	5,8	-0,203

^a Punto isoeléctrico de la proteína calculado mediante ProtParam del servidor ExPASy.

^b Hidrofobicidad de la proteína, según el método de Kyte y Doolittle, 1982.

4.4 Análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas de las ORFs

Los productos deducidos de las distintas ORFs fueron comparados con diversas bases de datos de proteínas para localizar aquellas con las cuales mostraran homologías (tabla 4.2). Se observó que los productos de las ORFs 1, 2, 3 y 4 eran muy similares a las enzimas características involucradas en la síntesis de la ramnosa en diferentes enterobacterias. Estas proteínas presentaban función dTDP-glucosa-4,6-deshidratasa, glucosa-1P-timidiltransferasa, dTDP-4-dehidroramnosa-reductasa, y dTDP-4-dehidroramnosa-3,5-epimerasa, respectivamente. Así pues, las ORFs1, 2, 3 y 4 corresponderían a los genes *rmlB*, *rmlA*, *rmlD* y *rmlC*.

La proteína de 276 aminoácidos codificada por la ORF5 presentó homología con la proteína WbbL presente en la agrupación génica *wb*_{O4} de *S. marcescens*, que tiene una presunta función ramnosil transferasa, por lo que dicho gen fue denominado *wbbL*.

ORF6 y ORF7 eran similares a proteínas que formaban sistemas de transporte tipo ABC-2 (*ATP Binding Cassette-2*). El producto de ORF6 presentaba un 84% de similitud con la proteína integral de membrana Wzm de *wb*_{SmO4}, que forma parte del transportador ABC implicado en el transporte del antígeno O4 hacia el periplasma. Los análisis de hidrofobicidad realizados sobre la proteína codificada por ORF6 y la presencia de seis dominios transmembrana (en las regiones correspondientes a los aminoácidos 53-69, 84-100, 133-149, 158-174, 194-210 y 245-261) sugerían que ésta

se hallaba localizada en la membrana citoplasmática. Por su parte, el producto de ORF7 presentaba un nivel de similitud del 83% con la proteína Wzt de *wb_{SmO4}*, responsable de la unión del ATP en el sistema de transporte tipo ABC que exporta el antígeno O4. Además, la proteína codificada por ORF7 contenía la secuencia de aminoácidos GRNGAGKS (en los residuos del 70 al 77) que correspondía a la caja A (*Walker A Box*), presente en las proteínas que unen ATP, y contenía también un motivo hallado comúnmente en proteínas de la familia transportador-ABC entre los aminoácidos 158 y 172 (YSSGMYVRLAFAVQA). Todos estos datos nos llevaron a denominar a ORF6 y ORF7 como *wzm* y *wzt*, respectivamente.

Tabla 4.2. Porcentajes de similitud e identidad de las secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas en las pautas de lectura ORF1 a ORF8 de la agrupación génica *wb* de *K. pneumoniae* KT776 comparadas con otras proteínas significativas.

Proteína	Nº de amino-ácidos	% Similitud ^a	% Identidad ^a	Número de acceso en Genbank
ORF1 (RmlB)				
<i>K. pneumoniae</i> KT776 RmlB	354			AY130997
<i>Yersinia pestis</i> RffG (RmlB)	355	81	72	NP407310
<i>E. coli</i> O157:H7 RmlB	355	79	70	NP312748
ORF2 (RmlA)				
<i>K. pneumoniae</i> KT776 RmlA	301			AY130997
<i>Y. enterocolitica</i> RmlA	289	86	76	P55257
<i>Y. pestis</i> RffH (RmlA)	293	86	76	NP407309
ORF3 (RmlD)				
<i>K. pneumoniae</i> KT776 RmlD	296			AY130997
<i>Salmonella enterica</i> RmlD	299	58	47	AAG09514
<i>S. enterica</i> sv. typhimurium RfbD (RmlD)	299	58	47	NP461041
ORF4 (RmlC)				
<i>K. pneumoniae</i> KT776 RmlC	184			AY130997
<i>Shigella boydii</i> RmlC	189	89	72	AAL27313
<i>S. flexneri</i> RfbC (RmlC)	181	78	68	P37780
ORF5 (WbbL)				
<i>K. pneumoniae</i> KT776 WbbL	276			AY130997
<i>Serratia marcescens</i> O4 WbbL	282	69	55	T31088
ORF6 (Wzm)				
<i>K. pneumoniae</i> KT776 Wzm	277			AY130997
<i>S. marcescens</i> O4 Wzm	277	84	75	T31089
ORF7 (Wzt)				
<i>K. pneumoniae</i> KT776 Wzt	440			AY130997
<i>S. marcescens</i> O4 Wzt	441	83	71	T31090
ORF8 (WbbB)^b				
<i>K. pneumoniae</i> KT776 WbbB	933			AY130997
<i>S. marcescens</i> O4 WbbA	1191	58	39	T31091

^a Los porcentajes fueron obtenidos mediante comparaciones utilizando el programa Blast, en el servidor del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

^b Homología entre WbbB (entre los residuos 1 a 454) y WbbA (entre los residuos 1 y 460).

Por último, la proteína codificada por ORF8 sólo presentó homología con la primera mitad (460 aminoácidos) de la proteína WbbA del conjunto de genes *wb* de *S. marcescens* O4 (Saigí *et al.*, 1999). Al igual que WbbA, el producto de ORF8 mostró una posible función glicosil transferasa en la primera parte de la proteína y podría estar anclada a la membrana, ya que posee un presunto dominio transmembrana entre los residuos 334 y 350. Estos datos sugieren la existencia de algunas características similares en la primera parte de ambas proteínas, pero no en la última mitad. Dado que se ha sugerido que la proteína WbbA sea bifuncional, esto querría decir que una función está relacionada con una función de la proteína ORF8. La hipotética segunda función, sin embargo, sería diferente en ambas proteínas. Por la semejanza de ORF8 con algunos aspectos de WbbA, dicho gen fue denominado *wbbB*.

4.5 Componentes de *wb_{SmO4}* y de *wb_{KpO12}* que determinan la especificidad de uno y otro antígeno

El análisis de la agrupación génica *wb* de *K. pneumoniae* O12 mostró que ésta era muy similar a la de *S. marcescens* O4 (fig. 4.2), sobre todo en los últimos cuatro genes. Por tanto, la semejanza en la estructura química de sus respectivos antígenos O venía determinada por similitudes a nivel genético. Se decidió estudiar que genes de ambas agrupaciones estaban involucrados en la determinación de la especificidad ambos antígenos, es decir, que genes hacían que ambos antígenos fueran diferentes. Para realizar estos análisis, fue necesario contar con una batería de mutantes en diversos genes de las dos agrupaciones a estudiar, así como construir plásmidos que contuvieran genes de una y otra bacteria para llevar a cabo experimentos de complementación.

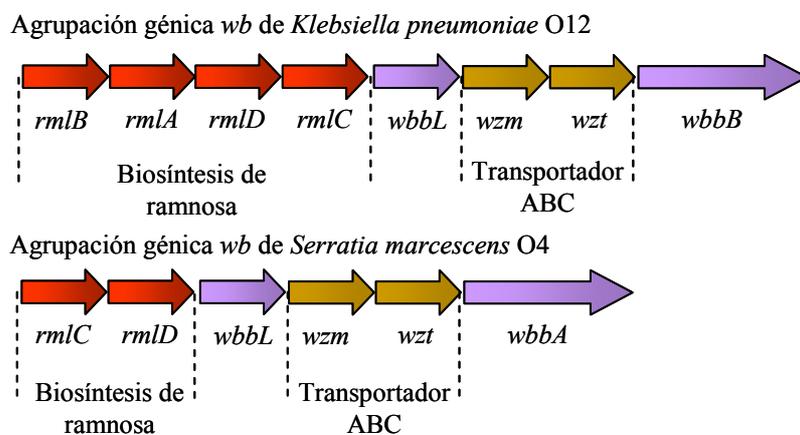


Fig. 4.2. Estructura de las agrupaciones *wb* de *K. pneumoniae* O12 y *S. marcescens* O4. Los genes marcados en lila indican las glicosil transferasas.

4.5.1 Construcción de los mutantes KT776-1 (*wzm-wzt*) y KT776-2 (*wbbB*) y de los plásmidos necesarios

Mediante amplificación por PCR, a partir del cósmido pSub6 que contenía el grupo de genes *wb_{SmO4}*, y clonaje en el vector pST-Blue (Km^r) se construyeron los siguientes plásmidos: pST5, que contenía el gen *wbbA* de *S. marcescens* O4; pST6, con los genes *wzm-wzt* de *S. marcescens* O4; y pST7, con los tres últimos genes de la agrupación *wb* de la misma bacteria (Tabla 4.3). El subclón pJTO12 se utilizó como molde para la construcción del plásmido pST1, que contenía los genes *wzm* y *wzt* de *K. pneumoniae* O12.

Tabla 4.3. Resumen de los plásmidos y mutantes utilizados en este estudio.

Mutantes	Características principales
<i>S. marcescens</i> N28b-2	Mutante por inserción en <i>wbbL</i> , Km ^r
<i>S. marcescens</i> N28b-3	Mutante por inserción en <i>wbbA</i> , Km ^r
<i>S. marcescens</i> N28b-4	Mutante por delección en <i>wzm</i> y <i>wzt</i>
<i>K. pneumoniae</i> KT776-1	Mutante por delección en <i>wzm</i> y <i>wzt</i>
<i>K. pneumoniae</i> KT776-2	Mutante por delección en <i>wbbB</i>
Plásmidos	
pST5 (Sm1/Sm2) ^a	Gen <i>wbbA</i> de <i>S. marcescens</i>
pST6 (Sm3/Sm4) ^a	Genes <i>wzm</i> y <i>wzt</i> de <i>S. marcescens</i>
pST7 (Sm3/Sm2) ^a	Genes <i>wzm</i> , <i>wzt</i> y <i>wbbA</i> de <i>S. marcescens</i>
pST1 (Kp1/Kp2) ^a	Genes <i>wzm</i> y <i>wzt</i> de <i>K. pneumoniae</i>
pBR1 (Kp3/Kp4) ^a	Gen <i>wbbL</i> de <i>K. pneumoniae</i>
pBR2 (Kp5/Kp6) ^a	Gen <i>wbbB</i> de <i>K. pneumoniae</i>
pBR3 (Kp7/Kp6) ^a	Genes <i>wzm</i> , <i>wzt</i> y <i>wbbB</i> de <i>K. pneumoniae</i>

^a Cebadores utilizados para amplificar el inserto a clonar (ver Material y Métodos, 2.13.11.3).

Por medio de un sistema similar se construyeron los plásmidos pBR1, pBR2 y pBR3. En este caso, se realizaba una PCR a partir de pJTO12 con cebadores que contenían la diana de restricción *PvuII*. Esto permitía que el producto fuera digerido con esta enzima para, posteriormente, ser clonado en pBR328 digerido con *PstI* y con extremos romos (Tc^r y Cm^r). pBR1 contenía el gen *wbbL* de *K. pneumoniae* O12; pBR2, el gen *wbbB* de la misma bacteria; y pBR3, los tres últimos genes de la agrupación *wb_{KpO12}*.

Se construyeron dos mutantes diferentes de *K. pneumoniae* KT776, mediante mutagénesis dirigida por doble recombinación (ver Material y Métodos 2.13.12.1). El mutante KT776-1 tenía delecionados los genes *wzm* y *wzt*, mientras que el mutante KT776-2 estaba delecionado en el gen *wbbB*. Ambos mutantes carecían de antígeno O, tal y como se observó mediante geles de LPS e inmunotransferencias (fig. 4.3). No se detectaron alteraciones significativas en el perfil electroforético de sus proteínas de membrana externa. Cuando a los mutantes les era transferido un plásmido que contuviera el gen que se les había delecionado (o toda la agrupación *wb_{KpO12}*), recuperaban la capacidad de producir el antígeno O12.

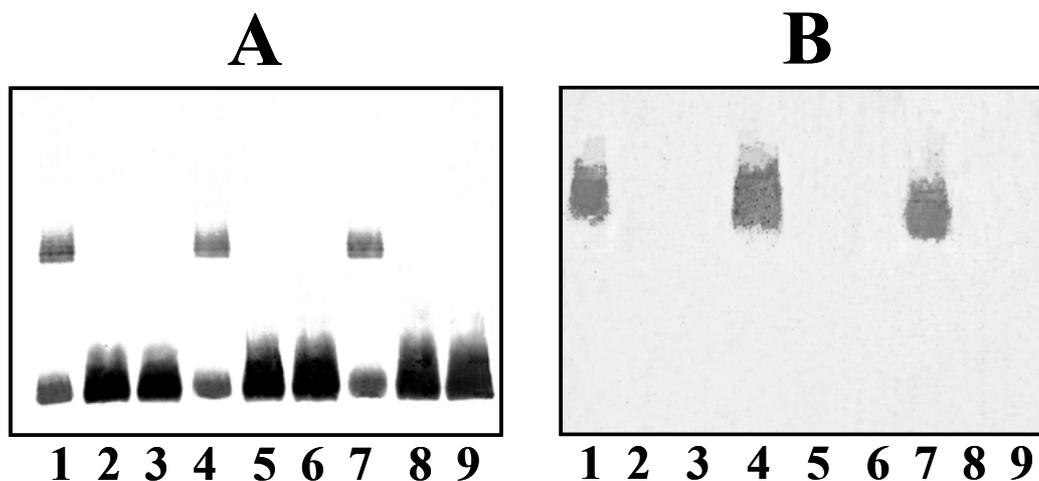


Fig. 4.3. (A) SDS-PAGE teñido con nitrato de plata e (B) inmunotransferencia realizada con antisuero específico contra el antígeno O12 de *K. pneumoniae*. Las muestras de LPS se obtuvieron según el método de Darveau y Hancock, 1983. El antisuero se obtuvo tal y como está descrito en Material y Métodos, 2.7.1. Carriles: 1, *K. pneumoniae* KT776 (salvaje); 2, KT776-1 (*wzm-wzt*); 3, KT776-2 (*wbbB*); 4, KT776-1 con pST1 (*wzm-wzt* de *K. pneumoniae*); 5, KT776-1 con pBR1 (*wbbL* de *K. pneumoniae*); 6, KT776-1 con pBR2 (*wbbB* de *K. pneumoniae*); 7, KT776-2 con pBR2 (*wbbB* de *K. pneumoniae*); 8, KT776-2 con pBR1 (*wbbL* de *K. pneumoniae*); 9, KT776-2 con pST1 (*wzm-wzt* de *K. pneumoniae*).

Además, en trabajos previos realizados en nuestro grupo se habían creado diversos mutantes de *S. marcescens* O4 (tabla 4.3), que también fueron utilizados para este estudio. Estos mutantes eran: N28b-2, un mutante por inserción en el gen *wbbL* (Km^r); N28b-3, mutante por inserción en el gen *wbbA* (Km^r); y N28b-4, mutante por doble recombinación delecionado en sus genes *wzm* y *wzt* (Saigí *et al.*, 1999). Los tres mutantes eran O4⁻.

4.5.2 Estudios de complementación

Se observó que los mutantes construidos en *K. pneumoniae* KT776 recuperaban la capacidad de producir antígeno O12 cuando les era transferido un plásmido que contuviera los mismos genes que habían sido mutados (fig. 4.3), es decir cuando

KT776-1 ($\Delta wzm-wzt$) era complementada con pST1 (*wzm-wzt* de *Kp*), y cuando KT776-2 ($\Delta wbbB$) era complementada con pBR2 (*wbbB* de *Kp*).

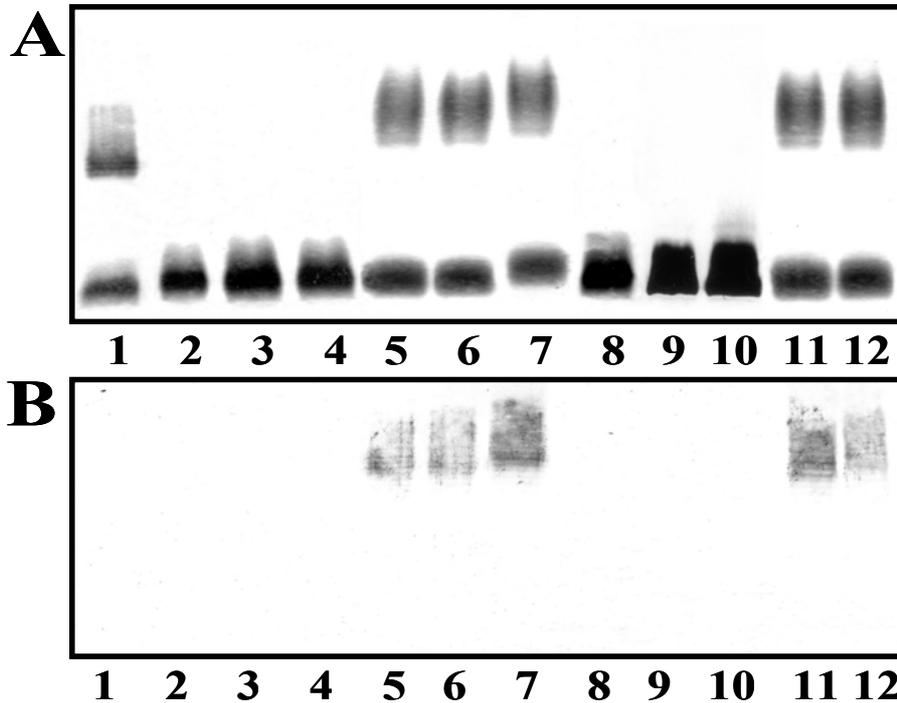


Fig. 4.4. (A) SDS-PAGE teñido con nitrato de plata e (B) inmunotransferencia realizada con antisuero específico contra el antígeno O4 de *S. marcescens*. Las muestras de LPS se obtuvieron según el método de Darveau y Hancock, 1983. El antisuero se obtuvo tal y como está descrito en Material y Métodos, 2.7.1. Carriles: **1**, *K. pneumoniae* KT776 (salvaje); **2**, KT776-1 (*wzm-wzt*); **3**, KT776-1 con el vector pST-Blue; **4**, KT776-1 con pST6 (*wzm-wzt* de *S. marcescens*); **5**, KT776-1 con pST7 (*wzm-wzt-wbbA* de *S. marcescens*); **6**, KT776-1 con pSUB6 (agrupación *wb* de *S. marcescens* completa); **7**, *S. marcescens* N28b (serotipo O4, salvaje); **8**, KT776-2 (*wbbB*); **9**, KT776-2 con el vector pST-Blue; **10**, KT776-2 con pST5 (*wbbA* de *S. marcescens*); **11**, KT776-2 con pST7 (*wzm-wzt-wbbA* de *S. marcescens*); **12**, KT776-2 con pSUB6 (agrupación *wb* de *S. marcescens* completa).

Dadas las similitudes ya comentadas entre las proteínas finales codificadas en los grupos de genes *wb_{KpO12}* y *wb_{SmO4}*, se comprobó la posible complementación de los dos mutantes de la cepa KT776 de *K. pneumoniae* con los plásmidos que contenían genes del grupo *wb_{O4}* de *S. marcescens*. Ninguno de los dos mutantes era complementado por los genes homólogos involucrados en la síntesis del antígeno O4 de *S. marcescens*, tal y como se observó mediante geles de LPS (fig. 4.4, A) y mediante inmunotransferencia con antisuero contra el antígeno O12 de *K. pneumoniae*. Sin embargo, ambos mutantes recuperaban la capacidad de producir antígeno O al serles transferido el plásmido pSub6 (*wb_{SmO4}* completo) o el plásmido pST7 (*wzm-wzt-wbbA* de *S. marcescens*). El antígeno O producido en estos casos no reaccionaba con el antisuero contra el antígeno O12 de *K. pneumoniae*, pero si que era detectado por medio de inmunotransferencia con el antisuero contra el antígeno O4 de *S. marcescens* (fig. 4.4, B). Así pues, en resumen, los mutantes de *K. pneumoniae* eran capaces de producir

antígeno O4 de *S. marcescens* al ser complementados con los tres últimos genes completos de la agrupación génica *wb_{SmO4}*.

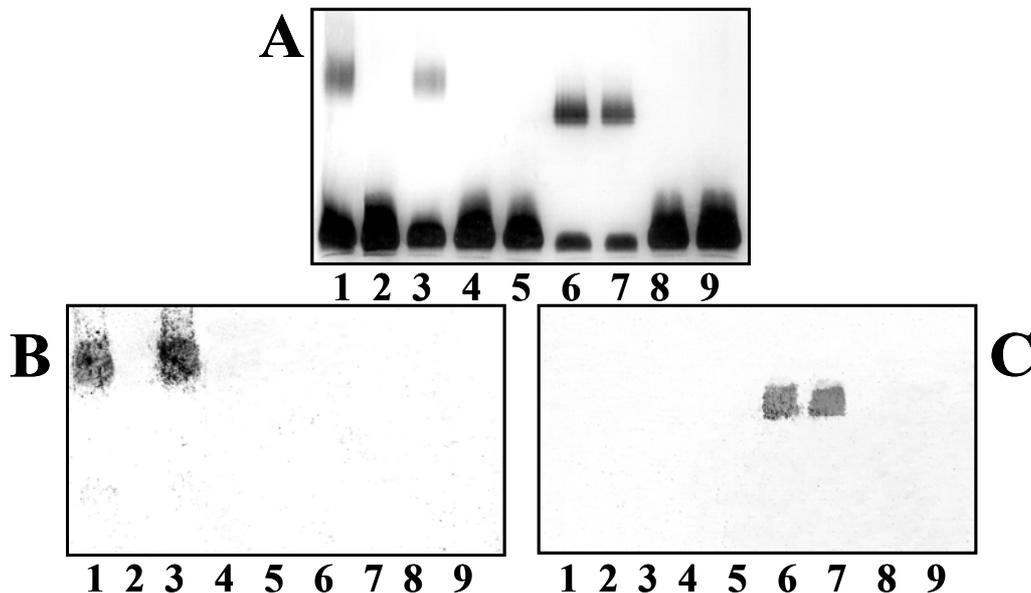


Fig. 4.5. (A) SDS-PAGE teñido con nitrato de plata, (B) inmunotransferencia realizada con antisuero específico contra el antígeno O4 de *S. marcescens* e (C) inmunotransferencia realizada con antisuero específico contra el antígeno O12 de *K. pneumoniae*. Las muestras de LPS se obtuvieron según el método de Darveau y Hancock, 1983. El antisuero se obtuvo tal y como está descrito en Material y Métodos, 2.7.1. Carriles: 1, *S. marcescens* N28b (serotipo O4, salvaje); 2, N28b-2 (*wbbL*); 3, N28b-2 con pBR1 (*wbbL* de *K. pneumoniae*); 4, N28b-4 (*wzm-wzt*); 5, N28b-4 con pST1 (*wzm-wzt* de *K. pneumoniae*); 6, N28b-4 con pBR3 (*wzm-wzt-wbbB* de *K. pneumoniae*); 7, N28b-3 con pBR3 (*wzm-wzt-wbbB* de *K. pneumoniae*); 8, N28b-3 con pBR2 (*wbbB* de *K. pneumoniae*); 9, N28b-3 (*wbbA*).

El mutante N28b-2 (*wbbL*) recuperaba la capacidad de producir su propio antígeno, el O4, al ser complementado con el plásmido pBR1, que contenía el gen homólogo *wbbL* perteneciente a la agrupación *wb* de *K. pneumoniae* (fig. 4.5). Por otro lado, el mutante N28b-4 también producía antígeno O4, cuando contenía el plásmido pST6 (con los genes *wzm-wzt* de *S. marcescens*). Sin embargo, los mutantes N28b-3 y N28b-4 tan solo producían antígeno O cuando les eran transferidos los últimos tres genes completos de la agrupación *wb_{O12}* de *K. pneumoniae*. Por inmunotransferencia, se observó que el antígeno O que producían era el O12. Al ser complementados solamente con los genes homólogos de *K. pneumoniae*, es decir, N28b-3 con el plásmido pBR2 (*wbbB* de *K. pneumoniae*) y N28b-4 con pST1 (*wzm-wzt* de *K. pneumoniae*), los mutantes no recuperaban la capacidad de producir antígeno O (fig. 4.5). Ninguno de los mutantes de *S. marcescens* N28b producía antígeno O al serles introducidos únicamente los vectores pBR328 o pST-Blue. Nuevamente, de forma paralela a lo ocurrido en las complementaciones de los mutantes de *K. pneumoniae*, N28b-3 y N28b-4 eran capaces de producir el antígeno O12 de *K. pneumoniae* cuando les eran transferidos los tres últimos genes completos de la agrupación *wb_{KpO12}*. Por lo tanto, los

resultados obtenidos daban a entender que la especificidad de ambos antígenos O dependía de la región final, los tres últimos genes, de sus respectivas agrupaciones génicas *wb*.

4.6 Discusión

Estudios anteriores ya habían puesto de manifiesto que la presencia del antígeno O en el LPS, el denominado fenotipo ‘smooth’, es determinante para la resistencia al suero en diversas bacterias Gram negativas (Frank, 1990; Merino *et al.*, 1992). Además, en este mismo trabajo, se había demostrado el importante papel que juega el antígeno O5 de *K. pneumoniae* en la capacidad de esta bacteria para resistir la actividad bactericida del suero no inmune (Merino *et al.*, 2000). Se aprovechó esta característica para clonar el antígeno O12 de *K. pneumoniae* en *E. coli* DH5 α .

La agrupación génica *wb* de la cepa KT776 de *K. pneumoniae* (O12:K80) está constituida por ocho genes contiguos, que se transcriben en la misma dirección y que están implicados en la producción del antígeno O12 de *K. pneumoniae*. Las actividades enzimáticas propuestas mediante comparación de secuencias coinciden con las requeridas para la biosíntesis del antígeno O12 del LPS de *K. pneumoniae*. Los genes que forman las agrupaciones *wb* pueden clasificarse, generalmente, en tres categorías: genes involucrados en la síntesis de los precursores activados, transferasas implicadas en la construcción y modificación de la cadena polimérica, y genes que codifican para proteínas que exportarán el antígeno O al periplasma y/o participarán en la polimerización de las subunidades del antígeno O (Reeves *et al.*, 1996). En la agrupación *wb_{KpO12}* descrita se han hallado genes correspondientes a las tres categorías.

En el extremo 5' de la agrupación génica *wb_{KpO12}* se encuentran los genes que determinan la ruta biosintética de la dTDP-ramnosa que formará parte de la cadena heteropolimérica. El otro residuo que constituye el antígeno O12, la N-acetilglucosamina, proviene de rutas de biosíntesis del metabolismo central de la bacteria, y es también un precursor fundamental de otros importantes compuestos bacterianos, como el lípido A, el antígeno común de las enterobacterias o el peptidoglicano (Meier-Dieter *et al.*, 1992; Morrison y Ryan, 1992).

Tal y como hemos explicado, el antígeno O12 de *K. pneumoniae* es un heteropolímero formado por subunidades repetitivas de ramnosa y N-acetilglucosamina: -3)- β -GlcNAc-(1-4)- α -Rha-(1-. Dentro de la agrupación *wb_{KpO12}* también se han hallado genes implicados en el transporte de la cadena polisacáridica hacia el periplasma, lugar

en el que se produce la unión del antígeno O al núcleo-lípido A para dar lugar a la molécula de LPS completa (Whitfield *et al.*, 1997). Los genes *wzm* (ORF6) y *wzt* (ORF7) codifican para un sistema de transporte de tipo ABC-2 (*ATP Binding Cassette* 2) encargado del exporte del polímero. Así pues, la ruta de biosíntesis del antígeno O12 es del tipo transportador ABC-dependiente. Se había sugerido que este mecanismo de síntesis se hallaba restringido para antígenos O homopolímeros lineales (Whitfield *et al.*, 1997). Hasta ahora, el único heteropolisacárido descrito que es sintetizado por un mecanismo transportador ABC-dependiente era el antígeno O4 de *S. marcescens* (Saigi *et al.*, 1999). El antígeno O12 de *K. pneumoniae* es otro ejemplo de antígeno O heteropolimérico que se produce por esta vía. Podemos concluir pues que no sólo los antígenos O homopolímeros pueden ser sintetizados por el mecanismo transportador ABC-dependiente, sino que también antígenos heteropolímeros lineales pueden utilizar este mecanismo para su biosíntesis.

La elevada semejanza entre los conjuntos de genes *wb_{KpO12}* y *wb_{SmO4}*, así como entre las estructuras químicas de los antígenos para los cuales codificaban, ya que ambos eran heteropolímeros cuyas subunidades estaban formadas por residuos de ramnosa y glucosa o N-acetilglucosamina unidos mediante un enlace α 1-4, nos llevó a estudiar la especificidad de los dos sistemas mediante experimentos de complementación utilizando mutantes en diversos genes de los respectivas agrupaciones génicas. Dado que la semejanza entre las agrupaciones era especialmente elevada la región final, nuestros estudios se centraron en el bloque formado por los genes: *wbbL*, *wzm*, *wzt* y *wbbA/B*.

El gen *wbbL* de *K. pneumoniae*, que codifica para una putativa ramnosil transferasa, recupera la producción de antígeno O4 en un mutante en este gen de *S. marcescens*. Resultados similares se habían obtenido al introducir el gen *wbbL* de *S. marcescens* en *E. coli* K-12. Esta cepa de *E. coli* es O16⁻ y contiene la mutación *rfb-50*, que puede ser complementada por el gen *wbbL* de *S. marcescens*, produciendo de nuevo su antígeno O16 (Rubirés *et al.*, 1997). Esto sugiere que las proteínas WbbL son ramnosil transferasas capaces de transferir de forma eficiente ramnosa tanto a la glucosa (en el caso del antígeno O4 de *S. marcescens*) como a la N-acetilglucosamina (en el caso del antígeno O16 de *E. coli* o el antígeno O12 de *K. pneumoniae*).

Ni las proteínas que forman el transportador ABC que exporta el antígeno O al periplasma (Wzm y Wzt), ni las proteínas finales de la agrupación génica (WbbA en *S. marcescens* y WbbB en *K. pneumoniae*) eran intercambiables entre ambas bacterias.

Este hecho da a entender, por un lado, que sus sistemas de exporte del antígeno tipo transportador ABC presentan una especificidad muy elevada, ya que no son capaces de reconocer otros polímeros a pesar de que estos sean muy similares. Por otro lado, las diferencias existentes en la segunda mitad de las proteínas finales, que pueden albergar alguna función desconocida, podrían explicar el hecho de que éstas no sean intercambiables.

Todos estos resultados indican que la especificidad de los dos antígenos O estudiados depende tanto de la proteína final como del mecanismo de exporte del antígeno O. Esto queda demostrado al observar que el antígeno O puede ser cambiado en ambas bacterias cuando el bloque formado por los tres últimos genes de la agrupación génica *wb* de *S. marcescens* O4 es introducido en un mutante en alguno de estos tres genes de *K. pneumoniae* O12, y viceversa. Existen estudios significativos sobre los efectos de la transferencia lateral de genes en la evolución y diversificación de los antígenos O (Reeves, 1993; Sugiyama *et al.*, 1998), y diversos artículos han descrito la síntesis de antígenos O alterados por cepas con genes de la agrupación *wb* mutados en las cuales han sido clonados genes de otras cepas (Kogan *et al.*, 1993; Morona *et al.*, 1995). Podemos especular que una situación similar es la que hemos reproducido mediante las complementaciones cruzadas.

El porcentaje de G+C del conjunto de genes *wb_{KpO12}* es del 46%, inferior al 53-58% esperado para las especies del género *Klebsiella* (Ørskov, 1984). Esta disminución en el porcentaje de G+C es característica de algunos grupos de genes *wb* y sugiere que estos han sido transferidos desde otras especies en épocas relativamente recientes (Schnaitman y Klena, 1993). En muchos casos, se ha hallado que el contenido de G+C es incluso menor en las regiones menos conservadas de la agrupación que en las regiones más conservadas, y en las regiones más conservadas es menor que en las regiones que flanquean estas agrupaciones. Este hecho indica que estos conjuntos de genes pueden haberse formado mediante varios intercambios genéticos ancestrales que involucraron organismos muy distintos (Reeves, 1993). Resulta significativo que en el caso que nos ocupa, la agrupación *wb_{KpO12}*, es la región final la que presenta un menor porcentaje de G+C, y que sea esta la región que defina la especificidad del antígeno O12 de *K. pneumoniae* frente al antígeno O4 de *S. marcescens*.

5 Caracterización de los genes responsables de la síntesis del núcleo del LPS en *Klebsiella pneumoniae* 52145 (O1:K2).

5.1 Precedentes

El serotipo capsular K2 de *K. pneumoniae* se encuentra entre los tipos capsulares más comúnmente aislados en pacientes humanos y las cepas que expresan este serotipo se consideran especialmente propicias a ser virulentas (Podschun y Ullman, 1998). Por otro lado, el antígeno O1 se halla aproximadamente en el 40% de los aislados clínicos de *K. pneumoniae*, siendo el antígeno aislado con más frecuencia según diversos estudios epidemiológicos (Trautmann *et al.*, 1997; Hansen *et al.*, 1999). La cepa 52145 de *K. pneumoniae*, sobre la cual se realizó este estudio, expresa el serotipo capsular K2 y el antígeno O1, y se considera especialmente virulenta.

Nos propusimos estudiar el núcleo del LPS de esta cepa y realizar una caracterización funcional de los genes responsables de la síntesis de este oligosacárido, lo cual quizá nos permitiría deducir si el núcleo del LPS podía jugar algún papel importante en la determinación de la virulencia de esta bacteria. Previamente habíamos clonado y secuenciado la agrupación génica *waa* de *K. pneumoniae* cepa C3 (Regué *et al.*, 2001). Además, estudios anteriores habían descrito parcialmente la estructura del núcleo del LPS de algunas cepas de *K. pneumoniae*, observándose ligeras diferencias entre ellos a nivel del núcleo externo (Süsskind *et al.*, 1998; Severn *et al.*, 1996), aunque, tal y como posteriormente se demostró en trabajos aparecidos durante la realización de este estudio, algunas de estas diferencias podían ser debidas a artefactos producidos durante la caracterización química (Vinogradov *et al.*, 2001; Vinogradov y Perry, 2001) (fig. 5.10). Curiosamente, la cepa 52145 era resistente al fago FC3-10, que tiene como receptor el núcleo del LPS de *K. pneumoniae* (Ciurana, 1990), lo cual quizá indicaba variaciones en la estructura del núcleo de su LPS.

5.2 Secuencia de la agrupación génica *waa* en la cepa 52145

La agrupación *waa* de *K. pneumoniae* cepa C3 (O1:K66) está constituida por trece genes que codifican para las diversas proteínas implicadas en la síntesis del núcleo del LPS, principalmente glicosil transferasas (fig. 5.1). A partir de la secuencia de este conjunto de genes, que esperábamos bastante conservada en las distintas cepas de *K. pneumoniae*, se realizaron amplificaciones por PCR utilizando como molde ADN cromosómico de la cepa 52145 de *K. pneumoniae* (O1:K2) y cebadores derivados de la

secuencia de la cepa C3. Se observó que, si bien obteníamos la amplificación esperada con la mayoría de las parejas de cebadores (S₇-Nih5.A5, Nuk1-Kor, Nuk5-Nuk8 y Nuk7-Nuk10; ver Material y Métodos, 2.13.11.3), la pareja WaaLOR-WaaLOF no generaba amplificación en la cepa 52145 (fig. 5.1). Por lo tanto, era posible que la región comprendida entre estos dos cebadores, que contenía tres pautas de lectura en *K. pneumoniae* C3, fuera diferente en la cepa 52145, por lo que se procedió a su secuenciación, diseñando oligonucleótidos a partir las regiones conservadas en ambas agrupaciones génicas.

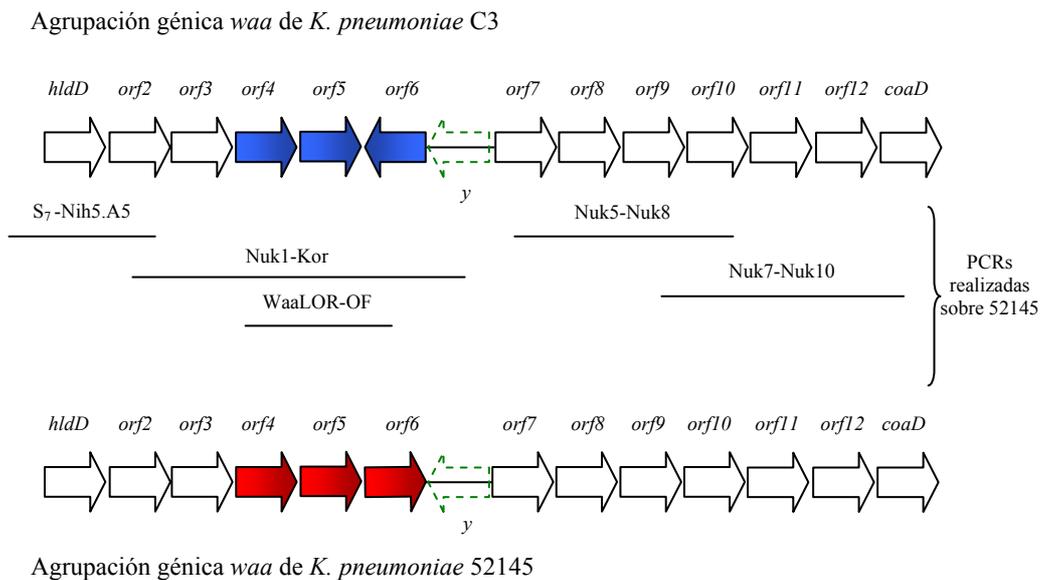


Fig. 5.1. Esquema de la agrupación génica *waa* en las cepas C3 y 52145 de *K. pneumoniae*. Las ORFs marcadas en rojo y azul son las diferentes en ambas cepas. Pueden observarse las regiones que determinan las parejas de cebadores utilizadas para la comprobación mediante PCR de la conservación de la agrupación en 52145. Además, se indica con una flecha formada por líneas discontinuas (y), en verde, el posible gen que alberga la región entre las *orfs* 6 y 7.

La secuencia obtenida contenía tres ORFs (*Open Reading Frames*) diferentes a las halladas en la agrupación *waa* de *K. pneumoniae* C3 (fig. 5.1), lo cual indicaba que la agrupación *waa* no estaba tan conservada como se esperaba en *K. pneumoniae*. Se secuenciaron las regiones restantes del grupo de genes en la cepa 52145 para determinar si existían más diferencias. No se observaron otras diferencias importantes entre *waa*₅₂₁₄₅ y *waa*_{C3}. Además, la conservación de la región intergénica presente entre la ORF6 y ORF7 de ambas agrupaciones sugería que esta región podía codificar para una nueva proteína no detectada anteriormente. Esta ORF fue denominada y, para no alterar la nomenclatura previamente otorgada a las ORFs restantes.

5.3 Construcción y determinación de algunas características fenotípicas de los mutantes de diversos genes de la agrupación *waa*₅₂₁₄₅

Se construyeron mutantes mediante mutagénesis dirigida en todos los genes de la agrupación génica *waa* de la cepa 52145 (ver Material y Métodos, 2.13.12.1). Estas mutaciones producían deleciones en el gen a mutar manteniendo la pauta de lectura dentro de éste, con el fin de evitar los posibles efectos polares que pudieran afectar al resto de los genes de la agrupación (ver Material y Métodos, 2.13.12.1). Mediante este sistema se construyeron mutantes por deleción en las ORFs Y, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 12, que fueron nombrados según la nomenclatura de la cepa y la ORF delecionada (ej. 52145 Δ ORF2, 52145 Δ ORFY, etc). En todos los casos, la deleción fue comprobada mediante la secuenciación de la región que flanqueaba la mutación y la comprobación del mantenimiento de la pauta de lectura.

5.3.1 Determinación del perfil electroforético del LPS de los mutantes en geles de tris-tricina

Se obtuvieron muestras de LPS de todos los mutantes construidos y se determinó su perfil electroforético en geles de tris-tricina (SDS-Tricine-PAGE). Este tipo de geles eran los más apropiados para la visualización de las posibles alteraciones del núcleo del LPS provocadas por las mutaciones, puesto que dan lugar a una mejor definición en las fracciones de bajo peso molecular del LPS.

Tal y como se pudo observar en estos geles (fig. 5.2), la mayoría de las mutaciones provocaban variaciones en el núcleo del LPS, que se detectaban por cambios en el patrón de migración del oligosacárido. Los núcleos del LPS de muchas de las cepas mutadas migraban más rápido que el núcleo del LPS de la cepa salvaje, indicando la pérdida de uno o varios residuos del oligosacárido. Dado que el patrón de migración está determinado tanto por el peso molecular del oligosacárido como por la carga de sus residuos, el hecho de que un núcleo de un LPS migrara más rápido que otro no podía relacionarse directamente con la pérdida de más residuos sacarídicos por parte del núcleo del LPS más rápido. Además, muchos de los mutantes no presentaban antígeno O en su LPS.

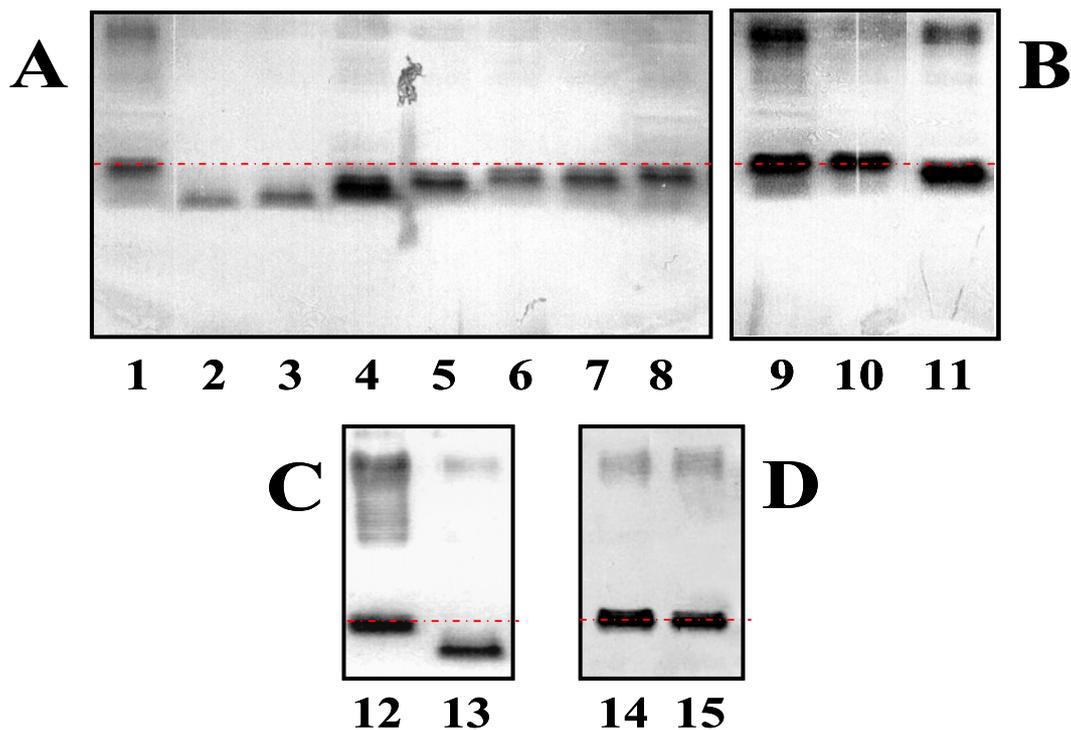


Fig. 5.2. (A, B, C y D) SDS-Tricine-PAGE teñidos con nitrato de plata de muestras de LPS de los diversos mutantes de *K. pneumoniae*. Las muestras de LPS se obtuvieron según el método de Darveau y Hancock, 1983. Carriles: 1, *K. pneumoniae* 52145 (O1:K2); 2, Mutante Δ ORF3; 3, Mutante Δ ORF2; 4, Mutante Δ ORF8; 5, Mutante Δ ORF9; 6, Mutante Δ ORFY; 7, Mutante Δ ORF4; 8, Mutante Δ ORF6; 9, *K. pneumoniae* 52145 (O1:K2); 10, Mutante Δ ORF5; 11, Mutante Δ ORF7; 12, *K. pneumoniae* 52145 (O1:K2); 13, Mutante Δ ORF12; 14, *K. pneumoniae* 52145 (O1:K2); 15, Mutante Δ ORF10. La línea roja discontinua indica la migración del núcleo del LPS de *K. pneumoniae* 52145 (control), para facilitar la comparación con el perfil electroforético de los mutantes.

5.3.2 Sensibilidad de los mutantes a detergentes y antibióticos catiónicos

Es sabido que alteraciones producidas a nivel del núcleo interno del LPS de muchas bacterias dan lugar a un fenotipo pleiotrópico denominado *deep-rough*, que se caracteriza, entre otros efectos, por una hipersensibilidad de la bacteria a antibióticos catiónicos y a detergentes. Decidimos estudiar la sensibilidad de los diferentes mutantes a algunos de estos agentes (ver Material y Métodos, 2.12), para determinar si alguno de ellos exhibía un fenotipo *deep-rough*, lo cual podía sugerir que la mutación afectaba a residuos del núcleo interno del LPS. Los ensayos se realizaron con polimixina B (un péptido catiónico antimicrobiano), SDS (dodecil sulfato sódico) y deoxicolato (fig. 5.3).

Tal y como se observa en los distintos paneles (fig. 5.3), algunos mutantes muestran una sensibilidad muy elevada a algunos de los agentes con los que realizamos el estudio, en relación a la cepa control. Esto sugiere la presencia de alteraciones importantes en la estructura del núcleo de su LPS, lo que a su vez se traduciría en una disminución en la integridad de su membrana externa y, por lo tanto, en una mayor sensibilidad de estos mutantes a detergentes y antibióticos catiónicos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sin detergente	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 mg/ml	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	-
5 mg/ml	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	-
1 mg/ml	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-
0,5 mg/ml	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-
0,1 mg/ml	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+
0,05 mg/ml	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+

A. Determinación de la sensibilidad al SDS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sin detergente	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25 mg/ml	+	-	+/-	+/-	+	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-
20 mg/ml	+	-	+/-	+/-	+	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-
10 mg/ml	+	-	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+
5 mg/ml	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 mg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,5 mg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

B. Determinación de la sensibilidad al deoxicolato

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sin antibiótico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6 µg/ml	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-	+/-	-
5 µg/ml	+	+/-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
4 µg/ml	+	+/-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+/-
3 µg/ml	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
2 µg/ml	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
1 µg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

C. Determinación de la sensibilidad a la polimixina B

Fig. 5.3. Determinación de la sensibilidad de *K. pneumoniae* y de los diversos mutantes en la agrupación génica *waa* a (A) SDS, (B) Deoxicolato, y (C) Polimixina B. A la izquierda de cada panel quedan indicadas las concentraciones de cada detergente o antibiótico. Columnas: **1**, *K. pneumoniae* 52145 (O1:K2); **2**, Mutante Δ ORF3; **3**, Mutante Δ ORF2; **4**, Mutante Δ ORF4; **5**, Mutante Δ ORF5; **6**, Mutante Δ ORF6; **7**, Mutante Δ ORFY; **8**, Mutante Δ ORF7; **9**, Mutante Δ ORF8; **10**, Mutante Δ ORF9; **11**, Mutante Δ ORF10; **12**, Mutante Δ ORF12. El signo + indica que hay crecimiento y representa DO_{600nm} superiores a 0,25. El signo - indica que no hay crecimiento y representa DO_{600nm} inferiores a 0,05. Los resultados son la media de un mínimo de tres experimentos independientes.

5.3.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de diversos agentes antimicrobianos frente a los mutantes obtenidos

Dado que se observaron diferencias importantes en la resistencia de los diversos mutantes a la polimixina B y a los detergentes, decidimos comprobar la concentración mínima inhibitoria de varios antibióticos frente a las diversas cepas mutantes y a la cepa salvaje de *K. pneumoniae* 52145, para ver si ésta también se veía afectada por las alteraciones provocadas por las mutaciones (ver Material y Métodos, 2.12). En general no se observaron grandes variaciones, aunque los mutantes 52145 Δ ORF1 y 52145 Δ ORF2 presentaban CMIs bastante más reducidas que las de la cepa parental a varios de los antibióticos testados, como la eritromicina o el ácido nalidíxico (tabla 5.1).

Tabla 5.1. CMIs (mg/L) de antimicrobianos frente a *K. pneumoniae* 52145 y los diversos mutantes.

CEPA	AMP	AMC	PIP	FOX	CTX	CAZ	FEP	MEC ^a	IPM	MPM
<i>K. pneumoniae</i> 52145	1-1.5	1	1.5	3	0.023	0.125	0.032	0.38	0.125	0.016
52145 Δ ORF2	0.75	0.5	0.25	3-4	0.016	0.047	0.047	0.047	0.047	0.008
52145 Δ ORF3	1	1	0.75	12	0.064	0.125	0.047	0.19	0.094	0.012
52145 Δ ORF4	2	1	1.5	3-4	0.032	0.125	0.032	0.19	0.125	0.012
52145 Δ ORF5	1.15	1.5	1.5	3	0.032	0.19	0.032	0.25	0.19	0.016
52145 Δ ORF6	1.5	1.5	1	4	0.032	0.19	0.047	0.5	0.25	0.016
52145 Δ ORFY	2	1.5	2	4	0.032	0.25	0.064	0.5	0.25	0.023
52145 Δ ORF7	1.5	0.75	2	3	0.023	0.125	0.032	0.5	0.125	0.023
52145 Δ ORF8	2	1	1.5	4	0.047	0.125	0.032	0.38	0.125	0.012
52145 Δ ORF9	2	1.5	2	3	0.047	0.25	0.032	0.25	0.125	0.023
52145 Δ ORF10	1.5	1	2	4	0.047	0.125	0.032	0.25	0.19	0.023
52145 Δ ORF12	1	1	1.5	3	0.047	0.125	0.032	0.19	0.19	0.016

CEPA	NAL	CIP	LVX	AMK	GEN	TOB	CLO	SXT	ERY
<i>K. pneumoniae</i> 52145	3	0.016	0.064	1	0.25	0.5	6	0.125	24
52145 Δ ORF2	0.75	0.016	0.047	1	0.125	0.25	3	0.25	1.5
52145 Δ ORF3	0.5	0.008	0.047	1	0.064	0.094	4	0.25	6
52145 Δ ORF4	3	0.016	0.064	1-1.5	0.25	0.5	4	0.125	32
52145 Δ ORF5	3	0.016	0.064	0.75	0.19	0.25	6	0.25	32
52145 Δ ORF6	4	0.016	0.064	1.5	0.25	0.38	8	0.125	32-64
52145 Δ ORFY	3	0.012	0.047	1	0.25	0.5	8	0.25	16-32
52145 Δ ORF7	3	0.016	0.064	1.5	0.5	0.75	6	0.25	32
52145 Δ ORF8	1.5-2	0.016	0.047	2	0.25	0.25	8	0.125	32
52145 Δ ORF9	3	0.016	0.064	1.5	0.25	0.5	8	0.125	24
52145 Δ ORF10	1.5	0.016	0.064	1	0.25	0.5	8	0.125	32
52145 Δ ORF12	1.5	0.016	0.047	1.5	0.75	0.75	4	0.125	32

Clave: **AMP:** ampicilina; **AMC:** amoxicilina-clavulánico (2/1; la CMI está referida a la concentración de amoxicilina); **PIP:** piperacilina; **FOX:** cefoxitina; **CTX:** cefotaxima; **CAZ:** ceftazidima; **FEP:** cefepima; **MEC:** mecilinam; **IPM:** imipenema; **MPM:** meropenema; **NAL:** ácido nalidíxico; **CIP:** ciprofloxacina; **LVX:** levofloxacina; **AMK:** amikacina; **GEN:** gentamicina; **TOB:** tobramicina; **CLO:** cloramfenicol; **SXT:** cotrimoxazol; **ERY:** eritromicina.

^a En el halo de mecilinam (MEC) crecen colonias salvo en 52145 Δ ORF2.

5.3.4 Dosis letal $_{50}$ (DL $_{50}$)

Las alteraciones provocadas en el núcleo del LPS de los mutantes podían afectar a la virulencia de estos, dado que muchos de ellos carecían de antígeno O y presentaban cambios en otras estructuras superficiales como la cápsula. Además, no sabíamos hasta que punto las variaciones en la estructura química del núcleo, que no afectaran directamente al antígeno O ó a la cápsula, podían alterar la virulencia de la bacteria. El efecto de las mutaciones sobre la patogenicidad bacteriana se determinó mediante el cálculo de la dosis letal $_{50}$ en ratones (tabla 5.2).

Tabla 5.2. Dosis letal $_{50}$ en ratones de *K. pneumoniae* 52145 y los diversos mutantes.

Cepa	DL $_{50}$ ^a
<i>K. pneumoniae</i> 52145	10 ^{2,1}
52145ΔORF2	10 ^{7,8}
52145ΔORF3	10 ^{7,8}
52145ΔORF4	10 ^{5,3}
52145ΔORF5	10 ^{5,1}
52145ΔORF6	10 ^{5,2}
52145ΔORFY	10 ^{5,1}
52145ΔORF7	10 ^{2,8}
52145ΔORF8	10 ^{7,5}
52145ΔORF9	10 ^{4,8}
52145ΔORF10	10 ^{5,2}
52145ΔORF12	10 ^{4,6}

^a Los valores son resultado de tres experimentos independientes. Máxima desviación estándar < 10^{0,5}

5.4 Análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas de las ORFs y caracterización funcional

Basándonos en los resultados hasta ahora obtenidos, en los análisis de homologías de las secuencias de aminoácidos deducidas de las ORFs de la agrupación *waa*₅₂₁₄₅, y en otros ensayos realizados sobre mutantes en algunas ORFs concretas, tratamos de caracterizar funcionalmente los genes que componen la agrupación génica de biosíntesis del núcleo de *K. pneumoniae* 52145. En los casos en los que se realizaron estudios de complementación con plásmidos conteniendo diferentes genes, como control también se llevaron a cabo con los vectores sin ningún fragmento clonado. En ningún caso, estas últimas pruebas complementaron los distintos mutantes.

La ORF inicial fue denominada *hldD*, pues mostraba una identidad del 98% con la ADP-L-glicero-D-mano-heptosa epimerasa, implicada en la biosíntesis de la L,D-

heptosa, de varias enterobacterias. Además, la localización que ocupa en la agrupación *waa* de *K. pneumoniae* es la que comúnmente ocupa en agrupaciones *waa* de otras enterobacterias. Por motivos similares, la ORF final de la agrupación fue nombrada como gen *coaD*, puesto que la proteína para la que codificaba mostraba una similitud de más del 90% con esta enzima en otras enterobacterias y el lugar que ocupaba, en el extremo 3' de la agrupación *waa*, es en el que suele hallarse en otras bacterias. La enzima para la que codifica esta ORF no está relacionada con la biosíntesis del núcleo, sino con la síntesis de la coenzima A y mutaciones en dicho gen son letales (Geerlof *et al.*, 1999).

5.4.1 ORF2

La ORF2 codifica para una proteína de 352 aminoácidos que presentaba elevados niveles de homología, más del 90%, con la ADP-heptosa-LPS heptosil transferasa II de diferentes bacterias Gram negativas. Además la proteína contenía un dominio conservado característico de una familia de enzimas con función heptosil transferasa (glicosil transferasas de la familia 9). Por tanto, podíamos postular que el gen codificaba para la heptosil transferasa II, encargada de la transferencia de la HepII a la HepI en el núcleo interno de *K. pneumoniae*.

El núcleo del LPS del mutante 52145 Δ ORF2 migraba mucho más rápido que el de la cepa salvaje (fig. 5.2), lo que podría indicar la pérdida de una gran cantidad de residuos por parte del oligosacárido. Además, el mutante era antígeno O⁻, lo cual concordaría con el hecho de haber perdido residuos a nivel del núcleo interno, ya que se imposibilitaría la construcción del resto del núcleo y la unión en el núcleo externo del antígeno O, tal y como se esperaría teniendo en cuenta la estructura descrita del núcleo de *K. pneumoniae* (fig. 5.10). Por otro lado, el mutante presentaba una elevada sensibilidad a la polimixina B y al SDS, fenotipo esperado de un mutante con alteraciones a nivel del núcleo interno (fig. 5.3).

Otra característica a destacar del mutante fue su resistencia al fago Φ_2 que reconoce el antígeno capsular K2. Esto indicaba que el mutante carecía de cápsula, a pesar de que los genes implicados en la producción de la cápsula no habían sido alterados. Estudios de la DL₅₀ del mutante realizados con ratones indicaban que el mutante presentaba una virulencia mucho menor que *K. pneumoniae* 52145 (tabla 5.2). Además, en estudios previos realizados en por nuestro grupo de investigación se había demostrado que la proteína WaaF de *K. pneumoniae* C3 complementaba la cepa

SA3789 de *Salmonella enterica* serovar typhimurium, que contenía una mutación en el gen *waaF* (Regué *et al.*, 2001). Por otro lado, en un trabajo aparecido durante la realización de este estudio se caracterizó funcionalmente la proteína WaaF en la cepa R20 (O1/K20) de *K. pneumoniae*, demostrando que actuaba como heptosil transferasa II (Noah *et al.*, 2001).

Para acabar de confirmar que la ORF2 codificaba para la enzima implicada en la transferencia de la HepII a la HepI en la cadena principal del núcleo del LPS, fue purificado LPS del mutante y fue caracterizado químicamente mediante cromatografía de gases (ver Material y Métodos, 2.6.4 y 2.6.6.3). Tan solo se detectó la presencia de heptosa, y en una cantidad mucho menor a la hallada en *K. pneumoniae* 52145 (tabla 5.3). El resto de los monosacáridos cuantificados desaparecían y no se detectaba ningún otro pico significativo en el cromatograma.

Teniendo en cuenta todos estos datos, el producto de la ORF2 recibió el nombre de WaaF.

Tabla 5.3. Composición química del LPS de *K. pneumoniae* cepa 52145 y del mutante 52145ΔORF2

LPS	Gal ^a	GalA ^a	Glc ^a	L,D-Hep ^a
52145 (salvaje)	919	83	387	228
52145ΔORF2	ND	ND	ND	286

^a Cantidades de los monosacáridos expresadas en nanomoles por miligramo de LPS.
ND, no detectado

5.4.2 ORF3

La proteína codificada por la ORF3, de 320 aminoácidos, presentaba niveles de un 89% de similitud y de un 80% de identidad con la heptosil transferasa I de *E. coli* K12 (Chen y Coleman, 1993) y de *S. enterica* serovar typhimurium LT2 (Sirisena *et al.*, 1992), así como con las de otras bacterias entéricas. Esta proteína ya mostraba ciertas diferencias en sus aminoácidos finales con la proteína codificada por la ORF3 de *K. pneumoniae* C3, aunque el nivel de homología y de identidad continuaba siendo muy elevado, 95% y 93%, respectivamente. Como en el caso anterior, la enzima codificada por este gen presentaba el dominio típico de las heptosil transferasas del núcleo del LPS.

El perfil electroforético del núcleo del LPS del mutante 52145 Δ ORF3 migraba aún más rápido que el del mutante 52145 Δ ORF2, indicando profundas alteraciones en su estructura, y su LPS también carecía de antígeno O (fig. 5.2). Además, también presentaba elevada sensibilidad a los detergentes, lo cual se relacionaba con alteraciones a nivel del núcleo interno (fig. 5.3). Sin embargo, era, en comparación con el mutante 52145 Δ ORF2, bastante resistente a la polimixina B. Si esto es debido al mecanismo de actuación de este antibiótico catiónico, o a algún tipo de mutación compensatoria, es algo que no hemos podido determinar.

De la misma forma que el mutante 52145 Δ ORF2, el mutante en la ORF3 era resistente al fago Φ_2 , y por lo tanto carecía de polisacárido capsular.

Como en el caso anterior, la proteína WaaC de *K. pneumoniae* C3 era capaz de complementar la cepa SA1377 de *S. enterica* serovar typhimurium, mutada en el gen *waaC* (Regué *et al.*, 2001), y la caracterización funcional de la enzima WaaC en *K. pneumoniae* R20 demostró que ésta era una heptosil transferasa I (Noah *et al.*, 2001).

Nuevamente, tratamos de reconfirmar, mediante cromatografía de gases, que la enzima codificada por ORF3 era la encargada de transferir la HepI del núcleo interno de del LPS de *K. pneumoniae* 52145. No se observó la presencia de ninguno de los monosacáridos cuantificados al no detectarse ningún pico significativo en el cromatograma, lo cual concordaba con el hecho de que la HepI se encontrara al inicio de la cadena principal. La eliminación de esta heptosa impedía la formación del resto de la cadena oligosacarídica del núcleo del LPS.

Por lo tanto la ORF3 fue denominada *waaC*. Los genes *waaF* y *waaC* codificaban para la heptosil transferasa I y II, respectivamente, implicadas en la transferencia de la HepI y la HepII al Kdo para la formación del núcleo interno del LPS de *K. pneumoniae* 52145.

5.4.3 ORF4

Esta ORF codificaba para una proteína de 390 aminoácidos que presentaba un dominio característico de enzimas con función glicosil transferasa (grupo 1), capaces de transferir azúcares activados en la síntesis de diversas estructuras, incluido el LPS. La proteína mostraba niveles de homología de alrededor de un 50% con presuntas glicosil transferasas de bacterias bastante alejadas, algunas de ellas posiblemente implicadas en la síntesis del LPS. Además, se observó que esta proteína presentaba un 72% de homología y un 55% de identidad con una glicosil transferasa de la agrupación génica

waa de *Serratia marcescens*, cepa N28b, implicada en la síntesis del núcleo del LPS de esta bacteria que actualmente también está siendo caracterizado por nuestro grupo de investigación (Nuria Coderch, tesis doctoral en preparación).

El mutante 52145 Δ ORF4 mostraba un patrón de migración del núcleo de su LPS ligeramente más rápido que el de *K. pneumoniae* 52145, lo que sugería una menor alteración en el oligosacárido que en el caso de los mutantes anteriormente mencionados (fig. 5.2). Tampoco presentaba antígeno O, por lo que era posible que careciera de alguno de los residuos finales del núcleo externo del LPS. El hecho de que no se observara una especial sensibilidad de este mutante a los detergentes o a la polimixina B, parecía corroborar la anterior opción (fig. 5.3). Además, el mutante sí presentaba cápsula, por lo que era sensible al fago Φ_2 , y presentaba una virulencia reducida en estudios realizados con ratones (tabla 5.2).

La ORF4 de la agrupación *waa* de *K. pneumoniae* C3 también codificaba para una proteína con un dominio característico de enzimas con función glicosil transferasa. El hecho de que las proteínas codificadas por la ORF4 de la cepa C3 y de la cepa 52145 de *K. pneumoniae* fueran muy diferentes entre sí, a pesar de ser las dos glicosil transferasas, parecía indicar que estaban implicadas en la transferencia de residuos diferentes a la cadena principal del núcleo del LPS de *K. pneumoniae*, de forma que daban lugar a dos estructuras diferentes. Así pues, estas diferencias genéticas podían traducirse en diferencias a nivel estructural entre el núcleo del LPS de *K. pneumoniae* C3 y *K. pneumoniae* 52145.

5.4.4 ORF5

La proteína de 416 aminoácidos deducida de la ORF5 mostraba homologías, alrededor de un 50% (y unas identidades del 30%), con la antígeno O ligasa de *E. coli* K-12 y R4, entre otras (Heinrichs *et al.*, 1998). Además, como en el caso de la ORF4, se observaba una homología ligeramente superior con la presunta ligasa de *S. marcescens* N28b. Por otro lado, el análisis de los dominios transmembrana de esta proteína predijo la presencia de 11 hélices transmembrana, hecho muy característico de estas enzimas.

Respecto a la sensibilidad al fago Φ_2 , el mutante era sensible. Además, mostraba una menor virulencia en ratones que *K. pneumoniae* 52145, lo cual podía ser debido a que no poseía antígeno O (tabla 5.2).

Si lo que parecían indicar los análisis comparativos de la proteína era cierto, el mutante 52145 Δ ORF5 debería ser O⁻ y, en principio, no presentar ninguna alteración

más en el núcleo del LPS. Esto es lo que se desprende de la observación de su perfil electroforético (fig. 5.2, B). Por otra parte, ningún otro mutante de los realizados sobre los genes de la agrupación *waa*₅₂₁₄₅ es antígeno O⁻ sin mostrar ninguna otra alteración del núcleo en geles de tris-tricina. Asimismo, 52145ΔORF5 no mostraba una especial sensibilidad a detergentes o a la polimixina B, lo que indicaba que, además de la pérdida del antígeno O, el núcleo del LPS no se encontraba alterado (fig. 5.3).

Tabla 5.4. Composición química del LPS de *K. pneumoniae* cepa 52145 y del mutante 52145ΔORF5

LPS	Gal ^a	GalA ^a	Glc ^a	L,D-Hep ^a
52145 (salvaje)	919	83	387	228
52145ΔORF5	ND	105	412	251

^a Cantidades de los monosacáridos expresadas en nanomoles por miligramo de LPS.
ND, no detectado

Si ORF5 codificaba para la antígeno O ligasa, la determinación química del LPS del mutante 52145ΔORF5 debería ser igual a la de la cepa salvaje, excepto por una gran reducción (o desaparición) de la cantidad de galactosa, puesto que es éste el monosacárido que forma su antígeno O. La caracterización química, mediante

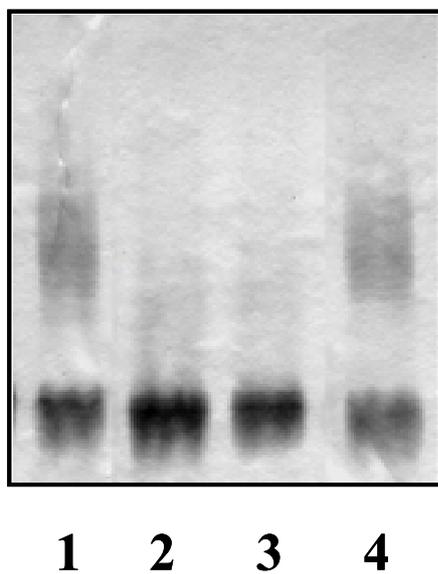


Fig. 5.4. SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de muestras de LPS de *K. pneumoniae*. Las muestras de LPS se obtuvieron según el método de Darveau y Hancock, 1983. Carriles: 1, *K. pneumoniae* 52145; 2, 52145ΔORF5 (*waaL*⁻); 3, 52145ΔORF5 complementado con *waaL* de *K. pneumoniae* C3; 4, 52145ΔORF5 complementado con *waaL* de *K. pneumoniae* 52145.

cromatografía de masas del LPS de este mutante arrojó datos que confirmaban esta hipótesis (tabla 5.4).

Todos los datos indicaban que el gen codificaba para la antígeno O ligasa, por lo que fue denominado *waaL*.

Además, el mutante 52145ΔORF5 fue complementado con pGEMT-ORF5₅₂₁₄₅, y se observó, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, que recuperaba el antígeno O (fig. 5.4). Sin embargo, si el mutante era

complementado con la ORF5 de *K. pneumoniae* C3, que codifica para la antígeno O ligasa de esta cepa (Regué et al., 2001), no recuperaba el antígeno O. Las diferencias existentes entre estas enzimas, por lo tanto, no permitían una complementación cruzada.

5.4.5 ORF6

ORF6 codifica para una proteína de 330 aminoácidos que contiene un dominio conservado característico de glicosil transferasas de la familia 2. La secuencia mostraba homologías con probables glicosil transferasas, destacando el 56% de similitud, y el 36% de identidad, que compartía con una presunta β -glicosil transferasa implicada en la síntesis del núcleo externo de *Yersinia enterocolitica* (Skurnik et al., 1995). De nuevo, el mayor nivel de homología, 64% (y 41% de identidad), lo mostraba con una proteína presente en la agrupación *waa* de *S. marcescens* N28b.

El mutante era sensible al fago Φ_2 , carecía de antígeno O y el núcleo de su LPS migraba ligeramente más rápido que la cepa control, lo que indicaba poca alteración en el núcleo del LPS (fig. 5.2). No presentaba una especial sensibilidad a los detergentes, aunque extrañamente si era muy sensible a la acción de la polimixina B (fig. 5.3). Si el residuo, o residuos, alterados por la mutación juegan algún papel importante en la resistencia a este péptido catiónico es algo que desconocemos. Por último el mutante era menos virulento de lo normal en infecciones experimentales en ratones (tabla 5.2).

Como en el caso de la ORF4, la ORF6 de la agrupación *waa* de *K. pneumoniae* C3 era diferente a la ORF6 de la cepa 52145. En este caso la proteína codificada por la ORF6 de la cepa C3 presentaba un dominio característico de enzimas con función heptosil transferasa. Dado que en el núcleo de *K. pneumoniae* se reconocían cuatro residuos de heptosa (Vinogradov y Perry, 2001; fig. 5.10); que la HepI y la HepII eran transferidas por WaaC y WaaF, respectivamente; y que la HepIII (heptosa ramificada unida a la HepII), era transferida por el producto de la ORF7, como veremos más adelante, la proteína codificada en la ORF6 de *K. pneumoniae* C3 debía estar involucrada en la transferencia de la heptosa terminal del núcleo del LPS de *K. pneumoniae*. Por su parte, la proteína codificada por la ORF6 de *K. pneumoniae* 52145 no presentaba un dominio heptosil transferasa y era muy diferente a la ORF6 de la cepa C3, lo que sugería que su función era la de transferir un residuo diferente al núcleo del LPS de *K. pneumoniae* 52145. Esto implicaba diferencias a nivel del núcleo externo del LPS de las cepas C3 y 52145 de *K. pneumoniae*.

5.4.6 ORFY

ORFY codificaba para una proteína, que se transcribía en dirección contraria al resto de los genes de la agrupación, de 328 aminoácidos. La búsqueda de homologías de esta proteína no dio ningún resultado claro, aparte de similitudes con hipotéticas proteínas de especies muy alejadas, como *Magnetococcus* sp. Sin embargo, al comparar la secuencia de nucleótidos de la ORF, se observó una elevada similitud con otra presunta región intergénica presente en la agrupación *waa* de *S. marcescens* N28b. Tal grado de conservación indicaba que esta región también codificaba para una proteína en *S. marcescens* N28b, como también sucedía con *K. pneumoniae* C3.

El análisis del núcleo del LPS del mutante obtenido, 52145 Δ ORFY, mostró que este carecía de antígeno O y presentaba cierta variación en su perfil electroforético respecto a la cepa control. De hecho, el núcleo de su LPS migraba de forma muy similar al núcleo del LPS del mutante 52145 Δ ORF4 (fig. 5.2). Estas alteraciones fenotípicas observadas en el mutante 52145 Δ ORFY, indicaban que la ORFY era un gen que codificaba para una proteína implicada de una forma u otra en la síntesis del núcleo del LPS. El mutante, además, no presentaba una sensibilidad muy elevada al SDS o la polimixina B, pero sí al deoxicolato (fig. 5.3), poseía cápsula, puesto que era sensible al fago Φ_2 , y se mostraba menos virulento que *K. pneumoniae* 52145 (tabla 5.2).

5.4.7 ORF7

Al igual que ORF2 y ORF3, ORF7 presentaba un dominio conservado característico de enzimas con función heptosil transferasa. La proteína para la cual codificaba ORF7 constaba de 358 aminoácidos y exhibía homologías de un 60% con la ADP-heptosa-LPS heptosil transferasa III, WaaQ, de varias enterobacterias (Heinrichs *et al.*, 1998). Esta enzima era la responsable de la transferencia de la HepIII (ramificada) a la HepII en el núcleo interno del LPS. Una vez más, se hallaron elevadas similitudes, del 78% (64% de identidad), con la presunta heptosil transferasa III de *S. marcescens* N28b.

El núcleo del LPS del mutante obtenido, 52145 Δ ORF7, migraba más rápido que el de *K. pneumoniae* 52145 en geles de tris-tricina y presentaba antígeno O en cantidades similares a la cepa salvaje (fig. 5.2, B). Presentaba una cierta sensibilidad al SDS (fig. 5.3), era sensible al fago Φ_2 y su virulencia en ensayos realizados en ratones estaba ligeramente reducida (tabla 5.2).

Se realizó una obtención del LPS del mutante y se caracterizó químicamente por cromatografía de gases en comparación con la cepa salvaje, *K. pneumoniae* 52145 (ver Material y Métodos, 2.6.4 y 2.6.6.3). Se observó una reducción de la L,D-Hep en el LPS del mutante 52145 Δ ORF7 (tabla 5.5). Esto confirmaba que la ORF7 codificaba para un enzima involucrado en la transferencia de una heptosa. Al no hallar alteración en las cantidades de otros componentes del núcleo, ni en el antígeno O, es lógico pensar que la heptosa transferida es la ramificada, la HepIII.

Tabla 5.5. Composición química del LPS de *K. pneumoniae* cepa 52145 y del mutante 52145 Δ ORF7

LPS	Gal ^a	GalA ^a	Glc ^a	L,D-Hep ^a
52145 (salvaje)	919	83	387	228
52145 Δ ORF7	959	84	344	100

^a Cantidades de los monosacáridos expresadas en nanomoles por miligramo de LPS.

Todos los datos confirmaban la función heptosil transferasa III de la ORF7, por lo que dicho gen fue denominado *waaQ*.

5.4.8 ORF8

La proteína de 375 aminoácidos deducida de la ORF8 contenía un dominio conservado característico de glicosil transferasas de la familia 1, que transfieren residuos monosacáridicos activados. Aparte de un 80% de similitud y un 69% de identidad con una hipotética glucosil transferasa de la agrupación *waa* de *S. marcescens* N28b, presentaba homologías de un 45% (e identidades del 26%) con la glucosil transferasa I de *Salmonella enterica* serovar typhimurium, de *Pseudomonas aeruginosa* (Walsh *et al.*, 2000), de *Escherichia coli* (Heinrichs *et al.*, 1998), y de otras bacterias. Esta enzima, denominada WaaG, es la encargada de la transferencia la glucosa a la HepII del núcleo interno del LPS en estas bacterias.

El LPS de 52145 Δ ORF8 mostraba un perfil de migración en el gel de tris-tricina bastante más rápido que el de la cepa salvaje y era antígeno O⁻ (fig. 5.2). Además, su sensibilidad a los detergentes y a la polimixina B era muy elevada, lo parecía indicar alteraciones importantes en el núcleo de su LPS (fig. 5.3). Era Φ_2 resistente, lo que indicaba que no presentaba cápsula, y los estudios de DL₅₀ en ratones indicaban que era mucho menos virulento que *K. pneumoniae* 52145 (tabla 5.2).

Los análisis mediante espectrometría de masas llevados a cabo con el núcleo del LPS del mutante 52145ΔORF8 (Material y Métodos, 2.6.6.4) indicaron que éste estaba constituido por el Kdo, la HepI, la Hep II y la Glc unida a la HepI (fig. 5.5). El mutante, por lo tanto, carecía de la HepIII ramificada y del ácido galacturónico de la cadena

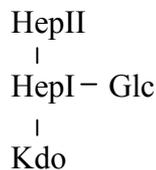


Fig. 5.5. Estructura del núcleo del mutante 52145ΔORF8.

principal unido a la HepII. Teniendo en cuenta que la proteína encargada de la transferencia de la HepIII era WaaQ, la enzima codificada por ORF8 debía ser la encargada de la transferencia del GalA a la HepII en el núcleo del LPS. Esto estaría acorde con los resultados obtenidos en la electroforesis en geles de tris-tricina y en los ensayos de sensibilidad a detergentes y péptidos catiónicos.

Dado que no se conocía otra enzima que cumpliera la misma función, es decir la transferencia de un residuo de ácido galacturónico a la HepII del núcleo del LPS, decidimos denominar al gen que codificaba para esta proteína *wabG*.

5.4.9 ORF9

La ORF9 codificaba para una proteína de 364 aminoácidos que, como la anterior, contenía un dominio conservado característico de glicosil transferasas de la familia 1. También como en el caso de ORF8 (*wbaG*), la proteína codificada presentaba una elevada homología, 71% y 59% de identidad, con una putativa glicosil transferasa de la agrupación *waa* de *S. marcescens* N28b. Se observaron similitudes con glicosil transferasas presuntamente implicadas en la síntesis del LPS o del polisacárido capsular de bacterias muy alejadas a *K. pneumoniae*.

El patrón de migración del núcleo del LPS del mutante 52145ΔORF9 era sensiblemente más rápido que el de la cepa salvaje, pero a la vez más lento que el de los mutantes 52145ΔORF2, 52145ΔORF3 y 52145ΔORF8 (fig. 5.2). Además era antígeno O⁻ y presentaba una virulencia menor respecto a la cepa salvaje (tabla 5.2). Los ensayos de resistencia a detergentes y a la polimixina B no mostraron una especial sensibilidad en el mutante 52145ΔORF9 (fig. 5.3). Por tanto, las alteraciones a nivel del núcleo del LPS no eran suficientes para generar un fenotipo *deep rough*.

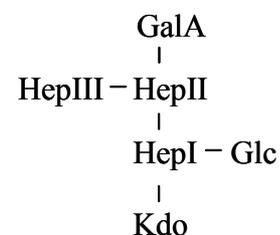


Fig. 5.6. Estructura del núcleo del mutante 52145ΔORF9.

Como en el caso del mutante 52145ΔORF8, se realizaron análisis mediante espectrometría de masas con el núcleo de 52145ΔORF9. La

estructura del oligosacárido descrita gracias a estos experimentos mostraba la pérdida de la glucosamina (GlcN) unida al GalA en la cadena principal (fig. 5.6).

Una característica fenotípica muy importante del mutante 52145 Δ ORF9 era su sensibilidad al fago Φ_2 , que implicaba la presencia de cápsula. Dado que el mutante en la ORF8 (*wabG*) no tenía cápsula, este hecho indicaba que la presencia del polisacárido capsular en la superficie bacteriana estaba ligada, de alguna manera, a la presencia del ácido galacturónico de la cadena principal del núcleo del LPS en *K. pneumoniae* 52145. Por tanto, el residuo de GalA era determinante para que la bacteria presentara cápsula, por lo que jugaba un importante papel, como mínimo de forma indirecta, en la virulencia de la bacteria.

La ORF9, que codificaba para la transferasa que unía la GlcN al GalA, fue denominada *wabB*.

Teniendo en cuenta que la estructura química del núcleo de *S. marcescens* N28b, elucidada por nuestro grupo de investigación (Nuria Coderch, tesis doctoral en preparación), indicaba, como en el caso de *K. pneumoniae*, la presencia de un ácido galacturónico unido a la HepII y un residuo de glucosamina unido al ácido galacturónico; y que las ORFs 8 y 9 (*wabG* y *wabB*, respectivamente) de la agrupación *waa* de *K. pneumoniae* 52145 presentaban homologías significativas con las ORFs 9 y 10 de la agrupación *waa* de *S. marcescens* N28b, se procedió a intentar complementar un mutante en estas dos ORFs de *S. marcescens* N28b con las ORFs de *K. pneumoniae* 52145. Se observó, mediante electroforesis en geles de tris-tricina una complementación parcial de este mutante de *S. marcescens* N28b (fig. 5.7). Por tanto, era posible que las ORFs 9 y 10 de *S. marcescens* N28b codificaran para las enzimas implicadas en la transferencia de los residuos de ácido galacturónico y glucosamina a la cadena principal del núcleo del LPS de *S. marcescens* N28b. La falta de complementación completa podría deberse a diferencias estructurales en los residuos reconocidos por las proteínas de una y otra especie, puesto que el GalA de *S. marcescens*

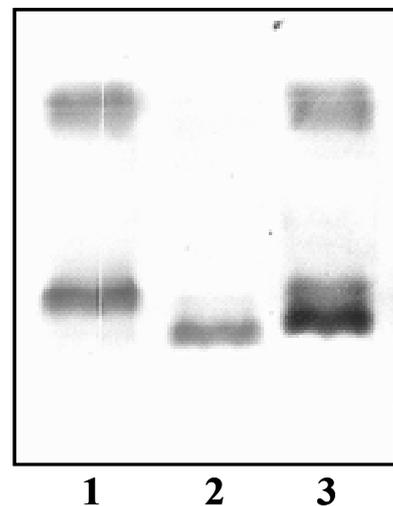


Fig. 5.7. SDS-Tricine-PAGE teñido con nitrato de plata de muestras de LPS de *K. pneumoniae* 52145 (salvaje) (carril 1), *S. marcescens* N28b mutada en ORF9 y ORF10 (carril 2), y *S. marcescens* N28b mutada en ORF9 y ORF10 complementada con ORF8 y ORF9 de *K. pneumoniae* 52145 (carril 3).

N28b está substituido, además de por la glucosamina, por dos residuos de heptosa (fig. 5.11).

5.4.10 ORF10

La ORF10 codificaba para una proteína de 329 aminoácidos, la cual poseía un dominio conservado de glicosil transferasas de la familia 2, caracterizadas por transferir residuos de azúcares a partir de UDP-glucosa, UDP-N-acetil-galactosamina, GDP-manosa o CDP-abecucosa. Presentaba niveles de similitud de más del 50% con glicosil transferasas de otras especies involucradas en la síntesis de polisacáridos y del ácido teicoico. Se hallaron niveles semejantes de similitud con un presunto regulador de *E. coli* denominado YibD (Perna *et al.*, 2001) y con una proteína de *Bacillus subtilis* presuntamente relacionada con la síntesis del polisacárido capsular (Kunst *et al.*, 1997).

El mutante 52145 Δ ORF10 no era diferente a la cepa salvaje en cuanto al patrón de migración del núcleo de su LPS en geles de tris-tricina, presencia de antígeno O, ni tampoco en cuanto a la sensibilidad a detergentes o a la polimixina B (figs. 5.2, D; y 5.3). Sin embargo, los mutantes eran parcialmente resistentes al fago Φ_2 . Diversos análisis realizados no mostraron diferencias en la composición de azúcares del LPS del mutante y de *K. pneumoniae* 52145, aunque si se detectó una reducción del 90% en la cantidad de polisacárido capsular del mutante (Regué *et al.*, 2001). La reducción de la cápsula podía relacionarse con la disminución de la virulencia del mutante observada en ensayos de DL₅₀ realizados en ratones (tabla 5.2).

Todos los datos parecían indicar que la proteína codificada por ORF10 estaba relacionada con la producción de la cantidad adecuada de cápsula por parte de la bacteria mediante un mecanismo desconocido. El gen fue denominado *yibD*, por la similitud existente con esta proteína.

5.4.11 ORF11

La proteína codificada por la ORF11, de 409 aminoácidos, era muy similar, más del 90% de homología, a la Kdo transferasa bifuncional encargada de unir los dos residuos de Kdo al lípido A en el LPS de diversas bacterias. Dada la elevada similitud con esta proteína, denominamos a este gen *waaA* (Clementz y Raetz, 1991). La caracterización funcional de la proteína WaaA en la cepa R20 (O1⁻/K20) de *K. pneumoniae*, demostró que actuaba como Kdo transferasa (Noah *et al.*, 2001).

5.4.12 ORF12

Esta ORF codificaba para una proteína de 258 aminoácidos que contenía un dominio de la familia 2 de las glicosil transferasas. Mostraba un nivel del 80% de homología (70% de identidad) con la proteína WaaE de *S. marcescens* N28b (Guasch *et al.*, 1996) y del 66% (44% de identidad) con la proteína LgtF de *Haemophilus ducreyi* (Filiatrault *et al.*, 2000), y una elevada similitud con otras glicosil transferasas. La proteína LgtF de *H. ducreyi* añade un residuo de glucosa a la HepI del núcleo interno de su LOS.

El núcleo del mutante 52145 Δ ORF12 migraba bastante más rápido que el de *K. pneumoniae* 52145 en geles de tris-tricina y, además, podía observarse a simple vista una reducción en la cantidad de antígeno O que el mutante producía (fig. 5.2). La cepa mutante presentaba una cierta sensibilidad al SDS y a la polimixina B (fig. 5.3), era sensible al fago Φ_2 y manifestaba una reducción en su virulencia en estudios de DL₅₀ realizados con ratones (tabla 5.2).

Se realizó una obtención del LPS del mutante y fue caracterizado químicamente mediante cromatografía de gases en comparación con la cepa salvaje, *K. pneumoniae* 52145 (ver Material y Métodos, 2.6.4 y 2.6.6.3), observándose una reducción de la cantidad de glucosa y ácido galacturónico en el LPS del mutante 52145 Δ ORF12 (tabla 5.6). Estos resultados se ajustarían a un defecto en la glicosil transferasa implicada en la transferencia del residuo de glucosa ramificado a la HepI del núcleo interno. La disminución de la cantidad de ácido galacturónico en el mutante 52145 Δ ORF12, podría provenir de la pérdida del residuo de GalA no estequiométrico unido a esta glucosa, hecho que también podría relacionarse con la gran alteración del patrón de migración del mutante en el gel de tris-tricina y la susceptibilidad a la polimixina B y al SDS, dado que implicaría la pérdida de residuos cargados negativamente.

Tabla 5.6. Composición química del LPS de *K. pneumoniae* cepa 52145 y del mutante 52145 Δ ORF12

LPS	Gal ^a	GalA ^a	Glc ^a	L,D-Hep ^a
52145 (salvaje)	919	83	387	228
52145 Δ ORF7	650	35	161	245

^a Cantidades de los monosacáridos expresadas en nanomoles por miligramo de LPS.

Para tratar de comprobar esta hipótesis, se realizaron estudios de complementación del mutante con el gen *lgtF* de *H. ducreyi*, que, como hemos comentado, añade un residuo de glucosa, mediante un enlace β -1,4 a la HepI del núcleo interno de esta bacteria. El LPS de 52145 Δ ORF12 complementado con *lgtF* mostraba dos bandas correspondientes al núcleo del LPS, una que migraba a la altura del núcleo

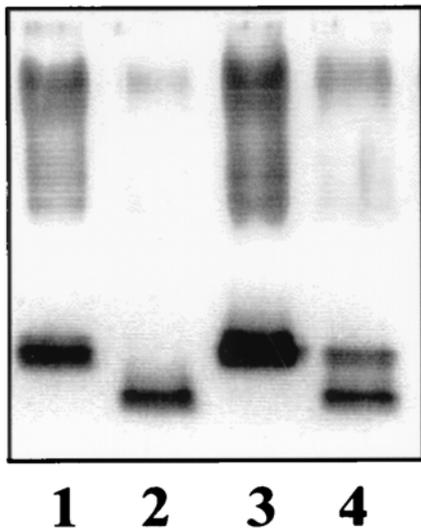


Fig. 5.8. SDS-Tricine-PAGE teñido con nitrato de plata de muestras de LPS de *K. pneumoniae* 52145 (salvaje) (carril 1), 52145 Δ ORF12 (carril 2), 52145 Δ ORF12 complementado con pGEMT-ORF12 (carril 3), y 52145 Δ ORF12 complementado con pGLU (*lgtF* de *H. ducreyi*, carril 4).

de *K. pneumoniae* 52145 y otra que migraba a la altura del núcleo del mutante (fig. 5.8). Se producía, por lo tanto, una complementación parcial de la mutación en la ORF12. La ausencia de una complementación completa podría ser debida a una baja eficiencia en el reconocimiento del promotor de *lgtF* por parte de la maquinaria de expresión de *K. pneumoniae*, o a diferencias estructurales en los residuos que rodean a la HepI sobre la que actúan LgtF y la proteína derivada de ORF12.

Con el fin de confirmar todos estos datos se realizó un análisis mediante GC-MS del núcleo metilado de 52145 Δ ORF12 y *K. pneumoniae* 52145 (ver Material y Métodos,

2.6.6.5). Tal y como se podía esperar de la estructura conocida del núcleo de *K. pneumoniae*, 2,3,4-tri-O-metilglucitol, 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactitol, 2,3,6-tri-O-metilgalactitol, 2,4,6-tri-O-metil-L-glicero-D-mano-heptitol y 2,6,7-tri-O-metil-L-glicero-D-mano-heptitol fueron identificados entre los productos metilados obtenidos del núcleo del LPS de la cepa salvaje. Los resultados obtenidos a partir del núcleo metilado del mutante 52145 Δ ORF12 se caracterizaron por la ausencia de 2,3,4-tri-O-metilglucitol y 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactitol, y la presencia de 2,4,6,7-tetra-O-metil-L-glicero-D-mano-heptitol en vez de 2,6,7-tetra-O-metil-L-glicero-D-mano-heptitol (tabla 5.7). Estos resultados confirmaban que el efecto principal que la mutación en la ORF12 provocaba era impedir la unión de el residuo de glucosa, mediante un enlace β -1,4 a la L,D-Heptosa I en el núcleo interno del LPS.

Por tanto, todos los resultados indicaban que ORF12 codificaba para una glucosil transferasa que une un residuo de glucosa a la HepI del núcleo interno mediante un enlace β -1,4. El gen fue denominado *waaE*.

Tabla 5.7. Análisis de metilación de los núcleos del LPS de *K. pneumoniae* 52145 y del mutante 52145 Δ ORF12

Principales productos metilados	Derivados de:	Cepas	
		<i>K. pneumoniae</i> 52145	52145 Δ ORF12
2,3,6-Me ₃ -Gal	GalAII	0,8	0,8
2,4,6-Me ₃ -Hep	HepII	1,0	1,0
2,3,4,6,7-Me ₅ -Hep	HepIII	0,75	0,7
2,6,7-Me ₃ -Hep	HepI ^a	0,7	ND
2,3,4-Me ₃ -Glc	GlcI	1,1	ND
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	GalAI	0,7	ND
2,4,6,7 Me ₄ -Hep	HepI ^b	ND	0,8
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	GlcII	0,8	0,9

Los datos se expresan como las cantidades relativas de los principales productos metilados.

ND, no detectado.

^a derivado de la HepI substituida en su posición O-4 por la D-Glu.

^b derivado de la HepI no substituida en la posición O-4.

5.5 Construcción de un triple mutante en ORF4-*waaL*-ORF5 de *K. pneumoniae* 52145 y complementación con ORF4-*waaL*-ORF5 de *K. pneumoniae* C3

Decidimos construir un mutante en las tres ORFs diferentes de *K. pneumoniae* 52145. Nuevamente utilizamos el método ya conocido de deleccionar los tres genes a mutar manteniendo la pauta de lectura dentro de la agrupación génica *waa* (ver Material y Métodos, 2.13.12.1). En este caso, para la creación de una copia deleccionada de la región a mutar se utilizaron los cebadores ya generados previamente para la construcción de los mutantes en ORF4 y ORF6 (ORF4 A y B y ORF6 C y D). El fragmento de PCR obtenido para realizar la mutación, que fue clonado en el plásmido pKO3, contenía la zona anterior a la ORF4 y la zona posterior a la ORF6, con la región central deleccionada. El perfil electroforético del núcleo del LPS del mutante obtenido, que fue denominado 52145 Δ ORF4-6, en geles de tris-tricina presentaba un patrón de migración ligeramente más rápido que el de la cepa salvaje, *K. pneumoniae* 52145, y carecía de antígeno O.

Al complementar 52145 Δ ORF4-6 con el plásmido pNur8, que contenía la agrupación génica *waa* de *K. pneumoniae* C3, éste recuperaba el antígeno O y el núcleo de su LPS mostraba un perfil electroforético más lento nuevamente, aunque con leves diferencias respecto al de *K. pneumoniae* 52145 (fig. 5.9). Si era complementado de nuevo con las ORFs 4, 5 y 6 de *K. pneumoniae* 52145, el núcleo de su LPS recuperaba el perfil electroforético de la cepa salvaje.

Se realizaron estudios de la DL₅₀ tanto de 52145 Δ ORF4-6, como de su complementación con pNur8, en comparación con *K. pneumoniae* 52145. 52145 Δ ORF4-6 presentaba una importante reducción en su virulencia, que era recuperada, aunque sólo en parte, en el caso del mutante complementado (tabla 5.8).

Tabla 5.8. Dosis letal ₅₀ en ratones de *K. pneumoniae* 52145, el mutante 52145 Δ ORF4-6 y su complementación con pNur8.

Cepa	DL ₅₀ ^a
<i>K. pneumoniae</i> 52145	10 ²
52145 Δ ORF4-6	10 ^{5,5}
52145 Δ ORF4-6 + pNur8	10 ^{4,2}

^a Los valores son resultado de tres experimentos independientes. Máxima desviación estándar < 10^{0,5}

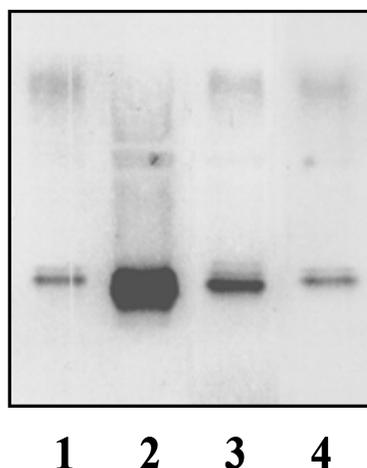


Fig. 5.9. SDS-Tricine-PAGE teñido con nitrato de plata de muestras de LPS de *K. pneumoniae* 52145 (salvaje) (carril 1), 52145 Δ ORF4-6 (carril 2), 52145 Δ ORF4-6 complementado con pNur8 (carril 3), y 52145 Δ ORF4-6 complementado con las ORFs 4, 5 y 6 de *K. pneumoniae* 52145.

Por lo tanto, según estos resultados, la complementación del mutante con las ORFs diferentes de *K. pneumoniae* C3 permitía la recuperación del antígeno O, pero no restablecía la virulencia de la bacteria a los niveles de la cepa salvaje. Esto podía ser debido a que las ORFs diferentes de la cepa C3 producían ciertos cambios en el núcleo del LPS de *K. pneumoniae* 52145 que se traducían, en última instancia, en una disminución de la virulencia bacteriana.

5.6 Discusión

Estudios anteriores habían descrito la estructura del núcleo del LPS de *K. pneumoniae* (Severn *et al.*, 1996; Süsskind *et al.*, 1998; Vinogradov y Perry, 2001), que parecía encontrarse conservada en los diferentes serotipos de la bacteria (fig. 5.10). Significativamente, la cepa que nos propusimos estudiar, *K. pneumoniae* 52145 (O1:K2), era resistente al fago FC3-10, que reconocía un epítipo presente en el núcleo del LPS de *K. pneumoniae* (Ciurana, 1990). Esta característica sugería la existencia de posibles diferencias en el núcleo del LPS de la cepa 52145 respecto al resto. De hecho, podíamos distinguir dos tipos de cepas de *K. pneumoniae* serotipo O1: las sensibles y las resistentes al fago FC3-10.

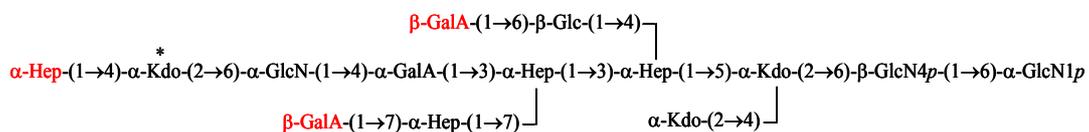


Fig. 5.10. Estructura química del núcleo del LPS de *K. pneumoniae*. En rojo se indican las sustituciones no estequiométricas. * indica el lugar de unión del antígeno O. Vinogradov y Perry, 2001.

La agrupación de genes *waa* de *K. pneumoniae* C3 (O1:K66) había sido completamente secuenciada por nuestro grupo de investigación y constaba de 13 pautas abiertas de lectura, de las cuales 12 se hallaban presuntamente implicadas en la biosíntesis del núcleo del LPS. Este conjunto de genes estaba distribuido en tres unidades transcripcionales: una constituida por las cinco primeras ORFs; otra formada por un gen monocistrónico que se transcribía en dirección opuesta a la anterior, la ORF6; y una tercera formada por las restantes ORFs, desde la ORF7 hasta el gen *coaD* (Regué *et al.*, 2001). Basándonos en esta secuencia, y mediante amplificaciones por PCR con distintas parejas de cebadores distribuidos a lo largo de toda la agrupación génica, se ha secuenciado el conjunto de genes *waa* de *K. pneumoniae* 52145 y se han hallado tres pautas de lectura diferentes a las encontradas en *waa*_{C3} (fig. 5.1), lo cual indica que la agrupación *waa* no se encuentra tan conservada como se esperaba en las distintas cepas de *K. pneumoniae*. Por lo demás, *waa*₅₂₁₄₅ también parece encontrarse distribuida en tres unidades transcripcionales: una constituida por las seis primeras ORFs, de la 1 a la 6; otra constituida por un gen monocistrónico transcrito en dirección

opuesta a la anterior y hasta ahora ignorado (ORFY), el cual también se halla en *waa*_{C3} formando parte de la segunda unidad transcripcional; y una tercera unidad igual a la hallada en *waa*_{C3}, es decir de la ORF7 hasta el gen *coaD*.

La cadena principal del núcleo interno del LPS es una región altamente conservada, y ha resultado ser exactamente igual en todas las especies de enterobacterias en las que se ha descrito su estructura. Los genes que codifican para las transferasas implicadas en su síntesis se denominan *waaA*, *waaC* y *waaF* y codifican para la Kdo transferasa, la HepI transferasa y la HepII transferasa, respectivamente. Dentro de la agrupación *waa*₅₂₁₄₅, y también *waa*_{C3}, se hallan tres ORFs (la 11, la 3 y la 2) cuyos productos muestran una similitud muy elevada con estas glicosil transferasas.

Los residuos de Kdo del núcleo interno del LPS son indispensables para la supervivencia de la bacteria. Por esta razón, la Kdo-transferasa bifuncional encargada de la transferencia de dos residuos de Kdo al lípido A, codificada por el gen *waaA*, se encuentra muy conservada entre las diversas enterobacterias. Los elevados valores de homología e identidad (superiores al 90% y el 80%, respectivamente) que presenta la ORF11 con Kdo-transferasas de diversas especies indican que esta ORF codifica para la proteína bifuncional encargada de la transferencia de los residuos de Kdo al núcleo interno del LPS en *K. pneumoniae*.

Es sabido que la ausencia de la HepI o la HepII del núcleo interno impide la formación del resto del núcleo del LPS, imposibilitando la unión del antígeno O, el cual, generalmente, se incorpora a un residuo del núcleo externo. La alteración de esta región de las heptosas provoca grandes cambios estructurales a nivel de la membrana externa, que se traducen en un fenotipo pleiotrópico conocido como *deep-rough* (Schnaitman y Klena, 1993). Las cepas de *K. pneumoniae* 52145 mutadas en la ORF2 (*waaF*) y la ORF3 (*waaC*), además de carecer de antígeno O, exhiben características fenotípicas propias de la presencia de alteraciones importantes en los residuos principales del núcleo interno del LPS, como una elevada sensibilidad a detergentes y a péptidos catiónicos. Además, las alteraciones producidas se traducen en una mayor sensibilidad a una gran cantidad de antibióticos, como la gentamicina, la tobramicina o la piperacilina, entre otros (tabla 5.1). Significativamente, el resto de los mutantes obtenidos en este trabajo no se muestran especialmente más sensibles que la cepa salvaje a la mayoría de estos antibióticos.

Las caracterizaciones químicas, mediante cromatografía de gases, de los núcleos del LPS de los mutantes 52145 Δ ORF3 y 52145 Δ ORF2 confirman las actividades

heptosil transferasa I y heptosil transferasa II de las enzimas codificadas por los genes *waaC* y *waaF*, respectivamente. El mutante 52145 Δ ORF3 no presenta ácido galacturónico, glucosa, galactosa o heptosa en su LPS, lo cual concuerda con el efecto que provocaría una mutación que impidiera la unión de la HepI en el núcleo del LPS de *K. pneumoniae*. De la misma forma, el mutante 52145 Δ ORF2, tampoco muestra ninguno de estos monosacáridos en su LPS, a excepción de una cierta cantidad de heptosa, lo cual está en consonancia con una alteración a nivel de la segunda heptosa (HepII) en la cadena principal del núcleo del LPS.

Los estudios realizados indican que la ORF7 (*waaQ*) y la ORF12 (*waaE*) codifican para transferasas involucradas en la incorporación de un residuo de heptosa ramificado en la HepII y de un residuo de glucosa ramificado en la HepI respectivamente. Estas dos ORFs se hallan en ambos conjuntos de genes *waa*, tanto en 52145 como en C3. Al no afectar a la cadena principal del núcleo del LPS, mutaciones en los genes que codifican para estas dos proteínas no impiden la unión del antígeno O a nivel del núcleo externo, tal y como se observa en los mutantes obtenidos 52145 Δ ORF7 y 52145 Δ ORF12. Sin embargo, el LPS del mutante 52145 Δ ORF12 (*waaE*) contiene menores cantidades de antígeno O que la cepa salvaje *K. pneumoniae* 52145, lo que se traduce en una disminución de su virulencia. Tanto la proteína WaaP (presente en *E. coli* y otras especies) como la proteína WaaE de *K. pneumoniae* 52145 están involucradas en la sustitución de la HepI en la posición O-4 por un grupo fosfato o de pirofosfoetanolamina y por un residuo de β -glucosa, respectivamente, y el fenotipo al que dan lugar mutantes en estas proteínas es muy similar. Mutantes en *waaP* de *E. coli* F470 y de *S. enterica* serovar typhimurium, muestran, al igual que el mutante 52145 Δ ORF12, un patrón de migración alterado de su LPS en geles de tris-tricina y una reducción en la cantidad de antígeno O unido al LPS. Además, el mutante *waaP* de *S. enterica* serovar typhimurium presenta una disminución en su virulencia y una mayor susceptibilidad a la polimixina B (Yethon *et al.*, 1998, 2000), como sucede en el caso del mutante 52145 Δ ORF12.

Inmediatamente después del núcleo interno encontramos, formando la cadena principal del núcleo del LPS, un ácido galacturónico unido a la HepII y una glucosamina unida al ácido galacturónico. Los genes implicados en la síntesis de las transferasas que unirán estos residuos han sido denominados *wabG* (ORF8) y *wabB* (ORF9), respectivamente, y se hallan tanto en *waa*₅₂₁₄₅ como en *waa*_{C3}. El mutante en el

gen *wabG*, 52145 Δ ORF8, muestra una elevada susceptibilidad a los detergentes y a la polimixina B. Es sabido que las cargas negativas necesarias para el mantenimiento de la integridad de la membrana externa son aportadas, en el núcleo de *K. pneumoniae*, por los residuos de ácido galacturónico (Raetz y Whitfield, 2002). La mutación en el gen *wabG* implica la pérdida de cargas negativas a nivel del núcleo del LPS, además del resto de la cadena principal del oligosacárido, produciéndose la susceptibilidad típica a los detergentes y péptidos catiónicos de un fenotipo *deep-rough*.

Los estudios sobre el núcleo de *S. marcescens* N28b realizados en nuestro grupo de investigación (Nuria Coderch, tesis doctoral en preparación), muestran que la estructura de la cadena principal de éste oligosacárido es muy similar a la del núcleo de *K. pneumoniae* (Vinogradov y Perry, 2001), ya que a la HepII se le une un ácido galacturónico, y a éste una glucosamina (fig. 5.11). Los productos deducidos de las ORFs 9 y 10 de la agrupación génica *waa* de *S. marcescens* N28b presentan similitudes superiores al 70% (e identidades superiores al 55%) con los productos de los genes *wabG* y *wabB*, respectivamente. La complementación parcial de un doble mutante de *S. marcescens* N28b en sus ORFs 9 y 10 por los genes *wabG* y *wabB*, sugiere que las ORFs 9 y 10 de *S. marcescens* N28b cumplen la misma función en esta bacteria que *wbaG* y *wbaB* en *K. pneumoniae* 52145, es decir, la transferencia del ácido galacturónico y de la glucosamina al núcleo del LPS.

Los análisis por espectrometría de masas indican que la presencia del residuo de ácido galacturónico de la cadena principal del núcleo del LPS de *K. pneumoniae* 52145 es indispensable para la transferencia de la HepIII a la HepII mediada por WaaQ (fig. 5.4). En este mismo sentido, es importante destacar que de todos los mutantes en las transferasas que dan lugar a la cadena principal del núcleo, sólo los mutantes en los genes *waaC*, *waaF* y *wabG* carecen de cápsula, y son, por tanto, resistentes al fago Φ_2 . Este hecho indica que el polisacárido capsular está unido, de forma directa o indirecta, al residuo de ácido galacturónico de la cadena principal, puesto que depende de su presencia que la bacteria posea capsula o no. Esta posibilidad había sido ya sugerida gracias al estudio de mutantes espontáneos del núcleo del LPS de *K. pneumoniae* (Williams y Tomás, 1990).

Los resultados obtenidos indican que el polisacárido capsular también está relacionado con el gen *yibD* (ORF10). La mutación de este gen provoca una importante reducción de la cantidad de cápsula. Sin embargo, no parecen existir otras diferencias a nivel fenotípico entre el mutante 52145 Δ ORF10 y *K. pneumoniae* 52145, a pesar de que

se realizaron análisis de la composición química del LPS del mutante. No obstante, no podemos asegurar que *yibD* no esté involucrado en la adición de alguna estructura en el núcleo del LPS que se muestre lábil a los tratamientos comúnmente utilizados para el análisis químico de las cadenas de carbohidratos. Una posibilidad sería que el gen *yibD* codificara para una enzima que transfiriera al ácido galacturónico de la cadena principal del núcleo del LPS un azúcar no estequiométrico al cual se uniese el polisacárido capsular. Por otro lado, tampoco podemos obviar la posibilidad de que este gen tenga una función reguladora de la cantidad de cápsula que la bacteria presenta. De una forma u otra, *yibD* codifica para una proteína responsable de la producción de la cantidad adecuada de cápsula por parte de la bacteria.

Las presuntas regiones intergénicas halladas en los grupos de genes *waa*_{C3}, *waa*₅₂₁₄₅, e incluso en *waa* de *S. marcescens* N28b, son en realidad genes que se encuentran bastante conservados en las tres agrupaciones. El análisis de las homologías de la secuencia de aminoácidos deducida de esta ORF no indica ninguna similitud con otras proteínas significativas. Sin embargo, el mutante 52145 Δ ORFY presenta una serie de variaciones fenotípicas respecto a *K. pneumoniae* 52145, lo que indica que la proteína codificada por esta ORF juega un papel importante en la síntesis del núcleo del LPS. Será necesario un análisis químico en profundidad de la estructura del núcleo del LPS del mutante para elucidar la función exacta de la proteína.

Los experimentos realizados indican que la ORF5 (*waaL*) de *K. pneumoniae* 52145 codifica para la ligasa encargada de la unión del antígeno O al complejo núcleo:lípido A. La ligasa de la cepa C3, que ocupa la misma posición relativa en la agrupación *waa* de esta cepa (también es la ORF5), es completamente diferente a la de *K. pneumoniae* 52145 a nivel de su secuencia de aminoácidos (Regué et al., 2001). Sin embargo, al igual que la ligasa de *K. pneumoniae* 52145 y las de otras muchas especies bacterianas, la proteína WaaL de *K. pneumoniae* C3 presenta un perfil de hidrofobicidad característico, con más de ocho dominios transmembrana. Diversos estudios realizados por otros grupos de investigación (Heinrichs et al., 1998b; Heinrichs et al., 1998), y corroborados en nuestro laboratorio, demuestran que este tipo de enzimas no presentan una elevada especificidad por el antígeno O que unirán al núcleo del LPS. Sin embargo, la estructura de la molécula aceptora, es decir el núcleo del LPS, si es realmente muy importante para la actividad de la ligasa y, de hecho, se postula que las diferencias existentes en las secuencias de las diversas WaaLs estudiadas reflejan las variaciones de las estructuras químicas de los núcleos del LPS que utilizan como aceptores.

Significativamente, la ligasa de *K. pneumoniae* C3 no es capaz de complementar al mutante 52145 Δ ORF5 (*waaL*⁻), lo cual sugiere la existencia de diferencias a nivel estructural entre el núcleo del LPS de la cepa 52145 y el de la cepa C3.

Las ORFs 4 y 6 también son diferentes en *K. pneumoniae* 52145 y C3. Es de esperar que estas diferencias a nivel genético impliquen diferencias a nivel estructural en el núcleo del LPS de estas dos cepas. Curiosamente, estas dos ORFs en *waa*₅₂₁₄₅ presentan homologías importantes con otras ORFs presentes en *waa* de *S. marcescens* N28b. Trabajos realizados en nuestro grupo de investigación han permitido elucidar la estructura química del núcleo del LPS de *S. marcescens* N28b (Nuria Coderch, tesis doctoral en preparación). Ésta es bastante similar al núcleo descrito de *K. pneumoniae* (Vinogradov y Perry, 2001), excepto por la presencia de los dos residuos de Hep unidos al ácido galacturónico de la cadena principal y los dos residuos de α y β glucosa al final del oligosacárido (fig. 5.11). Si tenemos en cuenta la elevada homología que presentan las ORFs 4, 5 y 6 de *waa*₅₂₁₄₅ con las ORFs 4, 5 y 6 de *waa* de *S. marcescens* N28b, podemos sugerir que los residuos finales del núcleo del LPS de *K. pneumoniae* 52145 sean una α -glucosa y una β -glucosa, como en el caso de *S. marcescens* N28b, y que éstas sean transferidas por las proteínas codificadas en la ORF4 y en la ORF6 de *waa*₅₂₁₄₅, respectivamente. Ambas presentan dominios característicos de glicosil transferasas, la ORF6 de *waa*₅₂₁₄₅ presenta cierta homología con una β -glucosil transferasa de *Y. enterocolitica*, y comparando el patrón de migración del núcleo del LPS en geles de tris-tricina del mutante en ORF6 con el del mutante en ORF4, este último migra más rápido, lo cual coincidiría con la pérdida de un residuo más por el mutante en ORF4. Esta hipótesis explicaría las similitudes existentes entre las antígeno O ligasas de *K. pneumoniae* 52145 y *S. marcescens* N28b, y sus diferencias con la antígeno O ligasa de *K. pneumoniae* C3, puesto que las regiones finales del núcleo del LPS de *K. pneumoniae* 52145 y *S. marcescens* N28b serían similares.

En relación con esta suposición, podríamos sugerir también que las ORFs 4 y 6 de *K. pneumoniae* C3 transfieren los residuos finales de su oligosacárido, siendo ORF6 la encargada de transferir la heptosa final (posee un dominio conservado característico de heptosil transferasas y comparte homologías con diversas enzimas con esta función) y ORF4 la implicada en la transferencia del Kdo (ya que también posee un dominio conservado típico de glicosiltransferasas)(fig. 5.11).

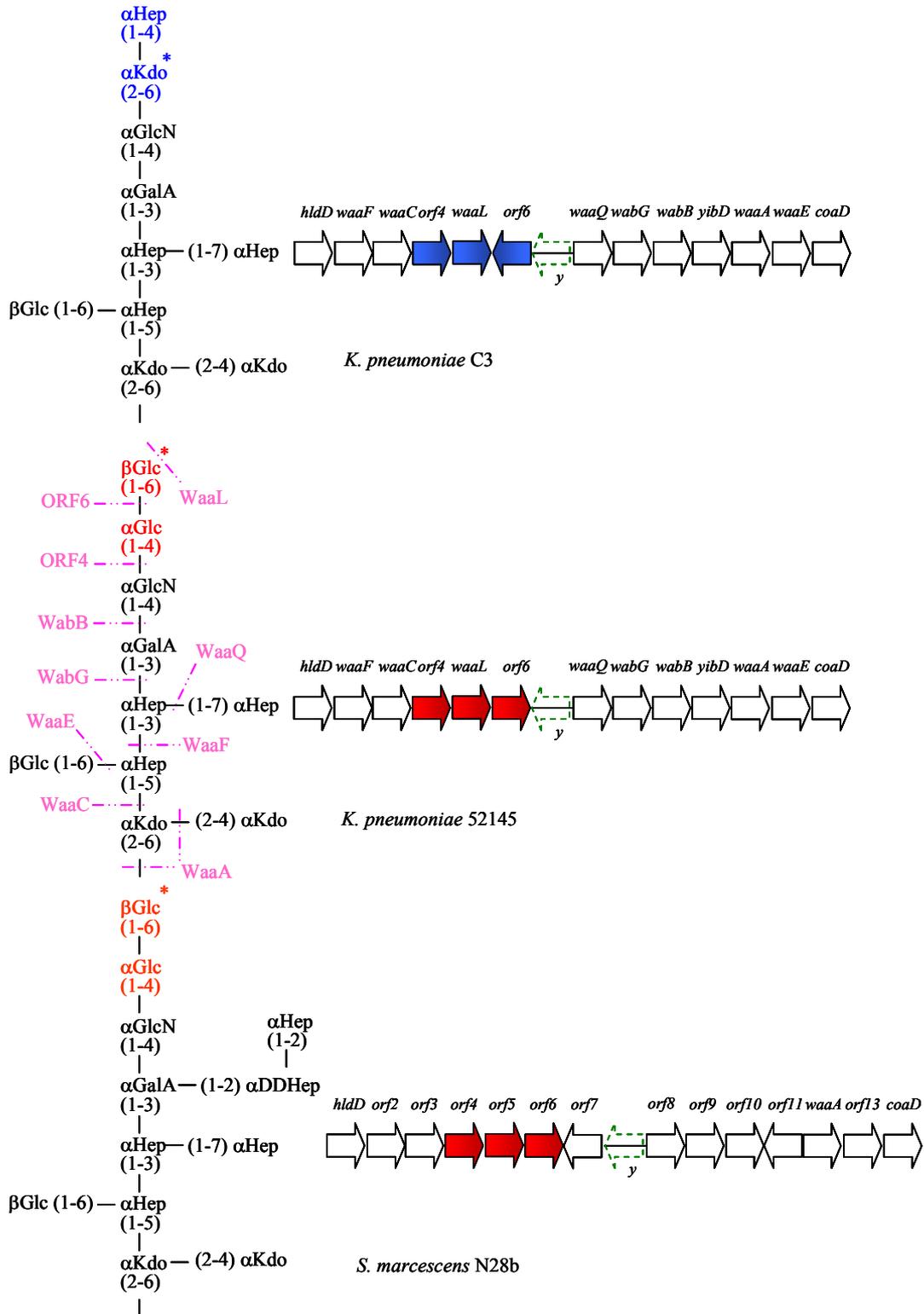


Fig. 5.11. Esquema de la estructura química de los núcleos del LPS de *K. pneumoniae* C3, *K. pneumoniae* 52145 y *S. marcescens* N28b. A la derecha están representadas las agrupaciones génicas *waa* que contienen los genes involucrados en la biosíntesis de cada uno de ellos. En el caso del núcleo de *K. pneumoniae* 52145 se encuentra indicada, en lila, la función que realiza cada una de las glicosil transferasas implicadas en su síntesis. Los residuos marcados en rojo y azul, son los residuos diferentes de los núcleos externos, relacionados con las ORFs diferentes (con el mismo color) de cada agrupación génica. * indica el lugar de unión del antígeno O.

Un importante hecho que apoya la última hipótesis es la complementación del triple mutante, 52145 Δ ORF4-6. La eliminación de las ORFs diferentes de *K. pneumoniae* 52145 y la complementación con estas mismas ORFs de *K. pneumoniae* C3 implicarían, si nuestros postulados son ciertos, un cambio en los dos últimos residuos del núcleo del LPS de la cepa 52145, lo cual permitiría la actuación de la ligasa de la cepa C3, tal y como se observa que sucede. En esta misma línea, datos similares se obtuvieron gracias al estudio de un mutante de *Salmonella enterica* complementado con genes pertenecientes a *E. coli* K-12 (Klena *et al.*, 1992). En este caso, la mutación del gen *waaK* de *S. enterica* eliminaba un residuo de N-acetil glucosamina ramificado en su núcleo externo, lo cual impedía la acción de la ligasa propia. El mutante era complementado con el gen *waaU* de *E. coli* K-12, que unía una heptosa en el núcleo externo de *S. enterica*, y con la ligasa de *E. coli* K12 (*waaL*), recuperando el mutante el antígeno O, dado que la región final del núcleo externo se asemejaba a la de *E. coli* K-12 debido a la complementación con *waaU*. Si el gen *waaL* de *E. coli* K-12 era inactivado, se eliminaba de nuevo el antígeno O, lo cual indicaba que era la ligasa de *E. coli* K-12 la única que actuaba y no la de *S. enterica*.

En resumen, a la espera de una caracterización química definitiva del núcleo del LPS de *K. pneumoniae* 52145, éste parece ser un híbrido entre los núcleos de *K. pneumoniae* C3 y *S. marcescens* N28b. Lógicamente, la agrupación génica *waa* de la cepa 52145 también parece ser un híbrido de *waa*_{C3} y *waa*_{SmN28b}, y es posible que se generara a partir de un evento de transferencia génica lateral entre estas dos agrupaciones de genes. Es importante destacar que la ligasa de *K. pneumoniae* C3, que no presenta homología con las ligasas de *S. marcescens* N28b y *K. pneumoniae* 52145, no puede complementar el mutante 52145 Δ ORF5 (*waaL*), y que esta capacidad de la ligasa para unir el antígeno O al núcleo del LPS, dependería en gran medida de sus dos genes adyacentes, ORF4 y ORF6, puesto que generarían una estructura determinada en la región final del núcleo externo que podría ser reconocida por la ligasa a la hora de unir el antígeno O. Así, en las tres agrupaciones *waa*, estos tres genes formarían una especie de módulo o bloque.

Por último, restaría por determinar si estas diferencias en la estructura química del núcleo entre *K. pneumoniae* 52145 y C3 tienen algún efecto sobre la virulencia de la bacteria. Curiosamente, algunas determinaciones previas realizadas sobre distintas cepas de *K. pneumoniae* serotipo O1 mediante PCRs con cebadores diseñados en la región diferente de *waa*₅₂₁₄₅, indican que las cepas O1:K2 con una estructura del núcleo del

LPS como la de 52145 son más virulentas que aquellas O1:K2 con una estructura diferente. Además, los resultados obtenidos del cálculo de la DL_{50} del triple mutante, 52145 Δ ORF4-6, y su complementación con los genes de *K. pneumoniae* C3, indican que la variación producida a nivel del núcleo externo provoca una disminución en la virulencia (tabla 5.8). Dado que el mutante complementado es una cepa con todas las características de *K. pneumoniae* 52145, a excepción de la variación de las ORFs diferentes implicadas en la síntesis del núcleo de su LPS, el aumento de la DL_{50} del mutante complementado sugiere que el núcleo de *K. pneumoniae* 52145 juega un papel en la virulencia mayor del que hasta ahora se le había asignado.

En este sentido, han sido realizados estudios en *Yersinia enterocolitica* que demuestran que el núcleo externo de esta bacteria es, por si mismo, un determinante principal de la virulencia de ésta (Skurnik *et al.*, 1999). Asimismo, es conocido el hecho de que existe una distribución diferencial de los distintos núcleos del LPS de *E. coli* según la procedencia del aislado clínico, siendo el núcleo de tipo R1 el más comúnmente hallado en infecciones extraintestinales y el de tipo R3 el que más se encuentra en aislados verotoxigénicos (Raetz y Whitfield, 2002), lo que sugiere que una determinada estructura química del núcleo puede favorecer la capacidad de la bacteria para colonizar un entorno u otro.

La virulencia de *K. pneumoniae*, por lo tanto, sería una característica que vendría determinada por varios factores, entre los cuales destacarían, la producción de cápsula, la capacidad de la bacteria para captar hierro en ambientes con cantidades muy bajas de este elemento (sideróforos), la presencia de antígeno O y, tal y como parecen indicar los datos obtenidos de este estudio, la estructura química del núcleo del LPS de la bacteria.

- La agrupación génica *wb* de *K. pneumoniae* KT769 (O5:K57) es la responsable de la biosíntesis del antígeno O5 y consta de 8 genes entre los cuales se localizan genes para la biosíntesis de monosacáridos activados (GDP-manosa), para la transferencia de los mismos y para el transporte del polisacárido a la cara periplasmática de la membrana plasmática bacteriana.
- El antígeno O5 de *K. pneumoniae* KT769 (O5:K57) es un importante factor de virulencia de la bacteria.
- La agrupación génica *wb* de *K. pneumoniae* KT776 (O12:K80) es la responsable de la biosíntesis del antígeno O12 y consta de 8 genes entre los cuales se localizan genes para la biosíntesis de monosacáridos activados (TDP-ramnosa), para la transferencia de los mismos y para el transporte del polisacárido a la cara periplasmática de la membrana plasmática bacteriana.
- El antígeno O12 de *K. pneumoniae* KT776 (O12:K80), junto con el antígeno O4 de *S. marcescens* N28b, son los únicos antígenos O heteropoliméricos conocidos que se exportan a través de un transportador ABC-dependiente.
- La agrupación génica *waa*, responsable de la síntesis del núcleo del lipopolisacárido de *K. pneumoniae*, no se encuentra conservada en todas sus cepas. La agrupación *waa* hallada en *K. pneumoniae* cepa 52145 es diferente a la de *K. pneumoniae* cepa C3, y se relaciona con la virulencia de dicha cepa.
- Los genes *waaC* y *waaF* codifican para la heptosil transferasa I y la heptosil transferasa II, respectivamente, implicadas en la síntesis del núcleo del LPS de *K. pneumoniae* 52145.
- Los genes *waaQ* y *waaE* codifican para una heptosil transferasa y una glucosil transferasa responsables de la transferencia de una heptosa ramificada (HepIII) a la segunda heptosa del núcleo interno de *K. pneumoniae* 52145 y de una glucosa ramificada a la primera heptosa del núcleo interno de *K. pneumoniae* 52145, respectivamente.
- Los genes *wabG* y *wabB* codifican para las enzimas encargadas de la transferencia del ácido galacturónico y de la glucosamina, respectivamente, a la cadena principal del núcleo del LPS de *K. pneumoniae* 52145. El residuo

de ácido galacturónico es indispensable para la presencia del polisacárido capsular en la bacteria.

- El gen *waaL* codifica para la antígeno O:ligasa, necesaria para la ligación del antígeno O al núcleo del LPS de *K. pneumoniae* 52145.
- En la agrupación génica *waa* de *K. pneumoniae* 52145 hallamos una pauta abierta de lectura, ORFY, que codifica para una proteína implicada en la biosíntesis del núcleo del LPS de la bacteria. Este gen se halla también en la agrupación *waa* de *K. pneumoniae* C3.

- **Albertí, S., D. Álvarez, S. Merino, M. T. Casado, F. Vivanco, J. M. Tomás, and V. J. Benedí.** 1996. Analysis of complement C3 deposition and degradation on *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**: 4726-4732.
- **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- **Álvarez, D., S. Merino, J. M. Tomás, V. J. Benedí, and S. Albertí.** 2000. Capsular polysaccharide is a major component resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Infect. Immun.* **68**: 953-955.
- **Ames, G. F. L., E. N. Spudich, and H. Nikaido.** 1974. Protein composition of outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **117**: 406-416.
- **Anderson, M. S., and C. R. H. Raetz.** 1987. Biosynthesis of lipid A precursors in *Escherichia coli*. A cytoplasmic acyl transferase that converts UDP-N-acetylglucosamine to UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **262**: 5159-5169.
- **Babinski, K. J., A. A. Ribeiro, and C. R. H. Raetz.** 2002. The *Escherichia coli* gene encoding the UDP-2,3-diacetylglucosamine pyrophosphatase of lipid A biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**: 25937-25946.
- **Bailey, M. J., C. Hughes, and V. Koronakis.** 1997. RfaH and the *ops* element, components of a novel system controlling bacterial transcription elongation. *Mol. Microbiol.* **26**: 845-851.
- **Belunis, C. J., and C. R. H. Raetz.** 1992. Biosynthesis of endotoxins. Purification and catalytic properties of 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**: 9988-9997.
- **Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- **Blomfield, I. C., V. Vaughn, R. F. Rest, and B. I. Eisenstein.** 1991. Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol. Microbiol.* **5**: 1447-1457.

- **Camprubí, S., S. Merino, V. J. Benedí, and J. M. Tomás.** 1993. The role of the O-antigen lipopolysaccharide and capsule on an experimental *Klebsiella pneumoniae* infection of the rat urinary tract. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**: 9-14.
- **Chen, L., and W. G. Coleman Jr.** 1993. Cloning and characterization of the *Escherichia coli* K-12 *rfa-2* (*rfaC*) gene, a gene required for lipopolysaccharide inner core synthesis. *J. Bacteriol.* **175**: 2534-2540.
- **Ciurana, B.** 1990. Estudi de la membrana externa de *Klebsiella pneumoniae* en relació amb la patogenicitat. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología. Universitat de Barcelona.
- **Clementz, T., and C. R. H. Raetz.** 1991. A gene coding for 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase in *Escherichia coli*: identification, mapping, cloning, and sequencing. *J. Biol. Chem.* **266**: 9687-9696.
- **Collins, L. V., and J. Hackett.** 1991. Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the *rfc* gene, which encodes an O-antigen polymerase of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**: 2521-2529.
- **Cortés, G., B. de Astorza, V. J. Benedí, and S. Albertí.** 2002. Role of the *htrA* gene in *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infect. Immun.* **70**: 4772-4776.
- **Cowan, S. T., K. J. Steel, C. Shaw, and J. P. Duguid.** 1960. A classification of the *Klebsiella* group. *J. Gen. Microbiol.* **23**: 601-612.
- **Crowell, D. N., W. S. Reznikoff, and C. R. H. Raetz.** 1987. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene for lipid A disaccharide synthase. *J. Bacteriol.* **169**: 5727-5734.
- **Darveau, R. P., and R. E. W. Hancock.** 1983. Procedure for the isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *J. Bacteriol.* **155**: 831-838.
- **de Cock, H., K. Brandenburg, A. Wiese, O. Holst, and U. Seydel.** 1999. Non-lamellar structure and negative charges of lipopolysaccharides required for efficient folding of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**: 5114-5119.
- **Ditta, G., T. Schmidhauser, E. Yakobson, P. Lu, X. W. Liang, D. R. Finlay, D. Guiney, and D. R. Helinski.** 1985. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* **13**: 149-153.

- **Dower, J. W., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformants of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Research* **16**: 6127-6145.
- **Edwards, P. R., and W. H. Ewing.** 1986. Identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn.
- **Fairbanks, G., T. L. Steck, and D. F. Wallach.** 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**: 2606-2617.
- **Falkowski, W., M. Edwards, and A. J. Schaeffer.** 1986. Inhibitory effect of substituted aromatic hydrocarbons on adherence of *Escherichia coli* to human epithelial cells. *Infect. Immun.* **52**: 863-866.
- **Filiatrault, M. J., B. W. Gibson, B. Schilling, S. Sun, R. S. Munson Jr., and A. A. Campagnari.** 2000. Construction and characterization of *Haemophilus ducreyi* lipooligosaccharide (LOS) mutants defective in expression of heptosyltransferase III and beta1,4-glucosyltransferase: identification of LOS glycoforms containing lactosamine repeats. *Infect. Immun.* **68**: 3352-61.
- **Filip, C., G. Fletcher, J. L. Wulff and C. F. Earhart.** 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium lauryl sarcosinate. *J. Bacteriol.* **115**: 715-722.
- **Frank, M. M.** 1990. Complement in host defense against bacterial infections, p. 305-317. *In* E. M. Ayoub, G. H. Cassell, W. C. Branche, Jr., and P. J. Henry (ed.), Microbial determinants of virulence and host response. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- **Gabriel, O.** 1987. Biosynthesis of sugar residues for glycogen, peptidoglycan, lipopolysaccharide and related systems. *In* *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Neidhart, Ingraham, Low *et al.*, Washington, DC: American Society Microbiology Press. pp 504-511.
- **Galanos, C., O. Lüderitz, E. T. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. A. Freudenberg, U. Schade, M. Imoto, S. Yoshimura, S. Kusumoto, and T. Shiba.** 1985. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur. J. Biochem.* **148**: 1-7.
- **Galloway, S. M., and C. R. H. Raetz.** 1990. A mutant of *Escherichia coli* defective in first step of endotoxin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **265**: 6394-6402.

- **Gargallo-Viola, D. V.** 1989. Enzyme polymorphism, prodigiosin production, and plasmid fingerprints in clinical and naturally occurring isolates of *Serratia marcescens*. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 860-868.
- **Garrett, T.A., J. L. Kadrmaz, and C. R. H. Raetz.** 1997. Identification of the gene encoding the *Escherichia coli* lipid A 4'-kinase. Facile phosphorylation of endotoxin analogs with recombinant LpxK. *J. Biol. Chem.* **272**: 21855-21864.
- **Geerlof, A., A. Lexendon, and V. Shaw.** 1999. Purification and characterization of phosphopantetheine adenylyltransferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**: 27105-27111.
- **Geyer, H., K. Himmelspach, B. Kwiatkowski, S. Schlecht, and S. Stirm.** 1983. Degradation of bacterial surface carbohydrates by virus associated enzymes. *Pure Appl. Chem.* **55**: 637-653.
- **Goldman, R., W. Kohlbrenner, P. Lartey, and A. Pernet.** 1987. Antibacterial agents specifically inhibiting lipopolysaccharide synthesis. *Nature* **329**: 162-164.
- **Guasch, J. F., N. Piqué, N. Climent, S. Ferrer, S. Merino, X. Rubirés, J. M. Tomás, and M. Regué.** 1996. Cloning and characterization of two *Serratia marcescens* genes involved in core lipopolysaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* **178**: 5741-5747.
- **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- **Hansen, D. S., F. Mestre, S. Albertí, S. Hernández-Allés, D. Álvarez, A. Domenech-Sánchez, J. Gil, S. Merino, J. M. Tomás, and V. J. Benedí.** 1999. *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 56-62.
- **Heinrichs, D. E., J. A. Yethon, and C. Whitfield.** 1998. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **30**: 221-232.
- **Heinrichs, D. E., J. A. Yethon, P. A. Amor, C. Whitfield.** 1998a. The assembly system for the outer core portion of R1- and R4-type lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. The R1 core-specific beta-glucosyltransferase provides a novel attachment site for O-polysaccharides. *J. Biol. Chem.* **273**: 29497-29505.

- **Heinrichs, D. E., M. A. Monteiro, M. B. Perry, and C. Whitfield.** 1998b. The assembly system for the lipopolysaccharide R2 core-type of *Escherichia coli* is a hybrid of those found in *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella enterica*. Structure and function of the R2 WaaK and WaaL homologs. *J. Biol. Chem.* **273**: 8849-8859.
- **Helander, I. M., Y. Kato, I. Kilpelainen, R. Kostianen, B. Lindner, K. Nummila, T. Sugiyama, and T. Yokochi.** 1996. Characterization of lipopolysaccharides of polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3. *Eur. J. Biochem.* **237**: 272-278.
- **Holst, O., and H. Brade.** 1992. Chemical structure of the core region of lipopolysaccharides. *Bacterial endotoxic lipopolysaccharides, Vol. I: molecular biochemistry and cellular biology*, CRC Press, Boca Raton, Fla.
- **Holst, O., H. Brade, D. Dziewiszek, and A. Zamojski.** 1990. G.l.c.-m.s. of partially methylated and acetylated derivatives of L-glycero-D-manno and D-glycero-D-manno hepto-pyranoses and -heptitols. *Carbohydr. Res.* **204**: 1-9.
- **Jacques, M.** 1996. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol.* **4**: 408-410.
- **Jansson, P. E., J. Lonngren, G. Widmalm, K. Leontein, K. Slettengren, S. B. Svenson, G. Wrangsell, A. Dell, and P. R. Tiller.** 1985. Structural studies of the O-antigen polysaccharides of *Klebsiella* O5 and *Escherichia coli* O8. *Carbohydr. Res.* **145**: 59-66.
- **Källenius, G., T. K. Korkhonen, V. Väisänen-Rhen, and S. B. Svenson.** 1985. Adherence assays, p. 321-331. *In* T. K. Korkhonen, E. A. Dawes, and P. H. Mäkelä (ed.), *Enterobacterial surface antigens*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- **Keenleyside, W. J., and C. Whitfield.** 1996. A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J. Biol. Chem.* **271**: 28581-28592.
- **Kelly, T. M., S. A. Stachula, C. R. H. Raetz, and M. S. Anderson.** 1993. The *firA* gene of *Escherichia coli* encodes UDP-3-O-(R-3-hydroxymiristoyl)- α -D-glucosamine N-acyltransferase: the third step of endotoxin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **268**: 19866-19874.
- **Kido, N., V. I. Torgov, T. Sugiyama, K. Uchiya, H. Sugihara, T. Komatsu, N. Kato, and K. Jann.** 1995. Expression of the O9 polysaccharide of *Escherichia coli*: sequencing of the *E. coli* O9 *rfb* gene cluster, characterization of mannosyl

- transferases, and evidence for an ATP-binding cassette transport system. *J. Bacteriol.* **177**: 2178-2187.
- **Klein, P., M. Kanehisa, and C. DeLisi.** 1985. The detection and classification of membrane-spanning proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **815**: 468-476.
 - **Klena, J.D., R. S. Ashford II, and C. A. Schnaitman.** 1992. Role of *Escherichia coli* K-12 *rfa* genes and the *rfp* gene of *Shigella dysenteriae* 1 in generation of lipopolysaccharide core heterogeneity and attachment of O antigen. *J. Bacteriol.* **174**: 7297-7307.
 - **Kneidinger, B., C. Marolda, M. Graninger, A. Zamyatina, F. McArthur, P. Kosma, M. A. Valvano, P. Messner.** 2002. Biosynthesis pathway of ADP-L-glycero-beta-D-manno-heptose in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**: 363-369.
 - **Ko W. C., D. L. Paterson, A. J. Sagnimeni, D. S. Hansen, A. V. Gottberg, S. Mohapatra, J. M. Casellas, H. Goossens, L. Mulazimoglu, G. Trenholme, K. P. Klugman, J. G. McCormack, and V. L. Yu.** 2002. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 160-166.
 - **Kogan, G., G. Haraguchi, S. I. Hull, R. A. Hull, A. S. Shashkov, B. Jann, and K. Jann.** 1993. Structural analysis of O4-related polysaccharides from recombinant *Escherichia coli*: changes in the O-specific polysaccharide induced by cloning of the *rfa* genes. *Eur. J. Biochem.* **214**: 259-265.
 - **Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, A. Danchin, *et al.*** 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.
 - **Kyte, J., and R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
 - **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
 - **Langstraat, J., M. Bohse, and S. Clegg.** 2001. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. *Infect. Immun.* **69**: 5805-5812.

- **Lewis, K.** 1986. Anomalous mobilities of DNA restriction fragments on polyacrilamide gels. *Promega Notes* **6**: 4-5.
- **Link, A. J., D. Phillips, and G. M. Church.** 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* **179**: 6228-6237.
- **Liu, D., L. Lindqvist, P. R. Reeves.** 1995. Transferases of O-antigen biosynthesis in *Salmonella enterica*: dideoxyhexosyltransferases of groups B and C2 and acetyltransferase of group C2. *J. Bacteriol.* **177**: 4084-4088.
- **Lüderitz, O., M. A. Freudenberg, C. Galanos, V. Lehmann, E. T. Rietschel, and D. Shaw.** 1982. Lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. In: S. Razin and S. Rottem Eds. *Current topics in membranes and transport*, vol. 17. Academic, New York, pp. 79-151.
- **Lüderitz, T., K. Brandenburg, U. Seydel, A. Roth, C. Galanos, and E. T. Rietschel.** 1989. Structural and physiochemical requirements of endotoxins for the activation of arachidonic acid metabolism in mouse peritoneal macrophages. *Eur. J. Biochem.* **179**: 11-16.
- **Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook.** 1982. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- **Marmur, J.** 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218.
- **Marolda, C. L., and M. A. Valvano.** 1993. Identification, expression, and DNA sequence of the GDP-mannose biosynthesis region encoded by the O7 *rfb* gene cluster of strain VW187 (*Escherichia coli* O7:K1). *J. Bacteriol.* **175**: 148-158.
- **Martinez, E., and F. de la Cruz.** 1988. Transposon Tn21 encodes a RecA-independent site-specific integration system. *Mol. Gen. Genet.* **211**: 320-325.
- **McGrath, B. C., and M. J. Osborn.** 1991. Localization of the terminal steps of O-antigen synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**: 649-654.
- **McGrath, B. C., and M. J. Osborn.** 1991. Localization of the terminal steps of O-antigen synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**: 649-654.
- **Meier-Dieter, U., K. Barr, R. Starman, L. Hatch, and P. D. Rick.** 1992. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli rfe* gene involved in the synthesis of enterobacterial common antigen. Molecular cloning of the *rfe-rff* gene cluster. *J. Biol. Chem.* **267**: 746-753.

- **Mengin-Lecreux, D., and D. A. Heijenoort.** 1994. Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate iridyltransferase activities of *Escherichia coli*: characterization of the *glmU* gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J. Bacteriol.* **176**: 5788-5795.
- **Merino, S., M. Altarriba, L. Izquierdo, M. M. Nogueras, M. Regué, and J. M. Tomás.** 2000. Cloning and sequencing of the *Klebsiella pneumoniae* O5 *wb* gene cluster and its role in pathogenesis. *Infect. Immun.* **68**: 2435-2440.
- **Merino, S., S. Camprubí, S. Albertí, V. J. Benedí, and J. M. Tomás.** 1992. *Klebsiella pneumoniae* resistance mechanisms to complement mediated killing. *Infect. Immun.* **60**: 2529-2535.
- **Merino, S., S. Camprubí, S. Albertí, V. J. Benedí, and J. M. Tomás.** 1992. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect. Immun.* **60**: 2529-2535.
- **Merino, S., X. Rubirés, A. Aguilar, and J. M. Tomás.** 1997. The role of O1-antigen in the adhesion to uroepithelial cells of *Klebsiella pneumoniae* grown in urine. *Microb. Pathog.* **23**: 49-53.
- **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- **Morona, R., D. F. Macpherson, L. V. D. Bosch, N. I. A. Carlin, and P. A. Manning.** 1995. Lipopolysaccharide with an altered O-antigen produced in *Escherichia coli* K-12 harbouring mutated, cloned *Shigella flexneri rfb* genes. *Mol. Microbiol.* **18**: 209-223.
- **Morrison, D. C., and J. L. Ryan.** 1992. Bacterial endotoxic lipopolysaccharides, Vol I: molecular biochemistry and cellular biology, CRC Press, Boca Raton, Fla.
- **Nassif, X., J. M. Fournier, J. Arondel, and P. J. Sansonetti.** 1989. Mucoid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect. Immun.* **57**: 546-552.
- **Nieto, J. M., M. J. Bailey, C. Hughes, and V. Koronakis.** 1996. Suppression of transcription polarity in the *Escherichia coli* haemolysin operon by a short upstream element shared by polysaccharide and DNA transfer determinants. *Mol. Microbiol.* **19**: 705-713.

- **Nikaido, H.** 1970. Lipopolysaccharide in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 383-406.
- **Noah, C., W. Brabetz, S. Gronow, and H. Brade.** 2001. Cloning, sequencing, and functional analysis of three glycosyltransferases involved in the biosynthesis of the inner core region of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide. *J. Endotoxin Res.* **7**: 25-33.
- **Onishi, H. R., B. A. Pelak, L. S. Gerckens, L. L. Silver, F. M. Kahan, M. H. Chen, A. A. Patchett, S. M. Galloway, S. A. Hyland, M. S. Anderson, and C. R. H. Raetz.** 1996. Antibacterial agents that inhibit lipid A biosynthesis. *Science* **274**: 980-982.
- **Ørskov, I.** 1984. Genus *Klebsiella*, p. 461-465. *In* N. R. Krieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- **Ørskov, I., and F. Ørskov.** 1984. Serotyping of *Klebsiella*. *Methods Microbiol.* **14**: 143-164.
- **Osborn, M. J.** 1966. Preparation of lipopolysaccharide from mutant strains of *Salmonella*. *Methods Enzymol.* **8**: 161-164.
- **Pearson W.R., and D. J. Lipman.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2444-2448.
- **Perna, N.T., G. Plunkett III, V. Burland, B. Mau, J.D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Posfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. Dimalanta, K. Potamouisis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, D.C., R. A. Welch, and F. R. Blattner.** 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**: 529-533.
- **Podschun, R., and U. Ullmann.** 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 589-603.
- **Pradel, E., and C. Schnaitman.** 1991. Effect of the *rfaH* (*sfrB*) and temperature on the expression of the *rfa* genes of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **173**: 6428-6431.
- **Raetz, C. R. H.** 1990. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 129-170.

- **Raetz, C. R. H.** 1996. Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Curtiss, Ingraham, Lin *et al.*, Washington, DC: American Society Microbiology Press. pp 1035-1063.
- **Raetz, C. R. H., and C. Whitfield.** 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 635-700.
- **Raetz, C. R. H., S. Purcell, M. V. Meyer, N. Qureshi, and K. Takayama.** 1985. Isolation and characterization of eight lipid A precursors from a 3-deoxy-D-manno-octylosonic acid-deficient mutant of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **260**: 16080-16088.
- **Reed, L. J., and H. Muench.** 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* **27**: 493-497.
- **Reeves, P. R.** 1993. Evolution of *Salmonella* O antigen variation involved in interspecies gene transfer on a large scale. *Trends Genet.* **9**: 17-22.
- **Reeves, P. R., M. Hobbs, M. A. Valvano, M. Skurnik, C. Whitfield, D. Coplin, N. Kido, J. Klena, D. Maskell, C. R. H. Raetz, and P. D. Rick.** 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* **4**: 495-503.
- **Regué, M., N. Climent, N. Abitio, N. Coderch, S. Merino, L. Izquierdo, M. Altarriba, and J. M. Tomás.** 2001. Genetic characterization of the *Klebsiella pneumoniae* *waa* gene cluster, involved in core lipopolysaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* **183**: 3564-3573.
- **Rietschel, E. T., H. Brade, O. Holst, L. Brade, S. Muller-Loennies, U. Mamat, U. Zahringer, F. Beckmann, U. Seydel, K. Brandenburg, A. J. Ulmer, T. Mattern, H. Heine, J. Schletter, H. Loppnow, U. Schonbeck, H. D. Flad, S. Hauschildt, U. F. Schade, F. Di Padova, S. Kusumoto, and R. R. Schumann.** 1996. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **216**: 39-81.
- **Rietschel, E. T., T. Kirikae, F. U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A. J. Ulmer, U. Zahringer, U. Seydel, and F. Di Padova.** 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* **8**: 217-225.

- **Rosenberg, M., D. Gutnick, and E. Rosenberg.** 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measure cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**: 29-33
- **Rubirés, X., F. Saigí, N. Piqué, N. Climent, S. Merino, S. Albertí, J. M. Tomás, and M. Regué.** 1997. A gene (*wbbL*) from *Serratia marcescens* N28b (O4) complements the *rfb-50* mutation of *Escherichia coli* K-12 derivatives. *J. Bacteriol.* **179**: 7581-7586.
- **Saigí, F., N. Climent, N. Piqué, C. Sánchez, S. Merino, X. Rubirés, A. Aguilar, J. M. Tomás, and M. Regué.** 1999. Genetic analysis of the *Serratia marcescens* N28b O4 antigen gene cluster. *J. Bacteriol.* **181**: 1883-1891.
- **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- **Schnaitman, C. A., and J. D. Klena.** 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 655-682.
- **Sebghati, T. A., T. K. Korhonen, D. B. Hornick, and S. Clegg.** 1998. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infect. Immun.* **66**: 2887-2894.
- **Severn, W. B., R. F. Kelly, J. C. Richards, and C. Whitfield.** 1996. Structure of the core oligosaccharide in the serotype O8 lipopolysaccharide from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **178**: 1731-1741.
- **Sirisena, D.M., K. A. Brozek, P. R. MacLachlan, K. E. Sanderson, and C. R. H. Raetz.** 1992. The *rfaC* gene of *Salmonella typhimurium*. Cloning, sequencing, and enzymatic function in heptose transfer to lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **267**: 18874-18884.
- **Skurnik, M., R. Venho, J. A. Bengoechea, and I. Moriyon.** 1999. The lipopolysaccharide outer core of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is required for virulence and plays a role in outer membrane integrity. *Mol. Microbiol.* **31**: 1443-1462.

- **Skurnik, M., R. Venho, P. Toivanen, and A. al-Hendy.** 1995. A novel locus of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 involved in lipopolysaccharide outer core biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **17**: 575-594.
- **Soberon, X., L. Covarrubias, and F. Bolivar.** 1980. Construction and characterization of new cloning vehicles IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. *Gene* **9**: 287-305.
- **Sorensen, P. G., J. Lutkenhaus, K. Young, S. S. Eveland, M. S. Anderson, and C. R. H. Raetz.** 1996. Regulation of UDP-3-O-[R-3-hydroxymyristoyl]-N-acetylglucosamine deacetylase in *Escherichia coli*. The second enzymatic step of lipid A biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **271**: 25898-25905.
- **Stanislavsky, E. S., T. A. Makarenko, E. V. Kholodkova, and C. Lugowski.** 1997. R-form lipopolysaccharides (LPS) of Gram-negative bacteria as possible vaccine antigens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **18**: 139-145.
- **Strohmaier, H., P. Remler, W. Renner, and G. Hogenauer.** 1995. Expression of genes *kdsA* and *kdsB* involved in 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid metabolism and biosynthesis of enterobacterial lipopolysaccharide is growth phase regulated at the transcriptional level in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **177**: 4488-4500.
- **Sugiyama, T., N. Kido, T. Komatsu, M. Otha, K. Jann, B. Jann, A. Saeki, and N. Kato.** 1994. Genetic analysis of *Escherichia coli* O9 *rfb*: identification and DNA sequence of phosphomannomutase and GDP-mannose pyrophosphorylase genes. *Microbiology* **140**: 111-113.
- **Sugiyama, T., N. Kido, Y. Kato, N. Koide, T. Yoshida, and T. Yokochi.** 1997. Evolutionary relationship among *rfb* gene clusters synthesizing mannose homopolymer as O-specific polysaccharides in *Escherichia coli* and *Klebsiella*. *Gene* **198**: 111-113.
- **Sugiyama, T., N. Kido, Y. Kato, N. Koide, T. Yoshida, and T. Yokochi.** 1998. Generation of *Escherichia coli* O9a serotype, a subtype of *E. coli* O9, by transfer of the *wb** gene cluster of *Klebsiella* O3 into *E. coli* via recombination. *J. Bacteriol.* **180**: 2775-2778.
- **Süsskind, M., B. Lindner, T. Weimar, H. Brade, and O. Holst.** 1998b. The structure of the lipopolysaccharide from *Klebsiella oxytoca* rough mutant R29 (O1⁻/K29⁻). *Carbohydr. Res.* **312**: 91-95.

- **Süsskind, M., L. Brade, H. Brade, and O. Holst.** 1998. Identification of a novel heptoglycan of α 1 \rightarrow 2-linked D-glycero-D-manno-heptopyranose. *J. Biol. Chem.* **273**: 7006-7017.
- **Takayama, K., N. Quershi, P. Mascagni, M. A. Nashed, L. Anderson, and C. R. H. Raetz.** 1983. Fatty acyl derivatives of glucosamine 1-phosphate in *Escherichia coli* and their relation to lipid A. *J. Biol. Chem.* **258**: 7379-7385.
- **Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- **Tomás, J. M., S. Camprubí, S. Merino, M. R. Davey, and P. Williams.** 1991. Surface exposure of O1 serotype lipopolysaccharide in *Klebsiella pneumoniae* strains expressing different K antigens. *Infect. Immun.* **59**: 2006-2011.
- **Tomasiewicz, H. G.** 1990. The macromolecular synthesis II operon in *Escherichia coli*. Ph. D. thesis. University of Colorado, Denver.
- **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- **Trautmann, M., M. Ruhnke, T. Rukavina, T. K. Held, A. S. Cross, R. Marre, and C. Whitfield.** 1997. O-antigen seroepidemiology of *Klebsiella* clinical isolates and implications for immunoprophylaxis of *Klebsiella* infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **4**: 550-555.
- **Tsai, C. M., and C. E. Frasch.** 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **119**: 115-119.
- **Vaara, M.** 1993. Antibiotic-supersusceptible mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **37**: 2255-2260.
- **Vinogradov, E. V., O. Holst, J. Thomas-Oates, K. Broady, and H. Brade.** 1992. The structure of the O-antigenic polysaccharide from lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* strain H11 (non-O1). *Eur. J. Biochem.* **210**: 491-498.
- **Vinogradov, E., and M. B. Perry.** 2001. Structural analysis of the core region of the lipopolysaccharides from eight serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *Carbohydr. Res.* **335**: 291-296.

- **Vinogradov, E., E. Frirdich, L. L. MacLean, M. B. Perry, B. O. Petersen, J. Ø. Duus, and C. Whitfield.** 2002. Structures of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **277**: 25070-25081.
- **Vinogradov, E., M. Cedzynski, A. Ziolkowski, and A. Swierzko.** 2001. The structure of the core region of the lipopolysaccharide from *Klebsiella pneumoniae* O3. 3-deoxy-alpha-D-manno-octulosonic acid (alpha-Kdo) residue in the outer part of the core, a common structural element of *Klebsiella pneumoniae* O1, O2, O3, O4, O5, O8, and O12 lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* **268**: 1722-1729.
- **Vukajlovich, S. W.** 1986. Antibody-independent activation of the classical pathway of human serum complement by lipidA is restricted to Re-chemotype lipopolysaccharide and purified lipidA. *Infect. Immun.* **53**: 480-485.
- **Walsh, A. G., M. J. Matewish, L. L. Burrows, M. A. Monteiro, M. B. Perry, and J. S. Lam.** 2000. Lipopolysaccharide core phosphates are required for viability and intrinsic drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **35**: 718-727.
- **Wertman, K. F., A. R. Wyman, and D. Botstein.** 1986. Host/vector interactions which affect the viability of recombinant phage lambda clones. *Gene.* **49**: 253-262.
- **Westphal, O., and K. Jann.** 1965. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem.* **5**: 83-91.
- **Whitfield, C., P. A. Amor, and R. Köplin.** 1997. Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol. Microbiol.* **23**: 629-638.
- **Whitfield, C.** 1995. Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol.* **3**: 178-185.
- **Whitfield, C., P. A. Amor, and R. Köplin.** 1997. Modulation of the surface architecture of Gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol. Microbiol.* **23**: 629-638.
- **Williams, P., and J. M. Tomás.** 1990. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. *Rev. Med. Microbiol.* **1**: 196-204.
- **Yethon, J. A., D. E. Heinrichs, M. A. Monteiro, M. B. Perry, and C. Whitfield.** 1998. Involvement of *waaY*, *waaQ*, and *waaP* in the modification of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and their role in the formation of a stable outer membrane. *J. Biol. Chem.* **273**: 26310-26316.

- **Yethon, J. A., J. S. Gunn, R. K. Ernst, S. I. Laroche, D. Malo, and C. Whitfield.** 2000. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *waaP* mutants show increased susceptibility to polymyxin and loss of virulence in vivo. *Infect. Immun.* **68**: 4485-4491.
- **Young, K., L. L. Silver, D. Bramhill, P. Cameron, S. S. Eveland, C. R. H. Raetz, S. A. Hyland, and M. S. Anderson.** 1995. The *envA* permeability/cell division gene of *Escherichia coli* encodes the second enzyme of lipid A biosynthesis. UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase. *J. Biol. Chem.* **270**: 30384-30391.
- **Zupacnic, T. J., D. A. Hilt, C. D. Zarley, and P. C. Kimball.** 1988. Analysis and purification of synthetic DNA fragments with NuSieve agarose mini gels. *Bio Techniques* **6**: 297-298.

Secuencia de nucleótidos de la agrupación génica *waa* de *K. pneumoniae* 52145 y secuencias de aminoácidos deducidas de las distintas pautas abiertas de lectura. Los codones de inicio se indican en negrita y los de finalización de la proteína se indican en negrita y cursiva. Cuando éstos son compartidos por dos pautas abiertas de lectura adyacentes, los nucleótidos están subrayados. Las flechas indican la dirección en la que se traducen las diversas pautas abiertas de lectura.

```

1   TGCAGGCCTG AATGAATTAT TTGCAGCATA AATCACGTCA GCCCAGCACC
   ACGTCCGGAC TTACTTAATA AACGTCGTAT TTAGTGCAGT CGGGTCGTGG
51  TTATTCTGCG AATGGCTGTA GGCTTGCTCA TGTGGTGATA TGATAAGAGC
   AATAAGACGC TTACCGACAT CCGAACGAGT ACACCACTAT ACTATTCTCG
                                     orf1 (hldD) →
                                     Met
101 ATTCATGTCC GGATTGTCTC CGGGCTCCCA ACTTCAAAGG TACAGTTATG
   TAAGTACAGG CCTAACAGAG GCCCGAGGGT TGAAGTTTCC ATGTCAATAC
   IleIleValThr GlyGlyAla GlyPheIle GlySerAsnIle ValLysAla•
151 ATCATCGTTA CCGGCGGCGC AGGCTTTATC GGCAGCAACA TCGTTAAAGC
   TAGTAGCAAT GGCCGCCGCG TCCGAAATAG CCGTCGTTGT AGCAATTTCG
   •LeuAsnAsp LysGlyIleThr AspIleLeu ValValAsp AsnLeuLysAsp•
201 GCTGAATGAC AAAGGCATCA CCGACATTCT GGTTGTGCGAC AATCTGAAAG
   CGACTTACTG TTTCCGTAGT GGCTGTAAGA CCAACAGCTG TTAGACTTTC
   •AGlyThrLys PheValAsn LeuValAspLeu AsnIleAla AspTyrMet
251 ACGGCACCAA GTTTGTAAAC CTGGTTGACC TGAACATCGC TGACTACATG
   TGCCGTGGTT CAAACATTTG GACCAACTGG ACTTGTAGCG ACTGATGTAC
   AspLysGluAsp PheLeuIle GlnIleMet AlaGlyGluGlu PheGlyGlu•
301 GATAAAGAAG ACTTTCTGAT CCAGATTATG GCGGGTGAAG AGTTCGGTGA
   CTATTTCTTC TGAAAGACTA GGTCTAATAC CGCCCACTTC TCAAGCCACT
   •IleGluAla IlePheHisGlu GlyAlaCys SerSerThr ThrGluTrpAsp•
351 AATCGAAGCA ATCTTCCACG AAGGCGCGTG CTCTTCCACT ACCGAGTGGG
   TTAGCTTCGT TAGAAGGTGC TTCCGCGCAC GAGAAGGTGA TGGCTCACCC
   •AGlyLysTyr MetMetAsp AsnAsnTyrGln TyrSerLys GluLeuLeu
401 ATGGCAAGTA CATGATGGAC AACAACTATC AGTACTCCAA AGAGCTGCTG
   TACCGTTCAT GTACTACCTG TTGTTGATAG TCATGAGGTT TCTCGACGAC
   HisAsnCysLeu GluArgGlu IleProPhe LeuTyrAlaSer SerAlaAla•
451 CACAACGACC TGGAGCGCGA AATCCCGTTC CTGTACGCCT CCTCCGCGGC
   GTGTTGACGG ACCTCGCGCT TTAGGGCAAG GACATGCGGA GGAGGCGCCG

```

•ThrTyrGly GlyArgThrSer AspPheIle GluSerArg GluTyrGluGln•
 501 CACCTATGGC GGACGCACCA GCGACTTCAT CGAGTCCCGC GAGTACGAAC
 GTGGATAACCG CCTGCGTGGT CGCTGAAGTA GCTCAGGGCG CTCATGCTTG
 •GProLeuAsn ValTyrGly TyrSerLysPhe LeuPheAsp GluTyrVal
 551 AGCCCGTGAA CGTTTACGGC TACTCCAAAT TCCTGTTCGA CGAATACGTC
 TCGGCGACTT GCAAATGCCG ATGAGGTTTA AGGACAAGCT GCTTATGCAG
 ArgGlnIleLeu ProGluAla AsnSerGln IleValGlyPhe ArgTyrPhe•
 601 CGCCAGATCC TGCCGGAAGC CAATTCGCAG ATCGTCGGCT TCCGCTACTT
 GCGGTCTAGG ACGGCCTTCG GTTAAGCGTC TAGCAGCCGA AGGCGATGAA
 •AsnValTyr GlyProArgGlu GlyHisLys GlySerMet AlaSerValAla•
 651 TAACGTCTAC GGGCCGCGCG AAGGCCACAA AGGCAGCATG GCGAGCGTCG
 ATTGCAGATG CCCGGCGCGC TTCCGGTGTT TCCGTCGTAC CGCTCGCAGC
 •APheHisLeu AsnThrGln LeuAsnAsnGly GluSerPro LysLeuPhe
 701 CTTTCCACCT CAATACCCAG CTGAATAATG GCGAAAGCCC GAAACTGTTC
 GAAAGTGGA GTTATGGGTC GACTTATTAC CGCTTTCGGG CTTTGACAAG
 GluGlySerAsp GlyPheLys ArgAspPhe ValTyrValGly AspValAla•
 751 GAAGGCAGCG ACGGCTTCAA GCGCGACTTC GTCTACGTGG GCGACGTGGC
 CTTCGGTCGC TGCCGAAGTT CGCGCTGAAG CAGATGCACC CGCTGCACCG
 •AspValAsn LeuTrpPheTrp GluAsnGly ValSerGly IlePheAsnLeu•
 801 TGACGTCAAC CTGTGGTTCT GGGAAAACGG CGTTTCCGGC ATCTTCAACC
 ACTGCAGTTG GACACCAAGA CCCTTTTGCC GCAAAGGCCG TAGAAGTTGG
 •LGlyThrGly ArgAlaGlu SerPheGlnAla ValAlaAsp AlaThrLeu
 851 TCGGCACCG CCGTGC GGAA TCCTTCCAGG CGGTTGCCGA TGCGACCCTG
 AGCCGTGGCC GGCACGCCTT AGGAAGGTCC GCCAACGGCT ACGCTGGGAC
 AlaTyrHisLys LysGlySer IleGluTyr IleProPhePro GluLysLeu•
 901 GCGTACCACA AAAAAGGCAG CATCGAGTAC ATCCCGTTCC CGGAAAAACT
 CGCATGGTGT TTTTCCGTC GTAGCTCATG TAGGGCAAGG GCCTTTTTGA
 •LysGlyArg TyrGlnAlaPhe ThrGlnAla AspLeuThr AsnLeuArgLys•
 951 GAAAGGCCG TACCAGGCGT TCACACAGGC GGATCTGACT AACCTGCGCA
 CTTTCCGGCG ATGGTCCGCA AGTGTGTCCG CCTAGACTGA TTGGACGCGT
 •LAlaGlyTyr AspLysPro PheLysThrVal AlaGluGly ValThrGlu
 1001 AAGCGGGCTA TGACAAACCG TTCAAACCG TTGCCGAAGG CGTAAACGGAA
 TTCGCCGAT ACTGTTTGGC AAGTTTTGGC AACGGCTTCC GCATTGCCTT
 orf2(waaF) →
 TyrMetAlaTrp LeuAsnArg AspAla*** Met LysIleLeu•
 1051 TATATGGCCT GGCTAAACCG CGACGCGTAA GAAACAAGCA TGAAAATATT
 ATATACCGGA CCGATTTGGC GCTGCGCATT CTTTGTTTCGT ACTTTTATAA

•ValValGly ProSerTrpVal GlyAspMet MetMetSer GlnSerLeuTyr•
 1101 GGTGGTAGGC CCGTCTGGG TGGGCGACAT GATGATGTTCG CAAAGTCTTT
 CCACCATCCG GGCAGAACCC ACCCGCTGTA CTA CTACTACAGC GTTTCAGAAA
 •TArgThrLeu ArgAlaArg TyrProGlnAla IleIleAsp ValMetAla
 1151 ATCGTACGCT CAGGGCGCGC TATCCCCAGG CGATTATCGA CGTGATGGCT
 TAGCATGCGA GTCCCGCGCG ATAGGGGTCC GCTAATAGCT GCACTACCGA
 ProAlaTrpCys ArgProLeu LeuSerArg MetProGluVal AsnGluAla•
 1201 CCAGCCTGGT GCCGTCCGTT GCTTTCGCGC ATGCCGGAAG TGAACGAAGC
 GGTCGGACCA CGGCAGGCAA CGAAAGCGCG TACGGCCTTC ACTTGCTTCG
 •IleProMet ProLeuGlyHis GlyAlaLeu AlaIleGly GluArgArgLys•
 1251 GATCCCGATG CCGCTGGGTC ACGGCGCGCT GGCTATCGGC GAACGCCGTA
 CTAGGGCTAC GGCACCCAG TGCCGCGCGA CCGATAGCCG CTTGCGGCAT
 •LLeuGlyHis SerLeuArg GluArgArgTyr AspArgAla TyrValLeu
 1301 AGCTCGCCA CAGCCTGCGC GAACGTCGCT ACGATCGCGC TTACGTGCTG
 TCGAGCCGGT GTCGGACGCG CTTGCAGCGA TGCTAGCGCG AATGCACGAC
 ProAsnSerPhe LysSerAla LeuValPro PhePheAlaAsn IleProLeu•
 1351 CCGA ACTCGT TTAAATCGGC ATTAGTCCCT TTCTTTGCCA ATATCCCGCT
 GGCTTGAGCA AATTTAGCCG TAATCAGGGA AAGAAACGGT TATAGGGCGA
 •ArgThrGly TrpArgGlyGlu MetArgTyr GlyLeuLeu AsnAspAlaArg•
 1401 GCGCACCGGC TGGCGCGGCG AGATGCGCTA CGGACTGCTC AACGACGCC
 CGCGTGGCCG ACCGCGCCGC TCTACGCGAT GCCTGACGAG TTGCTGCGGG
 •AValLeuAsp LysAspAla TrpProLeuMet ValGluArg TyrValAla
 1451 GGGTGCTGGA CAAAGACGCC TGGCCGCTGA TGGTGAACG CTACGTGGCG
 CCCACGACCT GTTTCTGCGG ACCGGCGACT ACCACCTTGC GATGCACCGC
 LeuAlaTyrAsp AsnGlyVal MetArgCys AlaLysAspLeu ProGlnPro•
 1501 CTGGCCTACG ACAACGGCGT GATGCGCTGC GCCAAAGATC TGCCGCAGCC
 GACCGGATGC TGTGCGCGCA CTACGCGACG CGGTTTCTAG ACGGCGTCGG
 •LeuLeuTrp ProGlnLeuGln ValAsnGlu GlyGluLys SerGlnAlaCys•
 1551 GCTGCTGTGG CCGCAGCTGC AGGTCAACGA AGGGGAAAAG TCGCAGGCCT
 CGACGACACC GCGTTCGACG TCCAGTTGCT TCCCCTTTTC AGCGTCCGGA
 •CSerAlaPhe AsnLeuSer TyrAspArgPro IleValGly PheCysPro
 1601 GCAGCGCTTT TAACCTGTCC TACGATCGGC CGATCGTCGG CTTCTGCCCC
 CGTCGCGAAA ATTGGACAGG ATGCTAGCCG GCTAGCAGCC GAAGACGGGG
 GlyAlaGluPhe GlyProAla LysArgTrp ProHisTyrHis TyrAlaAla•
 1651 GGC GCGGAGT TCGCCCCGC CAAACGCTGG CCGCACTATC ACTATGCTGC
 CCGCGCTCA AGCCGGGCCG GTTTGCGACC GGCGTGATAG TGATACGACG

•LeuAlaLys LysLeuIleAsp AspGlyTyr GlnIleAla LeuPheGlySer•
 1701 GCTGGCGAAA AAGCTTATCG ACGATGGCTA TCAGATTGCG CTTTTTCGGCT
 CGACCGCTTT TTCGAATAGC TGCTACCGAT AGTCTAACGC GAAAAGCCGA
 •SAlaLysAsp AsnGluAla GlyLysGluIle IleAlaAla LeuSerSer
 1751 CGGCGAAAAGA TAACGAGGCC GGCAAAGAGA TCATCGCCGC CCTCAGCAGC
 GCCGCTTCT ATTGCTCCGG CCGTTTCTCT AGTAGCGGCG GGAGTCGTCTG
 GluGlnGlnAla TrpCysArg AsnLeuAla GlyGluThrGln LeuGluGln•
 1801 GAGCAGCAGG CCTGGTGCCG TAATCTGGCG GGTGAAACCC AGCTGGAGCA
 CTCGTCTGCC GGACCACGGC ATTAGACCGC CCACTTTGGG TCGACCTCGT
 •AlaValIle LeuIleAlaAla CysLysAla ValValThr AsnAspSerGly•
 1851 GGCGGTCATT CTGATCGCCG CCTGTAAAGC TGTAGTGAAT AACGATTCGG
 CCGCCAGTAA GACTAGCGGC GGACATTTTCG ACATCACTGA TTGCTAAGCC
 •GLeuMetHis ValAlaAla AlaLeuAspArg ProLeuVal AlaLeuTyr
 1901 GGCTGATGCA CGTCGCCGCG GCGCTGGACC GCCCGCTGGT GGCGCTGTAT
 CCGACTACGT GCAGCGGCGC CGCGACCTGG CGGGCGACCA CCGCGACATA
 GlyProSerSer ProAspPhe ThrProPro LeuSerHisLys AlaArgVal•
 1951 GGCCCGAGCA GTCCGGACTT TACCCCGCCG CTGTGCATA AAGCGCGGGT
 CCGGGCTCGT CAGGCCTGAA ATGGGGCGGC GACAGCGTAT TTCGCGCCCA
 •IleArgLeu IleThrGlyTyr HisLysVal ArgLysGly AspAlaAlaGlu•
 2001 TATCCGTCG ATTACCGGT ACCACAAGGT GCGCAAAGGC GATGCCGCCG
 ATAGGCAGAC TAATGGCCGA TGGTGTTCCTA CGCGTTTCCG CTACGGCGGC
 •GGlyTyrHis GlnSerLeu IleAspIleThr ProGluArg ValLeuGln
 2051 AAGGCTATCA TCAGAGCCTG ATCGACATCA CCCCAGAACG CGTCCTGCAA
 TTCCGATAGT AGTCTCGGAC TAGCTGTAGT GGGGTCTTGC GCAGGACGTT
 GluLeuAsnGlu LeuLeuAla GluLysThr GluHisGluGlu Ala***
 2101 GAGCTAAACG AACTGTTAGC GGAAAAACC GAGCACGAGG AAGCGTAACG
 CTCGATTTGC TTGACAATCG CCTTTTTTGG CTCGTGCTCC TTCGCATTGC
orf3(waaC) →
 MetArgVal LeuIleValLys ThrSerSer MetGlyAsp ValLeuHisThr•
 2151 **GATG**CGGGTA TTGATCGTTA AAACCTCCTC CATGGGCGAC GTGCTGCACA
 CTACGCCCAT AACTAGCAAT TTTGGAGGAG GTACCCGCTG CACGACGTGT
 •TLeuProAla LeuThrAsp AlaAlaGlnAla IleProGly IleArgPhe
 2201 CGCTGCCCCG GCTAACCGAC GCCGCGCAGG CTATCCCCGG CATCCGCTTC
 GCGACGGGCG CGATTGGCTG CGGCGCGTCC GATAGGGGCC GTAGGCGAAG
 AspTrpValVal GluGluGly PheAlaGln IleProSerTrp HisGluSer•
 2251 GACTGGGTGG TTGAAGAGGG TTTTCGCGCAG ATCCCCTCCT GGCATGAAAG
 CTGACCCACC AACTTCTCCC AAAGCGCGTC TAGGGGAGGA CCGTACTTTC

•ValGluArg ValIleProVal AlaIleArg ArgTrpArg LysAlaTrpPhe•
 2301 CGTCGAGCGG GTGATCCCGG TGGCGATCCG CCGCTGGCGC AAAGCCTGGT
 GCAGCTCGCC CACTAGGGCC ACCGCTAGGC GGCGACCGCG TTTCGGACCA
 •PSerAlaPro IleLysAla GluArgGlnAla PheArgGlu AlaValGln
 2351 TCTCCGCGCC GATCAAAGCC GAGCGTCAAG CCTTTCGCGA GGCCGTTTCAG
 AGAGGCGCGG CTAGTTTCGG CTCGCAGTTC GGAAAGCGCT CCGGCAAGTC
 AlaValLysTyr AspAlaIle IleAspAla GlnGlyLeuVal LysSerAla•
 2401 GCGGTAAAGT ATGACGCCAT CATCGACGCC CAGGGGCTGG TGAAAAGCGC
 CGCCATTTCA TACTGCGGTA GTAGCTGCGG GTCCCCGACC ACTTTTCGCG
 •AlaLeuVal ThrArgLeuAla HisGlyVal LysHisGly MetAspTrpGln•
 2451 CGCGCTGGTT ACTCGCCTGG CGCACGGCGT CAAGCACGGT ATGGACTGGC
 GCGCGACCAA TGAGCGGACC GCGTGCCGCA GTTCGTGCCA TACCTGACCG
 •GThrAlaArg GluProLeu AlaSerLeuPhe TyrAsnArg ArgHisHis
 2501 AAACGGCCCG CGAGCCGCTG GCGAGCCTGT TTTACAACCG CCGCCACCAT
 TTTGCCGGG GCTCGGGC GCTCGGACA AAATGTTGGC GCGGTGGTA
 IleAlaLysGln GlnHisAla ValGluArg ThrArgGluLeu PheAlaLys•
 2551 ATCGCGAAAC AGCAGCACGC GGTGGAGCGT ACCCGTGAGC TGTTCGCCAA
 TAGCGCTTTG TCGTCGTGCG CCACCTCGCA TGGGCACTCG ACAAGCGGTT
 •SerLeuGly TyrAlaLysPro GlnThrGln GlyAspTyr AlaIleAlaArg•
 2601 AAGCCTTGGC TACGCGAAAC CCCAGACCCA GGGGGATTAC GCCATTGCGC
 TTCGGAACCG ATGCGCTTTG GGGTCTGGGT CCCCTAATG CGGTAACGCG
 •AHisPheLeu GlnHisGlu AlaSerAlaAla AlaProTyr LeuValPhe
 2651 GCCATTTCTT GCAGCACGAG GCTAGCGCTG CCGCGCCCTA TCTGGTGTTC
 CGGTAAAGGA CGTCGTGCTC CGATCGCGAC GGCGCGGGAT AGACCACAAA
 LeuHisAlaThr ThrArgAsp AspLysHis TrpProGluThr ArgTrpGln•
 2701 CTGCACGCCA CCACCCGCGA CGATAAGCAC TGGCCGGAAA CCCGCTGGCA
 GACGTGCGGT GGTGGGCGCT GCTATTCGTG ACCGGCCTTT GGGCGACCGT
 •GluLeuLeu AspLeuLeuAla AspSerGly ValHisIle LysLeuProTrp•
 2751 GGAGCTTCTC GATCTGCTGG CCGACAGCGG CGTCCACATT AAGCTGCCGT
 CCTCGAAGAG CTAGACGACC GGCTGTCGCC GCAGGTGTAA TTCGACGGCA
 •TGlyAlaPro HisGluGlu AlaArgAlaLys ArgLeuAla GluGlyArg
 2801 GGGGGGCCCG GCACGAAGAG GCGCGGGCGA AGCGGCTGGC GGAAGGCCGG
 CCCCCGGGG CGTGCTTCTC CGCGCCCGCT TCGCCGACCG CCTTCCGGCC
 GluTyrValGlu ValLeuPro ArgMetSer LeuGluGlnVal AlaGlnVal•
 2851 GAGTATGTCG AAGTGCTGCC GCGTATGAGC CTTGAGCAGG TGGCGCAGGT
 CTCATACAGC TTCACGACGG CGCATACTCG GAACTCGTCC ACCGCGTCCA

LeuAspGlyThr IleSerAla SerTyrAla SerLysArgVal MetGluLeu•
 3501 CTGGATGGCA CAATTTCCGC CTCCTATGCG TCAAAAAGGG TCATGGAGCT
 GACCTACCGT GTTAAAGGCG GAGGATACGC AGTTTTTCCC AGTACCTCGA
 •ArgPheAsn LeuSerCysPro SerGlnVal LeuIleAsn ArgIleLeuPro•
 3551 ACGTTTTAAT CTGTCGTGCC CCTCCCAGGT ATTGATTAAC CGCATTCTCC
 TGCAAAATTA GACAGCACGG GGAGGGTCCA TAACTAATTG GCGTAAGAGG
 •PProAlaAsn IlePheThr GlyAspLysPro LeuThrAla ProLeuArg
 3601 CGCCTGCAA TATTTTTACC GGTGACAAAC CGCTTACCGC CCCGTTGCGT
 GCGGACGTTT ATAAAAATGG CCACTGTTTG GCGAATGGCG GGGCAACGCA
 LeuGlyIleAla AlaArgLeu ValGlyLeu LysGlyIleSer ValAlaLeu•
 3651 CTAGGAATTG CGGCGCGCCT CGTTGGTCTG AAAGGGATTA GTGTCGCACT
 GATCCTTAAC GCCGCGCGGA GCAACCAGAC TTTCCCTAAT CACAGCGTGA
 •LeuThrLeu LysAsnLeuLeu AspArgGly IleAsnAla ThrLeuAspIle•
 3701 CCTGACCTTA AAAAACCTGC TCGATCGCGG GATAAATGCC ACCTTAGATA
 GGACTGGAAT TTTTGGACG AGCTAGCGCC CTATTTACGG TGGAACTCTAT
 •IAlaGlyLys GlyProAsp GluHisGlnPhe IleGlnLeu AlaGlnLys
 3751 TTGCAGGCAA AGGGCCGGAT GAACATCAAT TTATCCAGCT TGCACAGAAG
 AACGTCCGTT TCCCGCCTA CTTGTAGTTA AATAGGTCGA ACGTGTCTTC
 LeuGlyIleAla GlyAsnVal AsnPheLeu GlyPheArgAsp AspLeuSer•
 3801 CTGGGGATTG CGGGAAACGT AAACCTCCTT GGATTTGCGG ATGACCTGAG
 GACCCCTAAC GCCCTTTGCA TTTGAAGGAA CCTAAAGCGC TACTGGACTC
 •AspPhePhe AsnSerIleHis IleTyrLeu SerThrPro ValThrGluPro•
 3851 CGATTTTTTT AATAGTATCC ATATTTACCT TAGTACTCCA GTCACTGAGC
 GCTAAAAAAA TTATCATAGG TATAAATGGA ATCATGAGGT CAGTGACTCG
 •PPheGlyLeu SerCysLeu GluSerLeuPhe TyrGlyVal ProValIle
 3901 CCTTCGGCCT TTCTGCCTG GAATCGTTGT TTTATGGCGT TCCGGTGATC
 GGAAGCCGGA AAGGACGGAC CTTAGCAACA AAATACCGCA AGGCCACTAG
 TyrProLeuIle AspGlyGln ProGluVal ValLysAsnGly ValCysGly•
 3951 TACCCATTGA TTGATGGGCA GCCTGAAGTT GTCAAAAATG GGGTCTGCGG
 ATGGGTAAC AACTACCCGT CGGACTTCAA CAGTTTTTAC CCCAGACGCC
 •IleGlyIle ThrProAspIle ThrProGlu AlaHisPhe GluGlnCysGly•
 4001 TATCGGGATC ACGCCAGACA TCACGCCCGA AGCGCATTIT GAGCAGTGTG
 ATAGCCCTAG TGCGGTCTGT AGTGCGGGCT TCGCGTAAAA CTCGTCACAC
 •GileAsnVal AsnPhePro TyrAspValTyr PheProGly GlnAspAla
 4051 GAATCAACGT CAATTTTCCT TATGATGTTT ATTTTCCAGG GCAGGACGCG
 CTTAGTTGCA GTTAAAAGGA ATACTACAAA TAAAAGGTCC CGTCCTGCGC

LeuHisProPro ArgLeuLeu AlaProGlu LysCysAlaAsp AlaValLeu·
 4101 TTACACCCCTC CGCGATTACT GGCACCGGAA AAATGTGCTG ATGCCGTTTT
 AATGTGGGAG GCGCTAATGA CCGTGGCCTT TTTACACGAC TACGGCAAAA
 ·ArgIleVal AsnGlyAspTyr GluAlaPhe ArgLysAsn AlaPheGluHis·
 4151 ACGCATCGTT AACGGCGACT ATGAGGCTTT CCGCAAAAAC GCTTTTGAAC
 TGCCTAGCAA TTGCCGCTGA TACTCCGAAA GGCGTTTTTG CGAAAACCTG
 ·HValLysSer AsnPheAsp AlaSerValPhe MetSerAsp PheAsnSer
 4201 ATGTAATC AAATTTTCGAC GCTTCCGTTT TTATGAGCGA CTTTAACTCT
 TACATTTTAG TTTAAAGCTG CGAAGGCAAA AATACTCGCT GAAATTGAGA
 ThrIleSerGlu IleLeuAsp AlaSerArg Ala***
orf5(waaL) →
 Met HisArgVal LeuAsnThr ArgLeuLysIle·
 4251 ACTATCAGCG AAATCTGGA **TGCATCGCGT** GCT**TAACACT** CGTCTAAAAA
 TGATAGTCGC TTTAAGACCT ACGTAGCGCA CGAATTGTGA GCAGATTTTT
 ·ILysAsnMet ValLeuAsn LeuAlaGlyLeu LeuTyrLeu PheThrPhe
 4301 TCAAGAACAT GGTCTTAAC CTTGCCGGTT TGCTTTATTT ATTTACGTTT
 AGTTCTTGTA CCAAGAATTG GAACGGCCAA ACGAAATAAA TAAATGCAAA
 MetLeuPheTyr AlaAlaPro ValGluMet ArgLysIleTyr TyrLeuAla·
 4351 ATGCTATTTT ACGCCGCACC GGTAGAAATG AGAAAGATCT ACTATTTAGC
 TACGATAAAA TGCGGCGTGG CCATCTTTAC TCTTTCTAGA TGATAAATCG
 ·GlyTyrLeu ThrPhePheVal AlaLeuLeu GlyCysArg SerLeuThrSer·
 4401 AGGTTATCTG ACGTTTTTTG TCGCATTGTT AGGATGCCGT TCACTGACAT
 TCCAATAGAC TGCAAAAAAC AGCGTAACAA TCCTACGGCA AGTGACTGTA
 ·STrpLysAsn AsnArgAsp IleAlaGlyAla ThrAlaLeu PheGlyLeu
 4451 CCTGGAAAAA CAATCGAGAT ATTGCGGGCG CAACAGCGCT TTTTGGCCTT
 GGACCTTTTT GTTAGCTCTA TAACGCCCGC GTTGTGCGGA AAAACCGGAA
 ThrLeuLeuGly TrpTyrAla LeuAsnPhe ThrHisSerGlu TyrTrpSer·
 4501 ACGCTACTGG GGTGGTATGC TCTAAACTTC ACTCATAGCG AATATTGGTC
 TGGCATGACC CCACCATACG AGATTTGAAG TGAGTATCGC TTATAACCAG
 ·IleTyrAsp SerTyrLysGlu ThrGlyLys ValLeuLeu IleThrAlaLeu·
 4551 GATCTACGAC TCCTATAAAG AAACAGGTAA GGTATTGCTC ATTACCGCGC
 CTAGATGCTG AGGATATTTT TTTGTCCATT CCATAACGAG TAATGGCGCG
 ·LIleValPhe LeuValSer AsnLeuArgPhe SerPhePro AlaGluArg
 4601 TTATCGTGTT TTTAGTTTCT AATCTCCGTT TTTCTTTTCC AGCCGAAAGG
 AATAGCACAA AAATCAAAGA TTAGAGGCAA AAAGAAAAGG TCGGCTTTCC
 PheSerTrpLeu LeuIleVal AlaGlyLeu AlaThrAsnAla TyrAlaIle·
 4651 TTTTCGTGGC TGCTTATCGT CGCTGGGCTA GCGACTAACG CCTATGCCAT
 AAAAGCACCG ACGAATAGCA GCGACCCGAT CGCTGATTGC GGATACGGTA

•TyrGlnGly LeuGluIleGlu SerValArg LeuGlnIle GluLeuAspArg•
 4701 CTACCAAGGC CTGGAGATAG AATCAGTTCG ATTGCAAATC GAACTCGACC
 GATGGTTCG GACCTCTATC TTAGTCAAGC TAACGTTTAG CTTGAGCTGG
 •AAlaThrVal IleAlaTyr IlePheThrMet ThrAsnIle ValMetLeu
 4751 GTGCCACGGT TATCGCCTAT ATCTTTACCA TGACGAATAT CGTCATGCTA
 CACGGTGCCA ATAGCGGATA TAGAAATGGT ACTGCTTATA GCAGTACGAT
 AlaAlaIleLeu GluLeuLys SerGlnTyr ArgTyrPheLeu PheLeuLeu•
 4801 GCCGCGATTC TCGAACTTAA GAGCCAATAT CGCTATTTTC TTTTCCTTCT
 CGGCGCTAAG AGCTTGAATT CTCGGTTATA GCGATAAAAG AAAAGGAAGA
 •AlaAlaLeu SerGlyPheThr AlaIleAla TyrThrGlu ThrArgAlaAla•
 4851 TGCCGCATTA AGCGGATTCA CAGCCATTGC CTATACCGAA ACGCGGGCTG
 ACGGCGTAAT TCGCCTAAGT GTCGGTAACG GATATGGCTT TGCGCCCGAC
 •ALeuLeuThr PheProVal LeuIleIleLeu LeuLeuIle ValHisPro
 4901 CGCTTCTGAC GTTCCCTGTA TTAATTATCT TGCTATTAAT CGTGCATCCC
 GCGAAGACTG CAAGGGACAT AATTAATAGA ACGATAATTA GCACGTAGGG
 ArgValArgLys LysGlnLeu LeuLysLeu GlyThrAlaPhe IleValMet•
 4951 CGGGTTCGAA AAAAAACAAC TCTCAAGCTC GGTACAGCCT TTATCGTTAT
 GCCCAAGCTT TTTTGTGTA CGAGTTCGAG CCATGTCGGA AATAGCAATA
 •LeuAlaLeu LeuAlaIleAla PheHisGln LysLeuThr AspArgTyrGln•
 5001 GTTGGCACTA CTGGCAATTG CCTTCCATCA GAAGTTGACG GACCGCTATC
 CAACCGTGAT GACCGTTAAC GGAAGGTAGT CTTCAACTGC CTGGCGATAG
 •GGlyLeuArg AsnAspAla SerGlnTyrGln AspAsnAsn SerValSer
 5051 AGGGTTTACG TAACGATGCT AGCCAATATC AGGACAACAA CAGCGTATCC
 TCCCAAATGC ATTGCTACGA TCGGTTATAG TCCTGTTGTT GTCGCATAGG
 SerIleGlySer ArgLeuAla MetPheGln SerGlyLeuGln AlaAlaLeu•
 5101 TCTATCGGCT CACGATTAGC CATGTTCCAG AGTGGTCTAC AGGCCGCCCT
 AGATAGCCGA GTGCTAATCG GTACAAGGTC TCACCAGATG TCCGGCGGGA
 •AspAlaPro PheGlyGluSer AlaGluArg ArgAsnAsp AsnIleLysArg•
 5151 GGATGCACCT TTTGGCGAGT CGGCAGAACG GCGTAACGAT AACATCAAGC
 CCTACGTGGA AAACCGCTCA GCCGTCTTGC CGCATTGCTA TTGTAGTTCG
 •AGlnValGlu LysLysPro LysLeuThrGly AlaLeuAsp TyrMetAsp
 5201 GCCAAGTAGA GAAAAAACCA AAACCTACCG GGGCGCTGGA TTACATGGAT
 CGGTTCATCT CTTTTTGGT TTTGAATGGC CCCGCGACCT AATGTACCTA
 ValHisMetHis AsnGluLeu IleGluAsn PheSerLeuArg GlyValGly•
 5251 GTCCACATGC ATAACGAGCT TATTGAAAAT TTCTCACTGC GCGGCGTAGG
 CAGGTGTACG TATTGCTCGA ATAACCTTTA AAGAGTGACG CGCCGCATCC

•GlyValIle ThrLeuIleIle PheTyrAla ThrLeuLeu IleAsnAlaTrp•
 5301 GGGAGTCATC ACACTCATTA TTTTCTATGC TACTTTATTA ATAAACGCCT
 CCCTCAGTAG TGTGAGTAAT AAAAGATACG ATGAAATAAT TATTTGCGGA
 •TArgLysCys AsnValMet GlnGlyMetLeu ThrLeuSer ValIleIle
 5351 GGGCCAAATG TAATGTGATG CAAGGCATGT TAACCTTGTC GGTGATTATC
 CCGCGTTTAC ATTACACTAC GTTCCGTACA ATTGGAACAG CCACTAATAG
 TyrGlyLeuSer AspValIle PhePheGly LysGluAlaVal IleIlePhe•
 5401 TATGGTTTAA GTGACGTTAT TTTCTTCGGC AAAGAGGCCG TTATAATATT
 ATACCAAATT CACTGCAATA AAAGAAGCCG TTTCTCCGGC AATATTATAA
 •SerThrAla LeuIleLeuSer IleLeuTyr GlnLysIle ValIleHisLys•
 5451 TTCTACGGCA TTAATCCTTA GCATCTTGTA TCAAAAATT GTGATACATA
 AAGATGCCGT AATTAGGAAT CGTAGAACAT AGTTTTTTAA CACTATGTAT
orf6 →
 MetArgThr MetSerAsp LysArgPro LeuLeuSerIle IleIlePro•
 •LAspGluAsn HisGlu***
 5501 AGG**ATG**AGAA CCATGAG**TGA** CAAGCGACCT CTA**CT**CAGTA TCATTATTCC
 TCCTACTCTT GGTACTCACT GTTCCGTGGA GATGAGTCAT AGTAATAAGG
 •ValPheAsn AsnGluLeuTyr IleLysGln ThrLeuThr SerValPheGlu•
 5551 TGTTTTTAAT AATGAGCTAT ATATAAAACA GACCCTCACA TCCGTTTTTCG
 ACAAAAATTA TTA**CT**CGATA TATATTTTGT CTGGGAGTGT AGGCAA**AGC**
 •GGlnIleAsp AsnAspVal GluValIleIle ValAsnAsp GlySerThr
 5601 AGCAAATCGA TAACGATGTA GAAGTTATTA TTGTCAACGA CGGTTCCACA
 TCGTTTAGCT ATTGCTACAT CTTCAATAAT AACAGTTGCT GCCAAGGTGT
 AspAsnSerAla AlaLeuIle GlnLysAla IleAspGluTyr GlnGlyThr•
 5651 GATAATAGCG CCGCGTCAT TCAGAAGGCA ATTGATGAGT ATCAAGGCAC
 CTATTATCGC GCGCGAGTA AGTCTTCCGT TA**ACT**ACTCA TAGTTCCGTG
 •GlyAspLeu HisPheIleSer GlnGlnAsn AlaGlyVal SerValAlaArg•
 5701 TGGCGACCTT CACTTTATTA GCCAGCAAAA TGCTGGCGTA TCCGTAGCGC
 ACCGCTGGAA GTGAAATAAT CGGTCGTTTT ACGACCGCAT AGGCATCGCG
 •AAsnValAla LeuAspLys AlaGlnGlyArg TrpIleGly PheIleAsp
 5751 GCAACGTCGC ACTCGACAAA GCGCAGGGCC GCTGGATTGG CTTTATTGAT
 CGTTGCAGCG TGAGCTGTTT CGCGTCCCGG CGACCTAACC GAAATAACTA
 GlyAspAspLeu TrpCysPro HisPheLeu GlnThrIleLys ProLeuLeu•
 5801 GGAGACGACC TCTGGTGTC TACTTTTTG CAGACGATCA AGCCTCTGCT
 CCTCTGCTGG AGACCACAGG AGTGAAAAC GTCTGCTAGT TCGGAGACGA
 •LeuGluAsp GluGlyAspLeu IleAspPhe GlnTyrHis TyrPheAlaGln•
 5851 ATTAGAGGAT GAAGGGGATT TAATCGACTT TCAGTATCAC TATTTTGCCC
 TAATCTCCTA CTTCCCTAA ATTAGCTGAA AGTCATAGTG ATAAACGGG

5901 •GHisProPro ThrSerSer ValProThrLeu ValLysArg ThrAspIle
 AGCACCTCC GACTTCCAGC GTACCAACGC TCGTAAAACG CACCGATATC
 TCGTGGGAGG CTGAAGGTCG CATGGTTGCG AGCATTTTGC GTGGCTATAG
 ThrGlnValAsn HisAspAla LeuTyrGlu IlePheArgArg SerHisTrp•
 5951 ACACAAGTTA ACCATGATGC GCTTTATGAA ATCTTCCGTC GTTCCCCTG
 TGTGTTCAAT TGGTACTACG CGAAATACTT TAGAAGGCAG CAAGGGTGAC
 •HisIleTrp SerArgIleTyr ArgHisGlu LeuIleAsn GlnArgArgPhe•
 6001 GCATATCTGG AGCCGTATCT ATCGCCACGA GCTCATTAAAT CAGCGTCGTT
 CGTATAGACC TCGGCATAGA TAGCGGTGCT CGAGTAATTA GTCGCAGCAA
 •PHisValGly ArgArgTyr GluAspMetMet PheThrPro TrpLeuTyr
 6051 TTCACGTTGG GCGGCGCTAC GAAGATATGA TGTTCACTCC GTGGCTGTAT
 AAGTGAACC CGCCGCGATG CTTCTATACT ACAAGTGAGG CACCGACATA
 LeuGluAlaHis HisIleIle SerLeuAsp GlnValLeuTyr TrpTyrArg•
 6101 CTCGAAGCCC ACCATATCAT TAGCCTTGAT CAAGTCCTCT ATTGGTATCG
 GAGCTTCGGG TGGTATAGTA ATCGGAACTA GTTCAGGAGA TAACCATAGC
 •AspAsnAla GlnGlyIleThr ArgAsnIle GlnProSer AspValAsnAsp•
 6151 CGATAATGCA CAGGGGATTA CGCGCAATAT TCAACCGTCA GATGTCAATG
 GCTATTACGT GTCCCCTAAT GCGCGTTATA AGTTGGCAGT CTACAGTTAC
 •AMetValPhe AlaLeuAsn GlnIleIleAsp AsnAlaArg ThrGlnPro
 6201 ATATGGTTTT TGCCCTAAAT CAAATTATTG ATAATGCCAG AACTCAACCA
 TATACCAAAA ACGGGATTTA GTTTAATAAC TATTACGGTC TTGAGTTGGT
 ProSerGlnMet ProSerArg IleIleThr ProLeuIleIle AsnCysPhe•
 6251 CCGTCGCAGA TGCCCTCTCG AATAATTACG CCTTTAATCA TAAATTGCTT
 GGCAGCGTCT ACGGGAGAGC TTATTAATGC GGAAATTAGT ATTTAACGAA
 •AsnGluIle LysGlyIleHis AlaLysLeu TyrGlyPhe TyrAsnTyrSer•
 6301 CAATGAAATC AAGGGGATAC ATGCAAAGCT TTATGGGTTT TATAACTACA
 GTTACTTTAG TTCCCCTATG TACGTTTCGA AATACCCAAA ATATTGATGT
 •SGluHisThr IleSerThr LeuLysAlaAla AlaGlyLeu LeuProSer
 6351 GTGAACACAC TATATCAACA TTGAAGGCTG CCGCCGGGCT TCTTCCCTCC
 CACTTGTGTG ATATAGTTGT AACTTCCGAC GGCGGCCCGA AGAAGGGAGG
 GlySerLeuSer LeuLysArg ArgLeuHis LeuArgTyrPro GlyLeuTrp•
 6401 GGTAGCCTTT CACTAAAGCG TCGACTCCAT CTACGCTATC CCGGTCTCTG
 CCATCGGAAA GTGATTTTCG AGCTGAGGTA GATGCGATAG GGCCAGAGAC
 •LysArgAla SerGlnLeuArg HisIleLeu ArgArgGly Arg***
 6451 GAAACGCGCT TCTCAGCTTC GCCATATACT GCGCCGGGGA CGA**TAG**TTAG
 CTTTGCGCCGA AGAGTCGAAG CGGTATATGA CGCGGCCCT GCTATCA**AATC**

***Cys•

6501 CATTTCGCT GGTAATATTC TGCCAACGTC ATGCCCTTCA CCTGCGGCGC
 GTAAAGGCGA CCATTATAAG ACGGTTGCAG TACGGGAAGT GGACGCCGCG
 •CyssArgGln TyrTyrGlu AlaLeuThrMet GlyLysVal GlnProAla

6551 CAGCCAGCTA AAAAAGGCTT CGAGGTCAGC GTATAAACGC TCAATATCCC
 GTCGGTCGAT TTTTTCGAA GCTCCAGTCG CATATTTGCG AGTTATAGGG
 LeuTrpSerPhe PheAlaGlu LeuAspAla TyrLeuArgGlu IleAspArg•

6601 GTTCATTCTT GAACGTGGGG CTGCCGCCGG GCATATACTC TGAAGAGTGG
 CAAGTAAGAA CTTGCACCCC GACGGCGGCC CGTATATGAG ACTTCTCACC
 •ArgAsnLys PheThrProSer GlyGlyPro MetTyrGlu SerSerHisLeu•

6651 AGCATATATT CCACGTAGTC ATTGCCCTGC GTCAACGTTT GTTCGACGAC
 TCGTATATAA GGTGCATCAG TAACGGGACG CAGTTGCAA CAAGCTGCTG
 •LeuTyrGlu ValTyrAsp AsnGlyGlnThr LeuThrGln GluValVal

6701 TTTTTTCATC GTCTCCACAT TGCCGCCCAT CGGTGCGCAGC CAGTGTACGG
 AAAAAAGTAG CAGAGGTGTA ACGGCGGGTA GCCAGCGTCG GTCACATGCC
 LysLysMetThr GluValAsn GlyGlyMet ProArgLeuTrp HisValSer•

6751 AGGGGGATCG CACTTTGCCG CGCAGGCGGT CGTAGCCCTG CTTACGCTG
 TCCCCTAGC GTGAAACGGC GCGTCCGCCA GCATCGGGAC GAAGTGCAGC
 •SerSerArg ValLysGlyArg LeuArgAsp TyrGlyGln LysValSerAsn•

6801 TTCATCCACG CTGAGTGCTT GTACTGGATG CTCATCGGCA CTTCCAGCAG
 AAGTAGGTGC GACTCACGAA CATGACCTAC GAGTAGCCGT GAAGGTCTGC
 •AsnTrpAla SerHisLys TyrGlnIleSer MetProVal GluLeuLeu

6851 CGGCGAGTGA CCCTCGCGGC TGATGTCATT TTCATCGAGG AAATAGGCAT
 GCCGCTCACT GGGAGCGCCG ACTACAGTAA AAGTAGCTCC TTTATCCGTA
 ProSerHisGly GluArgSer IleAspAsn GluAspLeuPhe TyrAlaHis•

6901 GCTGCGGAAA GCGGCGATAA TCGGTCCC GC CATCGCCCTG CGGCGCCCCC
 CGACGCCTTT CGCCGCTATT AGCCAGGGCG GTAGCGGGAC GCCGCGGGG
 •HisProPhe ArgArgTyrAsp ThrGlyGly AspGlyGln ProAlaGlyLys•

6951 TTGGCGGTCT TCCAGTTCAC CCGCGGGGTC ACCGAGCAAT CCACCTGATA
 AACC GCCAGA AGGTCAAGTG GGC GCCCAG TGGCTCGTTA GGTGGACTAT
 •LysaThrLys TrpAsnVal ArgProThrVal SerCysAsp ValGlnTyr

7001 CCCGTACTCC ACCAGCAGAC GCGCATAGCG CTCGTCAAAG GCCCAGCGCC
 GGGCATGAGG TGGTCGTCTG CGCGTATCGC GAGCAGTTTC CGGGTCGCGG
 GlyTyrGluVal LeuLeuArg AlaTyrArg GluAspPheAla TrpArgGly•

7051 CGGCGCGATG GCTAACCATT TTGGTCTGGA AGGTATCCTC CAGCAGACGC
 GCCGCGCTAC CGATTGGTAA AACCAGACCT TCCATAGGAG GTCGTCTGCG
 •GlyArgHis SerValMetLys ThrGlnPhe ThrAspGlu LeuLeuArgThr•

7101 GTCATATAGT CGACCTTCTC ACGCATCATA GCGTCGCTGT ATTCAATAAG
 CAGTATATCA GCTGGAAGAG TGCCTAGTAT CGCAGCGACA TAAGTTATTC
 •ThrtTyrAsp VallLysGlu ArgMetMetAla AspSerTyr GluIleLeu
 7151 ATAAGGCTTA TGGCGCCAGT CATCTGCGGT CAGCGGCTCG GTCGGCGGGC
 TATTCCGAAT ACCGCGGTCA GTAGACGCCA GTCGCCGAGC CAGCCGCCCC
 TyrProLysHis ArgTrpAsp AspAlaThr LeuProGluThr ProProSer•
 7201 TGTTCCACGC ATGCAGATGC ATGCCGACTT CCGCGGTGCC GCGGGCAATC
 ACAAGGTGCG TACGTCTACG TACGCTGAA GGCGCCACGG CGCCCGTTAG
 •SerTrpAla HisLeuHisMet GlyValGlu AlaThrGly ArgAlaIleVal•
 7251 ACGTCTCTGG CGAATTCGAT ATAAAAGGGG TCGATGGCCA TTTCATAGTT
 TGCAGAGACC GCTTAAGCTA TATTTTCCCC AGCTACCGGT AAAGTATCAA
 •ValpArgAla PheGluIle TyrPheProAsp IleAlaMet GluTyrAsn
 7301 GGTCAAATAG ACCGGTTTAA AGCCATACTT TTCGCAAAGC TGCTGAAAAC
 CCAGTTTATC TGGCCAAATT TCGGTATGAA AAGCGTTTCG ACGACTTTTG
 ThrLeuTyrVal ProLysPhe GlyTyrLys GluCysLeuGln GlnPheArg•
 7351 GCGGAAGATA ACGCGCACTC TCGGTGGTGA TGCTGTCATG TTTTTGCCAG
 CGCCTTCTAT TGCGCGTGAG AGCCACCACT ACGACAGTAC AAAAACGGTC
 •ArgLeuTyr ArgAlaSerGlu ThrThrIle SerAspHis LysGlnTrpLeu•
 7401 AGGTTATCGC CCTCTGTATC AATCGTGATG AGAAATGCGG GATTGTGCAC
 TCCAATAGCG GGAGACATAG TTAGCACTAC TCTTTACGCC CTAACACGTG
 •LeunAspGly GluThrAsp IleThrIleLeu PheAlaPro AsnHisVal
 7451 GAAAACGTCC TCAGGCCATA CGTATCGGGT CATGGTAGAG CAATACAACG
 CTTTTGCAGG AGTCCGGTAT GCATAGCCCA **GTACC**ATCTC GTTATGTTGC
 PheValAspGlu ProTrpVal TyrArgThr Met
 ← **orfy**
 7501 CTTCTCTCAA TCTGTCTGAT CCCCTAGAAT CGGAACCCTT ATCCTGGATG
 GAAGAGAGTT AGACAGACTA GGGGATCTTA GCCTTGGGAA TAGGACCTAC
orf7(waaQ) →
 MetThrPro GluThrLeuSer ArgGlyPro LeuAsnPro
 7551 AAGAACAGAG **TATG**ACGCCT GAAACCCTCT CCCGCGGCC GTTGAACCCG
 TTCTTGCTC ATACTGCGGA CTTTGGGAGA GGGCGCCGG CAACTTGGGC
 AlaArgIleLeu ValIleLys LeuArgHis HisGlyAspMet LeuLeuIle•
 7601 GCGCGGATCC TGGTCATTAA GCTGCGCCAT CATGGCGACA TGCTGCTGAT
 CGCGCCTAGG ACCAGTAATT CGACGCGGTA GTACCGCTGT ACGACGACTA
 •ThrProLeu IleHisAlaLeu LysGlnGln TyrProAla AlaSerValAsp•
 7651 CACGCCGCTT ATTCACGCGC TGAACAGCA GTACCCCGCC GCCAGCGTGG
 GTGCGGCGAA TAAGTGCGCG ACTTTGTCGT CATGGGGCGG CGGTCGCACC

7701 ·AValLeuLeu TyrGluGlu ThrArgAspMet LeuAlaAla AsnProAsp
 ATGTCCTGTT GTATGAAGAG ACCCGGGATA TGCTCGCAGC CAACCCCGAT
 TACAGGACAA CATACTTCTC TGGGCCCTAT ACGAGCGTCG GTTGGGGCTA
 IleHisHisIle TyrGlyLeu AspArgArg TrpLysLysGln GlyLysArg·
 7751 ATCCACCATA TTTATGGTCT CGATCGCCGC TGGAAAAAGC AGGGAAAAAG
 TAGGTGGTAT AAATACCAGA GCTAGCGGCG ACCTTTTTTCG TCCCTTTTTTC
 ·TyrGlnLeu LysMetGlnTrp GlnLeuIle GlnThrLeu ArgGlnGlnArg·
 7801 GTATCAGCTG AAGATGCAAT GGCAGCTCAT TCAGACGCTG CGCCAGCAGC
 CATAGTCGAC TTCTACGTTA CCGTCGAGTA AGTCTGCGAC GCGGTCGTCG
 ·ATyrAspMet ValLeuAsn LeuAlaAspGln TrpProSer AlaValIle
 7851 GGTACGATAT GGTGCTTAAC CTGGCCGATC AGTGGCCGAG CGCGGTATAC
 CCATGCTATA CCACGAATTG GACCGGCTAG TCACCGGCTC GCGCCAATAG
 SerLysLeuThr GlyAlaAla ThrArgIle GlyPheAspPhe ProLysArg·
 7901 AGCAAACCTGA CCGGCGCCGC GACGCGGATT GGTTTTGATT TTCCGAAGCG
 TCGTTTACT GGCCGCGGCG CTGCGCCTAA CCAAACCTAA AAGGCTTCGC
 ·ArgHisPro ValTrpArgTyr CysHisThr AlaLeuAla SerThrGlnGln·
 7951 CCGCCACCCG GTCTGGCGCT ATTGCCACAC CGCGCTGGCC TCCACCCAAC
 GGCGGTGGGC CAGACCGCA TAACGGTGTG GCGCGACCGG AGGTGGGTTG
 ·GHisAsnGln LeuHisThr ValGlnGlnAsn LeuSerIle LeuAlaPro
 8001 AGCACAACCA GCTGCATACG GTACAGCAGA ATCTCTCTAT TCTCGCTCCG
 TCGTGTGGT CGACGTATGC CATGTGCTCT TAGAGAGATA AGAGCGAGGC
 LeuGlyLeuGln LeuAsnAsp AlaProAla ArgMetGlyTyr SerGluAla·
 8051 CTCGGTCTCC AGTTGAACGA TGCGCCGGCG CGGATGGGCT ACAGCGAAGC
 GAGCCAGAGG TCAACTTGCT ACGCGGCCGC GCCTACCCGA TGTCGCTTCG
 ·AspTrpAla AlaSerArgAla LeuLeuPro GluAspPhe ArgGluHisTyr·
 8101 AGACTGGGCC GCCAGCCGCG CCCTGCTGCC GGAGGACTTC CGGGAACACT
 TCTGACCCGG CGGTCGGCGC GGGACGACGG CCTCCTGAAG GCCCTTGTGA
 ·TILEValIle GlnProThr SerArgTrpPhe PheLysCys TrpArgGlu
 8151 ACATCGTCAT CCAGCCGACG TCGCGCTGGT TCTTTAAATG CTGGCGTGAA
 TGTAGCAGTA GGTTCGGCTGC AGCGCGACCA AGAAATTTAC GACCGCACTT
 AspArgMetSer AlaLeuIle AsnAlaLeu SerAlaGluGly TyrAlaVal·
 8201 GATCGGATGA GCGCCCTGAT CAACGCGCTG TCCGCCGAAG GATACGCGGT
 CTAGCCTACT CGCGGGACTA GTTGC GCGAC AGGCGGCTTC CTATGCGCCA
 ·ValLeuThr SerGlyProAsp AlaArgGlu LysLysMet ValAspThrIle·
 8251 GGTGCTCACC TCCGGCCCCG ATGCTAGAGA GAAGAAGATG GTGGATACCA
 CCACGAGTGG AGGCCGGGGC TACGATCTCT CTTCTTCTAC CACCTATGGT

•IleAlaGly CysProGln AlaArgLeuHis SerLeuAla GlyGlnLeu
 8301 TCATCGCCGG CTGCCCGCAG GCGCGACTAC ACTCTTTAGC CGGCCAGTTA
 AGTAGCGGCC GACGGGCGTC CGCGCTGATG TGAGAAATCG GCCGGTCAAT
 ThrLeuArgGln LeuAlaAla ValIleAsp HisAlaArgLeu PheIleGly•
 8351 ACGCTGCGCC AGCTGGCGGC GGTGATCGAT CATGCCCGGT TGTTTATCGG
 TGCACGCGG TCGACCGCCG CCACTAGCTA GTACGGGCCA ACAAATAGCC
 •ValAspSer ValProMetHis MetAlaAla AlaLeuGly ThrProLeuVal•
 8401 CGTCGACTCG GTGCCGATGC ATATGGCTGC AGCCCTTGGC ACTCCGCTGG
 GCAGCTGAGC CACGGCTACG TATACCGACG TCGGGAACCG TGAGGCGACC
 •ValAlaLeuPhe GlyProSer LysLeuThrPhe TrpArgPro TrpGlnAla
 8451 TCGCCCTGTT CGGCCCTCG AAGCTGACCT TCTGGCGTCC GTGGCAGGCG
 AGCGGGACAA GCCGGGAGC TTCGACTGGA AGACCGCAGG CACCGTCCGC
 LysGlyGluVal IleTrpAla GlyAspPhe GlyProLeuPro AspProAsp•
 8501 AAAGCGAGG TGATCTGGGC CGGCGACTTC GGTCCGCTGC CCGATCCGGA
 TTTCCGCTCC ACTAGACCCG GCCGCTGAAG CCAGGCGACG GGCTAGGCCT
 •AlaIleAsn ThrAsnThrAsp GluArgTyr LeuAspLeu IleProThrAsp•
 8551 CGCTATCAAC ACCAACACCG ACGAACGTTA TCTTGATTTA ATTCCTACCG
 GCGATAGTTG TGTTGTGGC TGCTTGCAAT AGAACTAAAT TAAGGATGGC
 •AAlaValIle AlaAlaAla LysLysValLeu Ala***
 orf8(wabG) →
 MetSer LysPheArgLeu•
 8601 ACGCCGTGAT CGCGCGGCG AAAAAGGTAC TGGC**ATGAGT** AAATTCAGGC
 TGCGGCACTA GCGCCCGCG TTTTTCATG ACCGTACTION TTTAAGTCCG
 •LAlaLeuVal ArgGlnLys TyrArgProAsp GlyGlyAla GluArgPhe
 8651 TGGCTCTGGT GCGCAGAAG TACCGCCCGG ACGGCGGCG AGAACGGTTT
 ACCGAGACCA CGCCGTCTTC ATGGCGGGCC TGCCGCGCG TCTTGCCAAA
 ValSerArgAla LeuGluAla LeuAspSer SerHisLeuGln LeuAsnVal•
 8701 GTCTCCCGCG CGCTGGAAGC CCTCGACAGC AGTCATCTGC AACTGAACGT
 CAGAGGGCGC GCGACCTTCG GGAGCTGTCTG TCAGTAGACG TTGACTTGCA
 •IleThrArg GluTrpGlnGly ProValLys ProAspTrp GlnIleHisIle•
 8751 CATCACCCGC GAATGGCAGG GGCCGGTGAA ACCGACTGG CAGATCCATA
 GTAGTGGGCG CTTACCGTCC CCGGCCACTT TGGCCTGACC GTCTAGGTAT
 •ICysAsnPro ArgLysTrp GlyArgIleSer ArgGluArg SerPheAla
 8801 TCTGTAACCC ACGTAAATGG GGGCGCATCA GCCGCGAGCG CAGCTTTGCC
 AGACATTGGG TGCATTTACC CCCGCGTAGT CGGCGCTCGC GTCGAAACGG
 AsnAlaAlaArg GluLeuTrp GlnArgGlu SerPheAspLeu ValGlnSer•
 8851 AACGCCGCGC GCGAGCTCTG GCAGCGCGAG TCCTTCGACC TGGTGCAGAG
 TTGCGGCGCG CGCTCGAGAC CGTCGCGCTC AGGAAGCTGG ACCACGTCTC

•HisGluArg IleProGlyCys AspLeuTyr ArgAlaGly AspGlyValHis•
 8901 CCATGAACGT ATTCCCGGCT GCGATCTCTA CCGCGCTGGC GATGGCGTTC
 GGTACTTGCA TAAGGGCCGA CGCTAGAGAT GGC GCGACCG CTACCGCAAG
 •HArgArgTrp LeuGlnGln ArgSerArgIle LeuProAla TrpLysSer
 8951 ATCGCCGCTG GCTGCAGCAG CGCTCGCGCA TTTTACCGGC CTGGAAAAGC
 TAGCGGCGAC CGACGTCGTC GCGAGCGCGT AAAATGGCCG GACCTTTTCG
 ArgLeuLeuPhe AlaAspArg TyrHisArg TyrValMetGln AlaGluArg•
 9001 CGCCTGCTGT TCGCCGACCG TTACCACCGC TACGTCATGC AGGCGGAACG
 GCGGACGACA AGCGGCTGGC AATGGTGGCG ATGCAGTACG TCCGCCTTGC
 •GluMetTyr GluAspSerHis LeuArgGly ValIleCys AsnAlaGluMet•
 9051 CGAGATGTAT GAAGACTCAC ACCTGCGCGG GGTGATCTGC AACGCCGAGA
 GCTCTACATA CTTCTGAGTG TGGACGCGCC CCACTAGACG TTGCGGCTCT
 •MileLysArg GluIleIle GluAspPheGly LeuProAla GluLysIle
 9101 TGATCAAGCG CGAGATTATC GAAGACTTTG GCCTGCCGGC GGAGAAGATC
 ACTAGTTCGC GCTCTAATAG CTTCTGAAAC CGGACGGCCG CCTCTTCTAG
 HisValIleTyr AsnAlaIle AspAsnGln ArgPheLeuPro ProAspGlu•
 9151 CACGTTATTT ACAACGCCAT TGACAACCAG CGCTTCCTGC CGCCAGACGA
 GTGCAATAAA TGTGCGGTA ACTGTTGGTC GCGAAGGACG GCGGTCTGCT
 •GluThrPhe AlaAlaLeuArg AlaLysTrp GlnLeuPro LeuGlnAlaThr•
 9201 AGAGACCTTT GCCGCCTTAC GCGCCAAATG GCAGCTGCCG CTGCAGGCGA
 TCTCTGGAAA CGGCGGAATG CGCGGTTTAC CGTCGACGGC GACGTCCGCT
 •TCysLeuIle TyrValGly SerGlyPheGlu ArgLysGly LeuAlaAla
 9251 CCTGCCTGAT CTACGTCGGC TCCGGCTTTG AACGTAAAGG GCTGGCGGCG
 GGACGGACTA GATGCAGCCG AGGCCGAAAC TTGCATTTCC CGACCGCCGC
 AlaIleArgAla IleAlaPro ThrAspArg TyrLeuLeuVal ValGlyLys•
 9301 GCGATTCGCG CCATCGCCCC TACCGATCGC TACCTGCTGG TGGTCCGCAA
 CGCTAAGCGC GGTAGCGGGG ATGGCTAGCG ATGGACGACC ACCAGCCGTT
 •AspLysAsp GlnProArgTyr GlnAlaLeu AlaLysSer LeuAsnCysGly•
 9351 AGATAAGGAT CAGCCTCGCT ATCAGGCGCT GGCGAAGAGC CTGAAGTGTG
 TCTATTCCCTA GTCGGAGCGA TAGTCCGCGA CCGCTTCTCG GACTTGACAC
 •GAlaArgVal ArgPhePhe GlyMetGlnSer GluThrLeu ProPheTyr
 9401 GAGCGCGGGT GCGCTTCTTC GGCATGCAGT CGGAGACATT GCCCTTCTAT
 CTCGCGCCCA CGCGAAGAAG CCGTACGTCA GCCTCTGTAA CGGGAAGATA
 GlnMetAlaAsp GlyLeuLeu LeuProThr LeuTyrAspPro PheProAsn•
 9451 CAAATGGCCG ATGGTCTGCT GCTGCCGACC CTCTACGATC CGTTCCCAA
 GTTTACCGGC TACCAGACGA CGACGGCTGG GAGATGCTAG GCAAGGGGTT

•ValIleLeu GluAlaMetAla CysGlyLeu ProValIle ThrThrThrGly•
 9501 CGTCATCCTC GAGGCAATGG CCTGCGGTCT GCCGGTGATC ACCACTACCG
 GCAGTAGGAG CTCCGTTACC GGACGCCAGA CGGCCACTAG TGGTGATGGC
 •GCysGlyGly AlaGluPhe IleValAspGly HisAsnGly TyrValCys
 9551 GCTGCGGCGG GCGGAGTTT ATCGTCGACG GCCACAACGG TTACGTCTGC
 CGACGCCGCC CCGCCTCAAA TAGCAGCTGC CGGTGTTGCC AATGCAGACG
 AspAlaLeuAsp IleProAla LeuGlnGln AlaValMetAla LeuProAla•
 9601 GACGCTCTGG ATATCCCGGC GCTACAGCAG GCGGTAATGG CCCTGCCCGC
 CTGCGAGACC TATAGGGCCG CGATGTCGTC CGCCATTACC GGGACGGGCG
 •ArgAlaLeu SerSerAlaGlu GlyGlyHis AlaArgGlu ArgIleMetAla•
 9651 GCGCGCGCTG AGCTCCGCGG AAGGCGGTCA CGCCCGCGAG CGCATTATGG
 CGCGCGCGAC TCGAGGCGCC TTCCGCCAGT GCGGGCGCTC GCGTAATACC
 •ACysThrSer GluArgLeu SerThrGlnLeu LeuSerLeu TyrGlnAsp
 9701 CCTGCACCAG CGAGCGACTC TCAACCCAGC TGCTTTCTCT TTATCAGGAT
 GGACGTGGTC GCTCGCTGAG AGTTGGGTCG ACGAAAGAGA AATAGTCCTA
 orf9(wabB) →
 MetArg IleLeuPheVal IleAspGly LeuProGly
 LeuValAsn***
 9751 CTGGTGAAT**T AACGATG**CGC ATCTTATTTG TGATTGACGG TTTACCCGGC
 GACCACTTAA TTGCTACGCG TAGAATAAAC ACTAACTGCC AAATGGGCCG
 GlyGlyAlaGlu LysValVal LeuThrLeu AlaAlaGlnPhe LeuArgAsp•
 9801 GGCGGCGCGG AAAAAGTGGT CCTGACCCTG GCGGCACAGT TCCTGCGCGA
 CCGCCGCGCC TTTTTCACCA GGACTGGGAC CGCCGTGTCA AGGACGCGCT
 •GlyAspArg ValSerLeuIle SerLeuArg AspValCys GluTyrProLeu•
 9851 CGGCGATCGG GTGTCGCTCA TTTTCGCTGCG CGATGTCTGC GAGTACCCAT
 GCCGCTAGCC CACAGCGAGT AAAGCGACGC GCTACAGACG CTCATGGGTA
 •LProGluGly LeuAspTyr GlnValValAla AspArgCys ArgLysPro
 9901 TGCCCGAGGG GCTCGACTAC CAGGTAGTTG CCGATCGCTG CCGTAAACCG
 ACGGGCTCCC CGAGCTGATG GTCCATCAAC GGCTAGCGAC GGCATTTGGC
 TrpArgLysLeu ThrGluLeu SerArgArg AlaArgGlnLeu AspAlaAla•
 9951 TGGCGCAAGC TGACCGAGCT GTCCCGCCGC GCCCGCCAGC TGGATGCCGC
 ACCGCGTTCG ACTGGCTCGA CAGGGCGGCG CGGGCGGTCTG ACCTACGGCG
 •ValValArg AlaGluGlnGln GlyGlnPhe AspLeuVal LeuSerAsnLeu•
 10001 AGTCGTGCGG GCCGAACAGC AGGGGCAATT TGACCTTGTG CTCTCCAACC
 TCAGCACGCC CGGCTTGTCG TCCCCGTTAA ACTGGAACAC GAGAGGTTGG
 •LHisLysThr AspArgIle ValAlaArgSer ArgAlaLeu ArgGluArg
 10051 TGCACAAAAC CGACCGCATC GTCGCCCCGA GCCGGGCGCT GCGCGAGCGT
 ACGTGTTTTG GCTGGCGTAG CAGCGGGCGT CGGCCCGCGA CGCGCTCGCA

AsnValTrpPhe CysLeuHis GlyValPhe SerAlaSerTyr LeuGlyHis·
 10101 AACGTCTGGT TCTGTCTGCA CGGCGTATTC TCTGCCTCCT ATCTCGGGCA
 TTGCAGACCA AGACAGACGT GCCGCATAAG AGACGGAGGA TAGAGCCCGT
 ·ArgThrGly PheAspArgTrp MetLysGln GlnLysIle LysArgIleTyr·
 10151 CCGCACCAGC TTTGACCGCT GGATGAAGCA GCAGAAAATT AAGCGAATTT
 GGCCTGGCCG AAAGTGGCGA CCTACTTCGT CGTCTTTTAA TTCGCTTAAA
 ·TGlnGlyArg AsnAlaVal ThrValSerAsp AlaValGly ArgAspLeu
 10201 ATCAGGGTCG CAACGCGGTG ACGGTTTCCG ACGCGGTGGG GCGAGATCTG
 TAGTCCCAGC GTTGCGCCAC TGCCAAAGGC TGCGCCACCC CGCTCTAGAC
 ValGluGluPhe AlaLeuArg ProAlaGln LeuLysThrIle TyrAsnPro·
 10251 GTGGAAGAGT TTGCCCTGCG CCCGGCACAG CTGAAAACCA TCTACAATCC
 CACCTTCTCA AACGGGACGC GGGCCGTGTC GACTTTTGGT AGATGTTAGG
 ·PheAspIle ThrAlaLeuArg AlaGluAla GluAlaAsp SerGluArgPro·
 10301 CTTCGATATC ACTGCCCTGC GCGCCGAGGC GGAAGCCGAT AGCGAGCGCC
 GAAGCTATAG TGACGGGACG CGCGGCTCCG CCTTCGGCTA TCGCTCGCGG
 ·PAspGlyAsp TyrLeuIle HisValGlyArg PheHisPro GlyLysArg
 10351 CGGACGGTGA CTACCTGATT CACGTCGGTC GCTTCCATCC GGGCAAACGC
 GCCTGCCACT GATGGACTAA GTGCAGCCAG CGAAGGTAGG CCCGTTTGGC
 HisAspArgLeu LeuGluAla TyrAlaGln SerGlyIleAsp AlaProLeu·
 10401 CATGACCGCC TGCTTGAAGC CTATGCGCAG AGCGGCATCG ACGCACCCT
 GTACTGGCGG ACGAACTTCG GATACGCGTC TCGCCGTAGC TCGTGGCGA
 ·ValLeuLeu GlyGlnGlyLys ProGluGln GluGlnArg LeuArgGlnLeu·
 10451 GGTGCTGCTA GGCCAGGGAA AACCGGAGCA AGAGCAGCGC CTGCGCCAGC
 CCACGACGAT CCGGTCCCTT TTGGCCTCGT TCTCGTCGCG GACGCGGTCTG
 ·LAlaLysThr LeuHisIle AspAspArgVal TrpPheLys GlyPheGln
 10501 TGGCAAAAAC GCTGCACATT GACGATCGGG TGTGGTTCAA AGGCTTTCAG
 ACCGTTTTTG CGACGTGTAA CTGCTAGCCC ACACCAAGTT TCCGAAAGTC
 LysAsnProLeu ProTrpIle LysGlyAla ArgMetLeuVal LeuSerSer·
 10551 AAAAACCCTT TACCGTGGAT CAAAGGCGCA CGGATGCTGG TTTTGAGCTC
 TTTTGGGGA ATGGCACCTA GTTTCCGCGT GCCTACGACC AAAACTCGAG
 ·AspSerGlu GlyPheGlyAsn ValValVal GluAlaLeu LeuLeuHisIle·
 10601 CGATAGCGAA GGATTCGGCA ATGTGGTGGT GGAGGCGCTG CTGTTACATA
 GCTATCGCTT CCTAAGCCGT TACACCACCA CCTCCGCGAC GACAATGTAT
 ·IProValAla SerThrArg CysProGlyGly ValThrGlu IleLeuThr
 10651 TTCCTGTGCG CAGCACCCGC TGCCCCGGCG GCGTCACCGA GATCCTCACC
 AAGGACAGCG GTCGTGGGCG ACGGGGCCGC CGCAGTGGCT CTAGGAGTGG

GlyGluLeuAla ArgGlyLeu AlaAspLeu ThrSerProAla LeuAlaGln·
 10701 GGCGAACTTG CCCGCGGTCT GGCGGATCTC ACCAGTCCGG CGCTGGCTCA
 CCGCTTGAAC GGGCGCCAGA CCGCCTAGAG TGGTCAGGCC GCGACCGAGT
 ·ThrMetGln SerIleTyrHis AsnProPro AlaIleAsp AspAlaAlaLeu·
 10751 GACGATGCAA AGCATTTACC ATAACCCGCC GGCCATCGAC GATGCCGCGC
 CTGCTACGTT TCGTAAATGG TATTGGGCGG CCGGTAGCTG CTACGGCGCG
 ·LGluLysPhe SerValVal SerIleCysGln GlnTyrArg GlnLeuGln
 10801 TGGAAAATC CAGCGTCGTA TCCATTTGTC AGCAGTACCG TCAGCTGCAG
 ACCTTTTAA GTCGCAGCAT AGGTAAACAG TCGTCATGGC AGTCGACGTC
 ArgThr***

orf10(yibD) →

Met SerGlnThr

 10851 CGCACCTGAC GCCGTTAGTT AACCAGGATC GGAGATTTAT GAGTCAAACG
 GCGTGGACTG CGCAATCAA TTGGTCCTAG CCTCTAAATA CTCAGTTTGC
 ProLeuLeuSer IleValAla AlaValTyr AsnGlyGluLys PheLeuAla·
 10901 CCTTTATTGA GCATCGTGGC TGCCGTCTAC AACGGTGAGA AATTTCTAGC
 GGAAATAACT CGTAGACCG ACGGCAGATG TTGCCACTCT TTAAAGATCG
 ·GlnPhePhe GluCysIleGlu GlnGlnGln LeuAspSer TyrGluLeuIle·
 10951 GCAATCTTT GAGTGCATTG AACAGCAGCA GCTGGACAGC TATGAACTGA
 CGTTAAGAAA CTCACGTAAC TTGTGCGTGT CGACCTGTCTG AACTTGTACT
 ·ILeuValAsn AspGlySer ThrAspAsnSer LeuAlaVal IleAlaGlu
 11001 TCCTGGTGAA CGATGGTTCG ACAGACAACA GCCTGGCGGT GATCGCCGAA
 AGGACCACTT GCTACCAAGC TGTCTGTTGT CGGACCGCCA CTAGCGGCTT
 TrpGlnGluArg LeuGlnAsn ValGlnVal LeuGluGlnGlu AsnGlnGly·
 11051 TGGCAGGAGC GGCTGCAGAA CGTCCAGGTG CTGGAGCAGG AAAACCAGGG
 ACCGTCCTCG CCGACGTCTT GCAGGTCCAC GACCTCGTCC TTTTGGTCCC
 ·ValSerVal AlaArgAsnThr GlyLeuAla AlaAlaSer GlyLysTyrLeu·
 11101 CGTCTCGGTC GCGCGCAATA CCGGCCTCGC CGCCGCCAGC GGCAAATATC
 GCAGAGCCAG CGCGGTTAT GGCCGGAGCG GCGGCGGTCTG CCGTTTATAG
 ·LAlaPhePro AspIleAsp AspLysLeuTyr ProGlyMet TyrArgThr
 11151 TCGCGTTTCC GGATATCGAC GACAACTCT ATCCGGGCAT GTATCGCACG
 AGCGCAAAGG CCTATAGCTG CTGTTTGAGA TAGGCCCGTA CATAGCGTGC
 LeuValGluMet AlaGluLys GluHisLeu AspIleAlaThr CysAsnGly·
 11201 CTGGTGGAGA TGGCCGAGAA AGAACATCTC GATATCGCTA CCTGCAACGG
 GACCACCTCT ACCGGCTCTT TCTTGTAGAG CTATAGCGAT GGACGTTGCC
 ·ThrTyrVal TyrGluLysArg ArgGluSer HisProIle PheProLeuAsp·
 11251 CACCTATGTG TACGAAAAGC GCCGCGAGAG CCACCCAATC TTCCCACTGG
 GTGGATACAC ATGCTTTTCG CGGCGCTCTC GGTGGGTTAG AAGGGTGACC

•AArgLeuPro SerThrAsp ValLeuProGly HisValTrp LeuLysGln
 11301 ATCGTCTGCC CTCGACGGAT GTGCTGCCGG GCCATGTCTG GCTTAAGCAG
 TAGCAGACGG GAGCTGCCTA CACGACGGCC CGGTACAGAC CGAATTCGTC
 AlaLeuAspSer ArgLysPhe LeuHisVal ThrTrpLeuAsn IleTyrArg•
 11351 GCCCTGGACT CGCGGAAGTT TCTGCACGTC ACCTGGCTTA ATATTTATCG
 CGGGACCTGA GCGCCTTCAA AGACGTGCAG TGGACCGAAT TATAAATAGC
 •HisAspPhe IleArgGlnHis HisPheHis PheGluPro GlyLeuArgHis•
 11401 TCACGACTTT ATCCGCCAGC ATCACTTCCA TTTTCGAGCCT GGCCTGCGCC
 AGTGTGAAA TAGGCGGTCG TAGTGAAGGT AAAGCTCGGA CCGGACGCGG
 •HGlnAspIle ProTrpThr ThrGluAlaLeu LeuAlaAla GluArgVal
 11451 ATCAGGATAT CCCATGGACC ACAGAAGCCC TGCTGGCCGC GGAGCGCGTG
 TAGTCTTATA GGTACCTGG TGTCTTCGGG ACGACCGCGC CCTCGCGCAC
 GlnTyrThrSer GlnGlnPhe TyrAspTyr TyrIleHisSer GluSerVal•
 11501 CAGTACACCA GTCAGCAGTT CTATGATTAC TACATTCACT CTGAGTCGGT
 GTCATGTGGT CAGTCGTCAA GATACTAATG ATGTAAGTGA GACTCAGCCA
 •SerHisLys ProAspAsnAsp AspThrLeu MetArgSer AlaArgHisTyr•
 11551 GTCGCATAAG CCGGACAACG ACGACACGCT GATGCGTTTCG GCGCGCCACT
 CAGCGTATTC GGCCTGTTGC TGCTGTGCGA CTACGCAAGC CGCGCGGTGA
 •TMetLysIle LeuGluMet LeuGluAlaIle AsnGlnArg TyrProAsp
 11601 ATATGAAGAT TCTGGAGATG CTGGAGGCGA TTAACCAGCG CTACCCGGAT
 TATACTTCTA AGACCTCTAC GACCTCCGCT AATTGGTCGC GATGGGCCTA
 LysValArgHis IleAlaAla CysArgTrp GlnIleAlaLys GluGlyLeu•
 11651 AAAGTACGCC ATATCGCCGC CTGTCGCTGG CAGATCGCCA AAGAAGGCCT
 TTTTCATGCGG TATAGCGGCG GACAGCGACC GTCTAGCGGT TTCTTCCGGA
 •GlyIleIle HisThrPheAsp SerMetLys AspGluSer LysLysHisVal•
 11701 GGGGATCATC CATACTTCG ATAGCATGAA AGATGAGTCC AAAAAGCATG
 CCCCTAGTAG GTATGGAAGC TATCGTACTT TCTACTCAGG TTTTTCGTAC
 •VIleIleAsn GluPhePhe AspArgGlyIle TrpArgLeu IleTrpLys
 11751 TTATTATTAA CGAGTTCTTC GACCGCGGTA TCTGGCGGTT AATCTGGAAA
 AATAATAATT GCTCAAGAAG CTGGCGCCAT AGACCGCAA TTAGACCTTT
 AsnAlaCysThr PheArgLeu ArgTrpArg LeuGlyArgArg TyrLeuArg•
 11801 AACGCCTGTA CTTTCCGTTT ACGCTGGCGC CTGGGACGCC GTTATCTGCG
 TTGCGGACAT GAAAGGCAAA TCGGACCGCG GACCCTGCGG CAATAGACGC
 •IleLysArg TyrArgHisAla Gly***
 11851 TATTAAGCGT TATCGCCACG CGGGA**TAGAC** CAAAACCCG CTGTTTCCGC
 ATAATTGCA ATAGCGGTGC GCCCTATCTG GTTTTTGGGC GACAAAGGCG
 11901 CAAAGAGATA GCTTTACGCG GGCTAAATGC TTAGAATTTG CCCGCCAAA
 GTTTCTCTAT CGAAATGCGC CCGATTTACG AATCTTAAAC GGGCGGTTTT

11951 CAGAGAACGG ATAAATAGTT TGAATTGCT TTATACCACC CTACTTTACC
 GTCTCTTGCC TATTTATCAA ACCTTAACGA AATATGGTGG GATGAAATGG

orf11(waaA) →

ValTrp LeuArgLeuLeu LeuArgSer ArgLysAla

12001 TTATTCAGCC GCTG**GTG**TGG CTGCGGCTGC TGCTGCGCAG TCGTAAGGCT
 AATAAGTCGG CGACCACACC GACGCCGACG ACGACGCGTC AGCATTCCGA
 ProAlaTyrArg LysArgTrp AlaGluArg TyrGlyPheCys GlnAsnLys·

12051 CCTGCCATC GCAAACGCTG GCGGAACGC TATGGCTTCT GTCAGAACAA
 GGACGGATAG CGTTTGCAC CCGCCTTGCG ATACCGAAGA CAGTCTTGTT
 ·ValGluPro AspGlyIleLeu LeuHisSer ValSerVal GlyGluThrLeu·

12101 GGTAGAGCCG GATGGCATTG TGCTGCACTC CGTTTCCGTC GCGGAGACCT
 CCATCTCGGC CTACCGTAAG ACGACGTGAG GCAAAGGCAG CCGCTCTGGA
 ·LAlaAlaIle ProLeuVal ArgAlaLeuArg HisArgTyr ProSerLeu

12151 TAGCCGCCAT TCCGCTGGTC CGCGCCCTGC GCCACCGCTA CCCTTCTCTG
 ATCGGCGGTA AGGCGACCAG GCGCGGGACG CGGTGGCGAT GGAAGAGAC
 ProIleThrVal ThrThrMet ThrProThr GlySerGluArg AlaMetSer·

12201 CCGATCACCG TCACCACCAT GACGCCGACC GGCTCCGAGC GCGCCATGTC
 GGCTAGTGGC AGTGGTGGTA CTGCGGCTGG CCGAGGCTCG CGCGGTACAG
 ·AlaPheGly LysAspValHis HisValTyr LeuProTyr AspLeuProGly·

12251 GGCGTTTGGC AAAGATGTTT ATCACGTCTA TCTGCCCTAC GATCTGCCCCG
 CCGCAAACCG TTTCTACAAG TAGTGCAGAT AGACGGGATG CTAGACGGGC
 ·GAlaMetAsn ArgPheLeu AsnThrValGln ProLysLeu ValIleVal

12301 GCGCCATGAA CCGCTTCCTG AACACCGTTC AGCCGAAGCT GGTGATCGTT
 CGCGGTACTT GGCGAAGGAC TTGTGGCAAG TCGGCTTCGA CCACTAGCAA
 MetGluThrGlu LeuTrpPro AsnMetVal AlaAlaLeuHis LysArgLys·

12351 ATGGAGACCG AGCTGTGGCC GAATATGGTG GCCGCGCTGC ATAAGCGTAA
 TACCTCTGGC TCGACACCGG CTTATACCAC CGGCGCGACG TATTCGCATT
 ·IleProLeu ValIleAlaAsn AlaArgLeu SerGluArg SerAlaLysGly·

12401 GATCCCGCTG GTGATCGCCA ACGCGCGCCT GTCCGAACGT TCCGCCAAAG
 CTAGGGCGAC CACTAGCGGT TGCGCGCGGA CAGGCTTGCA AGGCGGTTTC
 ·GTyrAlaLys LeuGlyGly PheMetArgArg LeuLeuSer ArgIleThr

12451 GCTATGCCAA ACTGGGCGGC TTTATGCGCC GCCTGTTGAG CCGCATTACG
 CGATACGGTT TGACCCGCCG AAATACGCGG CGGACAACCTC GCGTAATGC
 LeuIleAlaAla GlnAsnGlu GluAspGly AsnArgPheLeu SerLeuGly·

12501 CTTATCGCCG CGCAGAATGA AGAAGATGGT AACCCTTCC TCTCTCTGGG
 GAATAGCGGC GCGTCTTACT TCTTCTACCA TTGGCGAAGG AGAGAGACCC

•LeuLysArg AsnGlnLeuAla ValThrGly SerLeuLys PheAspIleSer•
 12551 GCTGAAGCGC AACAGCTGG CGGTCACCGG CAGCCTGAAA TTCGATATCT
 CGACTTCGCG TTGGTCGACC GCCAGTGGCC GTCGGACTTT AAGCTATAGA
 •SValThrPro GluLeuAla AlaArgAlaVal ThrLeuArg ArgGlnTrp
 12601 CTGTACAGCC AGAGCTGGCG GCCCCGGCGG TGACGCTGCG TCGGCAATGG
 GACAGTGCGG TCTCGACCGC CGGGCCCGCC ACTGCGACGC AGCCGTTACC
 AlaProHisArg LysValTrp IleAlaThr SerThrHisAsp GlyGluGlu•
 12651 GCACCGCACC GCAAGGTCTG GATTGCCACC AGCACCCACG ACGGTGAAGA
 CGTGGCGTGG CGTTCCAGAC CTAACGGTGG TCGTGGGTGC TGCCACTTCT
 •GlnIleIle LeuGlnAlaHis LysLysLeu LeuGluThr PheProAsnLeu•
 12701 ACAAATCATC CTCCAGGCGC ATAAAAAACT GCTGGAGACT TTCCCGAACC
 TGTTTAGTAG GAGGTCCGCG TATTTTTTGA CGACCTCTGA AAGGGCTTGG
 •LLeuLeuIle LeuValPro ArgHisProGlu ArgPhePro AspAlaArg
 12751 TGCTGCTGAT CCTTGTTCCT CGCCATCCGG AGCGCTTCCC TGACGCCCGT
 ACGACACTA GGAACAAGGG GCGGTAGGCC TCGCGAAGGG ACTGCGGGCA
 GluMetValGln LysAlaGly MetSerPhe ThrLeuArgSer ThrGlyGlu•
 12801 GAGATGGTAC AAAAGGCTGG GATGAGCTTT ACTCTGCGCA GCACCGGCGA
 CTCTACCATG TTTTCGACC CTACTCGAAA TGAGACGCGT CGTGGCCGCT
 •IleProSer SerSerThrGln ValValIle GlyAspThr MetGlyGluLeu•
 12851 GATCCCCTCC TCCAGTACCC AGGTAGTCAT TGGCGATACC ATGGGCGAGC
 CTAGGGGAGG AGGTCATGGG TCCATCAGTA ACCGCTATGG TACCCGCTCG
 •LMetLeuLeu TyrGlyIle AlaAspLeuAla PheValGly GlySerLeu
 12901 TGATGCTGCT CTACGGCATT GCCGACCTCG CCTTCGTCGG CGGCAGCCTA
 ACTACGACGA GATGCCGTAA CGGCTGGAGC GGAAGCAGCC GCCGTCGGAT
 ValGluArgGly GlyHisAsn ProLeuGlu ProAlaAlaHis AlaIlePro•
 12951 GTGGAGCGCG GCGGCCATAA CCCGCTAGAG CCGGCGGCGC ACGCCATTCC
 CACCTCGCGC CGCCGGTATT GGGCGATCTC GGCCGCCGCG TCGGTAAGG
 •ValLeuMet GlyProHisThr PheAsnPhe LysAspIle CysAlaLysLeu•
 13001 GGTGCTGATG GGTCCGCATA CCTTCAACTT CAAAGATATC TGCGCCAAGC
 CCACGACTAC CCAGGCGTAT GGAAGTTGAA GTTTCTATAG ACGCGGTTCG
 •IGlnGlnAsp AspGlyLeu IleThrValThr AspAlaAsp SerLeuVal
 13051 TGCAGCAGGA CGATGGCCTG ATCACCGTTA CCGATGCCGA TTCGCTGGTC
 ACGTCGTCTT GCTACCGGAC TAGTGGCAAT GGCTACGGCT AAGCGACCAG
 ArgGluValSer ThrLeuLeu ThrAspGlu AspTyrArgLeu TrpTyrGly•
 13101 AGGGAGGTGT CCACGCTCCT GACCGATGAA GATTACCGTC TGTGGTATGG
 TCCCTCCACA GGTGCGAGGA CTGGCTACTT CTAATGGCAG ACACCATAAC

•ArgHisAla ValGluValLeu HisGlnAsn GlnGlyAla LeuSerArgLeu•
 13151 CCGTCACGCG GTGGAAGTGC TGCATCAGAA CCAGGGCGCG CTGTCCGCGTC
 GGCAGTGCGC CACCTTCACG ACGTAGTCTT GGTCCCAGCG GACAGCGCAG
 •LLeuGlnLeu LeuGlnPro TyrLeuProGln ArgSerHis ***
orf12(waaE) →
MetSerAsn•
 13201 TGCTACAGTT ACTGCAACCT TACCTGCCGC AGCGGAGTCA TTAATGTCGA
 ACGATGTCAA TGACGTTGGA ATGGACGGCG TCGCCTCAGT AATTACAGCT
 •AArgLeuSer ValValMet IleAlaLysAsn AlaAlaAsp LeuLeuPro
 13251 ACCGGCTTTC CGTGGTGATG ATCGCTAAAA ACGCCGCCGA CCTGCTGCCG
 TGGCCGAAAG GCACCACTAC TAGCGATTTT TGCGGCGGCT GGACGACGGC
 AspCysLeuGly SerValSer TrpAlaAsp GluIleIleVal LeuAspSer•
 13301 GATTGTCTGG GCTCCGTTAG CTGGGCGGAT GAAATTATCG TCCTCGACTC
 CTAACAGACC CGAGGCAATC GACCCGCCTA CTTTAATAGC AGGAGCTGAG
 •GlySerThr AspAsnThrVal GluLeuAla ArgArgLeu GlyAlaGlnVal•
 13351 CGGCAGCACC GACAACACCG TTGAGCTGGC CCGCCGCCTC GGCGCCCAGG
 GCCGTCGTGG CTGTTGTGGC AACTCGACCG GCGGGCGGAG CCGCGGGTCC
 •VTyrThrHis ThrAspTrp ArgGlyTyrGly IleGlnArg GlnArgAla
 13401 TCTATACCCA TACCGACTGG CGAGGCTATG GCATTCAGCG CCAGCGCGCG
 AGATATGGGT ATGGCTGACC GCTCCGATAC CGTAAGTCGC GGTCCGCGCG
 GlnAspTyrAla ThrGlyAsp TrpValLeu MetIleAspThr AspGluArg•
 13451 CAGGATTACG CCACCGGCGA CTGGGTGTTG ATGATCGATA CCGATGAGCG
 GTCCTAATGC GGTGGCCGCT GACCCACAAC TACTAGCTAT GGCTACTCGC
 •ValThrPro GluLeuArgGln AlaIleLeu LysValLeu AspAlaSerGln•
 13501 CGTCACGCCA GAACTCAGGC AGGCTATTCT TAAGGTACTG GACGCCTCCC
 GCAGTGCGGT CTTGAGTCCG TCCGATAAGA ATTCCATGAC CTGCGGAGGG
 •GArgGlyAla IleTyrSer IleAlaArgArg AsnTyrPhe LeuGlyArg
 13551 AGCGCGGCGC CATCTACAGC ATCGCCCGCC GTAACCTATT TCTCGGACGC
 TCGCGCCGCG GTAGATGTCT TAGCGGGCGG CATTGATAAA AGAGCCTGCG
 PheMetArgHis SerGlyTrp TyrProAsp ArgValLeuArg LeuTyrGlu•
 13601 TTTATGCGCC ACAGCGGTTG GTATCCCGAT CGCGTCCTGC GCCTGTACGA
 AAATACGCGG TGTCGCCAAC CATAGGGCTA GCGCAGGACG CGGACATGCT
 •ArgAlaArg TyrArgTyrAsn AspAsnLeu ValHisGlu SerLeuAspSer•
 13651 ACGCGCCCGT TACCGCTATA ACGATAATCT GGTCCATGAA TCGCTGGATA
 TGCGCGGGCA ATGGCGATAT TGCTATTAGA CCAGGTAATT AGCGACCTAT
 •SLeuGlyAla GluValIle ProLeuThrGly AspLeuLeu HisLeuThr
 13701 GCCTGGGCGC CGAGGTTATT CCGCTGACCG GCGATCTCCT GCACCTGACC
 CGGACCCGCG GCTCCAATAA GGCGACTGGC CGCTAGAGGA CGTGGACTGG

CysArgAspPhe AlaGlyPhe GlnGlnLys GlnLeuAlaTyr AlaAlaAla·
 13751 TGCCGCGACT TCGCTGGCTT CCAGCAAAAA CAGCTGGCGT ATGCCGCCGC
 ACGGCGCTGA AGCGACCGAA GGTCGTTTTT GTCGACCGCA TACGGCGGCG
 ·TrpAlaLeu GluArgHisGln LysGlyLys LysThrSer MetAlaGlyIle·
 13801 GTGGGCGCTT GAGCGTCACC AGAAGGGCAA GAAGACCTCG ATGGCAGGGA
 CACCCGCGAA CTCGCAGTGG TCTTCCCGTT CTTCTGGAGC TACCGTCCCT
 ·IPheSerHis ThrLeuGly AlaPheLeuLys ThrLeuLeu LeuArgGly
 13851 TTTTCAGCCA TACGCTGGGC GCGTTCCTCA AGACGTTGCT ATTGCGCGGT
 AAAAGTCGGT ATGCGACCCG CGCAAGGAGT TCTGCAACGA TAACGCGCCA
 GlyValLeuAsp GlyLysGln GlyTrpLeu LeuAlaMetVal AsnAlaGln·
 13901 GGGGTGCTGG ACGGTAAACA GGGATGGTTA CTGGCGATGG TCAACGCGCA
 CCCACGACC TGCCATTTGT CCCTACCAAT GACCGCTACC AGTTGCGCGT
 ·TyrThrPhe ThrLysTyrThr GluLeuTrp AlaLeuSer HisGlyTyrSer·
 13951 GTATACGTTT ACGAAATATA CCGAGCTGTG GCGCCTGAGC CACGGCTACT
 CATATGCAA TGCTTTATAT GGCTCGACAC CCGCGACTCG GTGCCGATGA
 ·SGluLysGlu SerSer***
 14001 CGGAGAAAGA GTCATCA**TGA** GCACAAAAGC GATCTATCCG GGTACCTTCG
 GCCTCTTTCT CAGTAGTACT CGTGTTTTTCG CTAGATAGGC CCATGGAAGC
 14051 ACCCTATCAC CAACGGTCAT ATCGATATTG TCACCCGCGC GGCAAGTATG
 TGGGATAGTG GTTGCCAGTA TAGCTATAAC AGTGGGCGCG CCGTTCATAC
 14101 TTCGATAAAG TGGTGCTGGC TATCGCCGCC AGCCCAGTA AAAAGCCGAT
 AAGCTATTTT ACCACGACCG ATAGCGGCGG TCGGGCTCAT TTTTCGGCTA
 14151 GTTCAGCCTT GATGAGCGCA TTGCGCTGGC AGAGCAGGCG ACGGCCACC
 CAAGTCGGAA CTACTCGCGT AACGCGACCG TCTCGTCCGC TGCCGGGTGG
 14201 TGGTGAACGT GGAGGTTATC GGCTTCAGTG ATTTAATGGC CAATTTGCGC
 ACCACTTGCA CCTCCAATAG CCGAAGTCAC TAAATTACCG GTTAAAGCGC
 14251 CGCGCGCAGC AGGCCAATAT CCTGATCCGC GGCCTGCGGG CGGTGGCTGA
 GCGCGCGTCG TCCGGTTATA GGACTAGGCG CCGGACGCC GCCACCGACT
 14301 TTTCGAGTAT GAGATGCAGC TGGCTCATAT GAACCGCCAC CTGATGCCCA
 AAAGCTCATA CTCTACGTCG ACCGAGTATA CTTGGCGGTG GACTACGGGT
 14351 CCCTTGAGAG CGTGTTTCTG ATGCCGTGCA AAGAGTGGTC GTTTATC
 GGGAACTCTC GCACAAAGAC TACGGCACGT TTCTACCAG CAAATAG