



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Polímeros capsulares bacterianos en *E. coli* K92:  
ácido colánico y ácido polisiálico**

Tesis Doctoral presentada por

Nicolás Navasa Mayo

Octubre, 2009



A mi madre,  
que siempre está ahí



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a los Drs. D. Leandro Rodríguez Aparicio y D. Miguel Ángel Ferrero García, su gran esfuerzo como Directores para ayudarme en la elaboración de esta tesis y, más importante aún, su comprensión como amigos para tratar de entenderme.

Así mismo, quiero expresar mi enorme gratitud a la Dr. D<sup>a</sup> Honorina Martínez Blanco, porque sus comentarios y consejos siempre suman.

Al Dr. D. Jose María Luengo, que siempre me ayudó desinteresadamente, y a su grupo de investigación, especialmente Elías, Mario, Joaquín, Patricia, con los que he compartido muchos y grandes momentos tanto dentro como fuera del laboratorio.

A todo el resto de compañeros de laboratorio, Marta, Cristina, Álvaro, Pepelu, Fany, y a los que ya no están, Sofía, Vanesa, Sagrario, Ángel, Elsa y Sergio.

A todos los miembros restantes del Departamento de Bioquímica, por hacer de este Departamento un gran Departamento.

Al Dr. D. Juan Anguita, por que siempre confió en mí, y a su grupo de investigación, especialmente a Tonya y Natxo, que siempre estuvieron dispuestos a todo para ayudarme y que hicieron de mis estancias momentos inolvidables.

Al Dr. D. Marcelo C. Sousa y a su grupo de investigación, en especial a Petya, por la paciencia que tuvo para enseñarme.

A Tomás Vigal, Juan Carlos García, Jorge Riaño, Sonia García y a Manuel Martín Pastor, quienes han contribuido en diversas partes de este trabajo.

A mi madre, a mi hermano y a toda mi familia, por que yo sé lo que me han tenido que soportar.

A Andrea, la persona que desde que me conoció, no dudó en compartir conmigo todos mis defectos y virtudes.

Este trabajo ha sido subvencionado por la Dirección General de Investigación (BMC 2003-03575 y AGL 2007-62428) y por la Junta de Castilla y León (JCyL LE44/04 y LE032A08).



<b>1. Introducción.....</b>	<b>11</b>
1.1 Importancia y significado biológico de las estructuras glicosiladas	11
1.2 Estructura de la superficie celular de las bacterias Gram-negativas	14
1.3 Polisacáridos de la superficie bacteriana	17
1.3.1 La cápsula bacteriana	19
1.3.2 Exopolisacáridos capsulares en <i>E. coli</i>	22
1.3.2.1 Clasificación de las cápsulas en <i>E. coli</i>	
1.3.2.2 Cápsulas del grupo 1 y 4 y su relación con el ácido colánico	
1.3.2.3 Cápsulas de ácido colánico. Estructura y función	
1.3.2.4 Parentesco entre las cápsulas del grupo 2 y 3	
1.3.3 Los ácidos siálicos en las cápsulas bacterianas	34
1.4 Organización de los <i>clústers</i> de genes capsulares en <i>E. coli</i>	37
1.4.1 Organización genética de las cápsulas del grupo 2 (ácido polisialico)	37
1.4.2 Organización genética del <i>clúster</i> del ácido colánico	39
1.5 Biosíntesis y ensamblaje de las cápsulas en <i>E. coli</i> . Continuidad en los procesos	41
1.5.1 Biosíntesis y ensamblaje de las cápsulas del grupo 2 (ácido polisialico)	41
1.5.1.1 Síntesis de novo de ácidos polisialicos en <i>E. coli</i>	
1.5.1.2 Reacción de iniciación y naturaleza del aceptor endógeno	
1.5.1.3 Elongación y terminación de las cadenas	
1.5.1.4 Exportación dependiente de transportador ABC	
1.5.2 Biosíntesis y ensamblaje del ácido colánico	45
1.5.2.1 Proteínas de polimerización	
1.5.2.2 Exportación y ensamblaje en la superficie celular	
1.6 Regulación de la expresión de las cápsulas en <i>E. coli</i>	50
1.6.1 Regulación de la síntesis de las cápsulas del grupo 2	50
1.6.2 Regulación de la síntesis de ácido colánico	52
1.6.2.1 Regulación a nivel de transcripción: el sistema Rcs	
1.6.2.2 Regulación a nivel de biosíntesis. El papel de Wzc	
<b>Objetivos.....</b>	<b>59</b>
<b>2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>63</b>
2.1 Materiales	65

2.1.1 Material biológico	65
2.1.1.1 Condiciones de crecimiento	
2.1.1.2 Mantenimiento de las cepas	
2.1.2 Vectores	67
2.1.3 Ácidos nucleicos	68
2.1.4 Medios de cultivo	68
2.1.5 Aditivos de los medios de cultivo	70
<b>2.2 Métodos empleados para la purificación y el análisis de glúcidos</b>	<b>72</b>
2.2.1 Cuantificación del ácido colánico (CA) y del ácido polisialico (PA)	72
2.2.2 Cuantificación de azúcares totales	73
2.2.3 Purificación del polímero capsular de ácido colánico	73
2.2.3.1 Método de purificación de ácido colánico empleado para el análisis mediante RMN	
2.2.4 Purificación del LPS de <i>E. coli</i> K92	75
2.2.5 Análisis mediante espectroscopia de infrarrojos (FT-IR) del ácido colánico	75
2.2.6 Análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) del ácido colánico	76
2.2.7 Análisis mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	77
2.2.8 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	78
2.2.9 Tinción de geles SDS-PAGE (tinción con plata)	79
2.2.10 Transferencia a membrana de nitrocelulosa de carbohidratos	80
2.2.11 Inmunodetección	81
2.2.12 Estudio de la capacidad inmunogénica del ácido colánico	83
2.2.13 Estudio de la capacidad protectora del ácido colánico frente al estrés osmótico y oxidativo	83
2.2.14 Estudio de la influencia del ácido colánico sobre la capacidad de adhesión de <i>E. coli</i> K92	84
2.2.14.1 Adhesión a placas de poliestireno de 24 pocillos	
2.2.14.2 Adhesión a placas de poliestireno de 96 pocillos	
2.2.14.3 Adhesión a placas de acero inoxidable, capuchones de silicona y teflón	
2.2.14.4 Ensayo de la adhesión <i>in vitro</i> a células Caco-2	
2.2.15 Determinación de la capacidad del ácido colánico para	87



modular la inflamación debida a infección con <i>Borrelia burgdorferi</i>	
2.2.16 Observación de las estructuras capsulares	89
2.2.16.1 Observación de las estructuras capsulares. Tinción negativa	
2.2.16.1.1 Tinción con ácido fosfotúngstico	
2.2.16.1.2 Tinción Burry-Tinta china	
<b>2.3 Técnicas generales de manipulación y análisis del ADN</b>	<b>91</b>
2.3.1 Aislamiento de ADN total de <i>E. coli</i>	91
2.3.1.1 Aislamiento del ADN a gran escala	
2.3.1.2 Aislamiento del ADN a pequeña escala	
2.3.2 Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	93
2.3.2.1 Sistema comercial	
2.3.2.2 Minipreparaciones por el método de Boiling	
2.3.3 Digestión y modificación del ADN	94
2.3.3.1 Protocolo general de digestión del ADN con una endonucleasa de restricción	
2.3.3.2 Ligación de los fragmentos de ADN	
2.3.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	95
2.3.5 Observación de las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa	96
2.3.5.1 Extracción de ADN a partir de geles de agarosa	
2.3.6 Obtención de cepas mutantes mediante delección	97
2.3.7 Transformación de <i>E. coli</i>	100
2.3.7.1 Obtención de células competentes por el método del cloruro de rubidio	
2.3.7.1.1 Procedimiento de transformación	
2.3.7.2 Obtención de células competentes para transformación mediante electroporación	
2.3.7.2.1 Procedimiento de electrotransformación	
2.3.8 Conjugación entre cepas de <i>E. coli</i>	103
2.3.9 Secuenciación de ADN y análisis bioinformático	104
<b>2.4 Técnicas generales de manipulación y análisis de ARN</b>	<b>105</b>
2.4.1 Aislamiento de ARN total	105
2.4.2 RT-PCR y Q-PCR	106
2.4.2.1 Síntesis de ADNc	

2.4.2.2 Q-PCR	
<b>2.5 Técnicas para el estudio de proteínas</b>	<b>109</b>
2.5.1 Preparación de extractos crudos	109
2.5.2 Expresión heteróloga y purificación de la proteína Wzc en <i>E. coli</i>	109
2.5.2.1 Protocolo para la expresión de genes en <i>E. coli</i>	
2.5.2.2 Purificación mediante cola de histidina	
2.5.3 Cuantificación de proteínas	111
2.5.4 Electroforesis SDS-PAGE	112
2.5.5 Tinción de geles SDS-PAGE (tinción con azul de Coomassie)	112
2.5.6 Transferencia a membrana nitrocelulosa de proteínas	112
2.5.7 Detección inmunológica de proteínas inmovilizadas	112
2.5.8 Obtención de anticuerpos policlonales	114
<b>3. Resultados y Discusión.....</b>	<b>115</b>
<b>3.1 Crecimiento y producción de polímeros capsulares en <i>E. coli</i> K92</b>	<b>117</b>
3.1.1 Observaciones fenotípicas derivadas del crecimiento celular	117
3.1.2 Identificación del ácido colánico como polímero producido por <i>E. coli</i> K92 mediante técnicas de FT-IR, GC-MS y NMR	120
3.1.3 Factores físico-químicos que afectan a la producción de polímeros capsulares	132
3.1.3.1 Producción de CA en diferentes medios de crecimiento	
3.1.3.2 Producción de polímeros capsulares a diferentes temperaturas de crecimiento	
<b>3.2 Caracterización morfológica y significado biológico de las estructuras capsulares de <i>E. coli</i> K92</b>	<b>138</b>
3.2.1 Estudio morfológico de las estructuras capsulares sintetizadas por <i>E. coli</i> K92	138
3.2.2 Significado biológico del PA y CA en <i>E. coli</i> K92	140
3.2.2.1 Resistencia al estrés osmótico y oxidativo del PA y CA	
3.2.2.2 Implicación del PA y CA en la adhesión de <i>E. coli</i> K92 a poliestireno	
3.2.2.3 Análisis inmunogénico del CA	
3.2.2.4 Determinación de la capacidad del CA para modular la inflamación debida a infección con <i>Borrelia burgdorferi</i>	

3.2.2.4.1 Desarrollo de la inflamación	
3.2.2.4.2 Respuesta de anticuerpos	
3.2.2.4.3 Producción de citoquinas proinflamatorias por células inmunes innatas (TNF e IL-12)	
3.2.2.4.4 Desarrollo de respuesta Th1 (IFN $\gamma$ )	
<b>3.3 Análisis molecular de la biosíntesis y regulación de los polímeros capsulares producidos por <i>E. coli</i> K92</b>	<b>152</b>
3.3.1 Análisis de la expresión de genes implicados en la biosíntesis y/o regulación de CA y PA	152
<b>3.4 Obtención y estudio de mutantes relacionados con el metabolismo de los polímeros capsulares producidos por <i>E. coli</i> K92</b>	<b>160</b>
3.4.1 Análisis del gen <i>rcsA</i> en <i>E. coli</i> K92	160
3.4.1.1 Curvas de crecimiento y producción de polímeros capsulares en <i>E. coli</i> K92 $\Delta$ <i>rcsA</i>	
3.4.1.2 Caracterización morfológica de <i>E. coli</i> K92 $\Delta$ <i>rcsA</i>	
3.4.1.3 Análisis de la expresión de genes en <i>E. coli</i> K92 $\Delta$ <i>rcsA</i>	
3.4.1.4 Capacidad protectora del CA en <i>E. coli</i> K92	
3.4.1.4.1 Resistencia frente a agentes estresantes	
3.4.1.4.2 Resistencia frente a antibióticos	
3.4.1.5 Implicación de RcsA en la formación de biofilms	
3.4.1.5.1 Adhesión a placas de poliestireno	
3.4.1.5.2 Adhesión a superficies abióticas y bióticas	
3.4.2 Análisis del gen <i>rcsB</i> en <i>E. coli</i> K92	176
3.4.2.1 Curvas de crecimiento y producción del mutante <i>E. coli</i> K92 $\Delta$ <i>rcsB</i>	
3.4.2.2 Análisis de la expresión de genes en <i>E. coli</i> K92 $\Delta$ <i>rcsB</i>	
3.4.3 Análisis del gen <i>rfaH</i> en <i>E. coli</i> K92	185
3.4.3.1 Curvas de crecimiento y producción de CA y PA	
3.4.3.2 Análisis de la expresión de genes en <i>E. coli</i> K92 $\Delta$ <i>rfaH</i>	
<b>4. Conclusiones.....</b>	<b>195</b>
<b>5. Anexos.....</b>	<b>199</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>205</b>



## ABREVIATURAS

- A:** absorbancia  
**ABC:** superfamilia de proteínas transportadoras (*ATP Binding Cassettes*)  
**AcCoA:** acetil-coenzima A  
**ADN:** ácido desoxirribonucleico  
**ADNasa:** desoxirribonucleasa  
**ADNc:** ADN complementario sintetizado a partir de ARNm  
**AHL:** N-acilhomoserinalactona  
**Ap:** Ampicilina  
**ARN:** ácido ribonucleico  
**ARNasa:** ribonucleasa  
**Asn:** asparragina  
**ATCC:** Asociación Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection*)  
**ATP:** adenosina 5' trifosfato
- BrEt:** bromuro de etidio  
**BSA:** albúmina sérica bovina
- CA:** ácido colánico  
**Caco:** células epiteliales derivadas de adenocarcinoma de colon humano (*Human Adenocarcinoma Intestinal Epithelial Cells*)  
**CIA:** cloroformo-alcohol isoamílico  
**Cm:** Cloranfenicol  
**CMP:** citosina monofosfato  
**Col:** colitosa  
**CPS:** exopolisacárido capsular  
**C<sub>T</sub>:** *Cycle Threshold*
- DEPC:** dietilpirocarbonato  
**DQF-COSY:** *Double-Quantum-Filtered Correlation Spectroscopy*  
**DRE:** *Downstream Regulatory Element*  
**DTT:** ditiotreitól
- ECA:** antígeno común enterobacteriano (*Enterobacterial Common Antigen*)  
**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético  
**EHEC:** *E. coli* enterohemorrágica  
**ELISA:** *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*  
**EMEM:** *Eagle's Minimum Essential Medium*  
**EPEC:** *E. coli* enteropatogénica  
**EPS:** exopolisacárido  
*et al.:* *et alia* (y otros)  
**ETEC:** *E. coli* enterotoxigénica
- Fru:** fructosa  
**FT-IR:** Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared*)  
**Fuc:** fucosa
- Gal:** galactosa  
**GalNAc:** N-acetilgalactosamina  
**GC-MS:** cromatografía de gases-espectrometría de masas  
**GDP:** guanosina 5' difosfato  
**Glc:** glucosa  
**GlcA:** ácido glucurónico  
**GlcN:** glucosamina  
**Gly:** glicerol  
**GST:** *glutathione S-transferase*  
**GTPasa:** guanosina 5' trifosfatasa  
**GTs:** glicosiltransferasas
- H<sub>2</sub>Od:** agua destilada  
**HK:** histidina quinasa  
**HPt:** fosfotransferasa de histidina  
**HR-MAS:** *High-Resolution Magic Angle Spinning*  
**HSQC:** *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*
- IFN:** interferón  
**IgG:** inmunoglobulina G  
**IHF:** *Integration Host Factor*  
**IL:** interleucina  
**IPTG:** Isopropil-β-D-galactopiranosido
- JUMPStart:** *Just Upstream of Many bacterial Polysaccharide gene Starts*
- kDa:** kilodalton  
**KDO,** ácido 3-desoxi-D-mano-octulosónico  
**K<sub>LPS</sub>:** antígeno K del lipopolisacárido  
**Km:** Kanamicina  
**kV:** kilovoltios
- Lac:** lactosa  
**LPS:** lipopolisacárido
- Mal:** maltosa  
**Man:** manosa  
**ManNAc:** N-acetilmanosamina  
**MHz:** megahercios  
**MIR:** región media del infrarrojo (*mid-infrared region*)  
**MM:** medio mínimo  
**MOPS:** ácido morfolinopropanosulfónico  
**MPA:** familia de proteínas auxiliares de membrana periplásmica (*Membrana Periplasmic Auxiliary*)
- NBD:** dominio proteico de unión a nucleótidos (*Nucleotide-Binding Protein Domain*)  
**N-CAM:** moléculas de adhesión celular neural (*Neural Cell Adhesion Molecule*)

<b>Neu5Ac:</b> ácido N-acetilneuramínico	<b>TNF:</b> factor de necrosis tumoral
<b>NOE:</b> <i>Nuclear Overhauser Effect</i>	<b>TOCSY:</b> <i>Total Correlation Spectroscopy</i>
<b>NOESY:</b> <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>	<b>Tyr:</b> tirosina
<b>OAc:</b> grupo O-acetil	<b>UDP:</b> uridina difosfato
<b>OMA:</b> familia de proteínas auxiliares de membrana externa ( <i>Outer-Membrane Auxiliary</i> )	<b>UFC:</b> unidades formadoras de colonia
<b>ops:</b> operon polarity supresor	<b>Und:</b> undecaprenol
<b>ORF:</b> fragmento de lectura abierto ( <i>Open Reading Frame</i> )	<b>UTR:</b> región 5' sin traducir ( <i>5'untranslated region</i> )
<b>p/v:</b> relación peso/volumen	<b>v/v:</b> relación volumen /volumen
<b>P:</b> ortofosfato	<b>X-Gal:</b> 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
<b>PAGE:</b> electroforesis en gel de poliacrilamida	<b>Xil:</b> xilosa
<b>PBS:</b> tampón fosfato salino ( <i>Phosphate buffered saline</i> )	
<b>PCP:</b> familia de proteínas copolimerasas de polisacáridos ( <i>Polysaccharide Co-Polimerase</i> )	
<b>PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )	
<b>PEP:</b> fosfoenolpiruvato	
<b>Pep:</b> peptidoglicano	
<b>Pm:</b> peso molecular	
<b>PMNL:</b> polimorfonucleares	
<b>PP:</b> pirofosfato	
<b>ppm:</b> partes por millón	
<b>PR:</b> promotor	
<b>Pro:</b> prolina	
<b>PSA:</b> ácido polisiálico	
<b>PST:</b> familia de proteínas exportadoras de polisacáridos ( <i>Polysaccharide Transport</i> )	
<b>Q-PCR:</b> <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>	
<b>Qui4NMal:</b> 4-(2-carboxiacetamido)-4,6-dideoxyglucosa	
<b>RCS:</b> sistema para la regulación de la síntesis de cápsulas ( <i>Regulation of Capsule Synthesis</i> )	
<b>Rf:</b> Rifampicina	
<b>Rha:</b> ramnosa	
<b>Rib:</b> ribosa	
<b>Rit:</b> ribitol	
<b>RMN:</b> resonancia magnética nuclear	
<b>rpm:</b> revoluciones por minuto	
<b>RR:</b> regulador de la respuesta	
<b>RT-PCR:</b> <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>	
<b>SDS:</b> dodecil sulfato sódico	
<b>SFB:</b> suero fetal bovino	
<b>TCA:</b> ácido tricloroacético	
<b>TEMED:</b> tetrametiletildiamina	
<b>TFA:</b> trifluoroacético	
<b>TMB:</b> tetrametilbenzidina	
<b>TMD:</b> dominio proteico transmembranal ( <i>TransMembrane Domain</i> )	







# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Importancia y significado biológico de las estructuras glicosiladas

El paradigma central que guía la investigación en Biología Molecular contempla que la información fluye desde el ADN al ARN y de éste a las proteínas. Hay una tendencia simplista que, con un enfoque convencional de esta disciplina, asume que sólo estas moléculas explican la estructura de las células, de los tejidos, de los órganos, de los sistemas fisiológicos e incluso, de los organismos intactos. Sin embargo, la realidad revela que la estructura de la célula requiere de otros componentes moleculares como los lípidos y los carbohidratos. Estas moléculas pueden servir como componentes estructurales, como intermediarios en la producción de energía, como efectores de señalización y como marcadores de reconocimiento, entre otros. Teniendo en cuenta que los lípidos y los carbohidratos están implicados en algunas de las principales modificaciones post-traduccionales de las proteínas, ambos ayudan a explicar cómo el relativamente pequeño número de genes que constituye un genoma puede generar la enorme variabilidad y complejidad biológica inherente al desarrollo, crecimiento y funcionamiento de los organismos (Varki *et al.*, 2009).

Las funciones biológicas de los carbohidratos son especialmente importantes en la formación de órganos y organismos multicelulares complejos, ya que para ello se requiere de la interacción y comunicación entre las células y la matriz circundante. Todas las células generan numerosas macromoléculas que portan una colección de azúcares (monosacáridos) o cadenas de azúcares (oligosacáridos) covalentemente unidos a otras especies moleculares (glicoconjugados) y a cuya fracción glucídica nos referimos como glicanos. Debido a que muchos glicanos se encuentran en la superficie externa tanto de las células como de las macromoléculas que secretan, están en disposición de modular o mediar una gran variedad de eventos relacionados con las interacciones célula-célula, célula-matriz y célula-molécula, procesos críticos y fundamentales en el desarrollo y funcionamiento de los organismos multicelulares complejos. Además, los glicanos también pueden actuar como mediadores en las interacciones entre distintos organismos, como ocurre en las relaciones simbióticas o parasitarias.

Todo esto obliga a establecer que un paradigma más completo de la Biología Molecular debe de incluir a los glicanos, a menudo en combinación covalente con otras macromoléculas (glicolípidos y glicoproteínas), como elementos fundamentales en el estudio molecular de los sistemas biológicos.

El Código Genético es esencialmente el mismo en todos los organismos vivos conocidos, y varias funciones básicas tales como la transcripción de genes y la formación de energía tienden a estar conservadas a través de los diversos taxones. Aunque los glicanos se encuentran también en todos los organismos, existe una considerable diversidad de su estructura y expresión en la naturaleza tanto dentro como entre los distintos linajes evolutivos. Debido, en parte, a las dificultades inherentes al estudio de sus estructuras, se conoce relativamente poco sobre los detalles de la diversidad de los glicanos. No obstante, existe suficiente información para saber que no existe un “Código de la Estructura del Glicano” universal similar al Código Genético. En realidad, desde el punto de vista estructural, los glicanos expresados por la mayoría de los organismos procariotas tienen relativamente poco en común con aquellos producidos por organismos eucariotas.

A pesar del enorme potencial de variación estructural contenido en los monosacáridos, en las células eucariotas se ha hallado un limitado repertorio tanto de

monosacáridos como de las uniones y modificaciones que aparecen en las estructuras glicoconjugadas. Esto ha permitido una extensa elucidación de la estructura de los glicanos expresados en los eucariotas. Sin embargo, las bacterias y las arqueas han tenido varios miles de millones de años más para experimentar con las variaciones de los glicanos. Si a esto le sumamos que estos organismos tienen cortos tiempos de generación y que son capaces de intercambiar material genético a través de vastas distancias filogenéticas, no nos sorprende que Bacteria y Archaea expresen una diversidad en la glicosilación muy superior a la de organismos eucariotas, atendiendo tanto a los monosacáridos que utilizan o sintetizan como a sus diferentes tipos de uniones y modificaciones.

Una parte de la gran diversidad que exhiben los glicanos bacterianos deriva de las distintas estructuras arquitectónicas de la envoltura celular de estos organismos (Herget *et al.*, 2008). En cierta medida, esta gran diversidad puede verse justificada mediante un conjunto de cálculos atribuidos al difunto John Clamp de la Universidad de Bristol, en los que se demuestra que un oligosacárido compuesto de tres residuos glucosídicos diferentes tiene 176 veces más potencial de variación estructural que su equivalente aminoacídico (tripéptido), indicando que la flexibilidad isomérica de los heteropolisacáridos confiere una enorme variabilidad a las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular (King *et al.*, 2007).

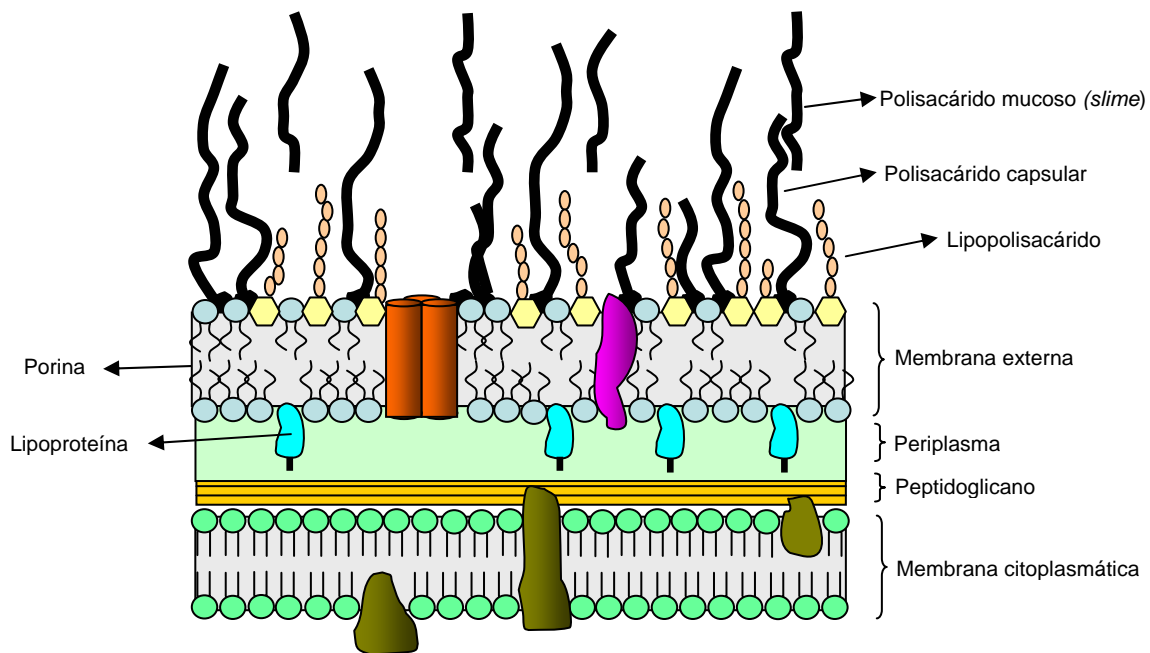
Uno de los componentes que proporciona a la bacteria parte de la enorme diversidad de su superficie celular es la cápsula bacteriana. Varias cuestiones permanecen sin resolver en torno a esta entidad morfológica: ¿por qué existen tantas estructuras capsulares diferentes? ¿cuáles han sido las fuerzas motrices para la generación y mantenimiento de estas cápsulas? Posiblemente, estas preguntas obtengan su respuesta cuando se averigüe el papel preciso que juegan las diferentes cápsulas bacterianas en relación con el estilo de vida de los organismos que las producen. Es más, estas cuestiones requieren un entendimiento no solo de las cápsulas bacterianas y de la regulación de su expresión, sino también de las interacciones que se establecen entre todos los componentes de la superficie celular (Whitfield y Roberts, 1999).

## **1.2 Estructura de la superficie celular de las bacterias Gram-negativas**

La envoltura celular bacteriana está constituida por un conjunto de estructuras que presentan características concretas y desempeñan las funciones específicas de cada una de ellas.

La membrana citoplasmática de las bacterias es una estructura laminar compuesta por lípidos, glúcidos y proteínas que se encuentra rodeada por la pared bacteriana, una estructura rígida cuya composición química fundamental es una molécula exclusiva del mundo bacteriano conocida como peptidoglicano (Archibald, 1989). La pared es una estructura vital para las bacterias que la poseen, ya que si se destruye o se impide su formación, la célula pierde su viabilidad. Además, posee una gran variedad de antígenos superficiales exclusivos de ella que están implicados en las interacciones del microorganismo con los mecanismos de defensa del hospedador, lo que le confiere una enorme importancia en bacteriología clínica (Hancoch, 1991).

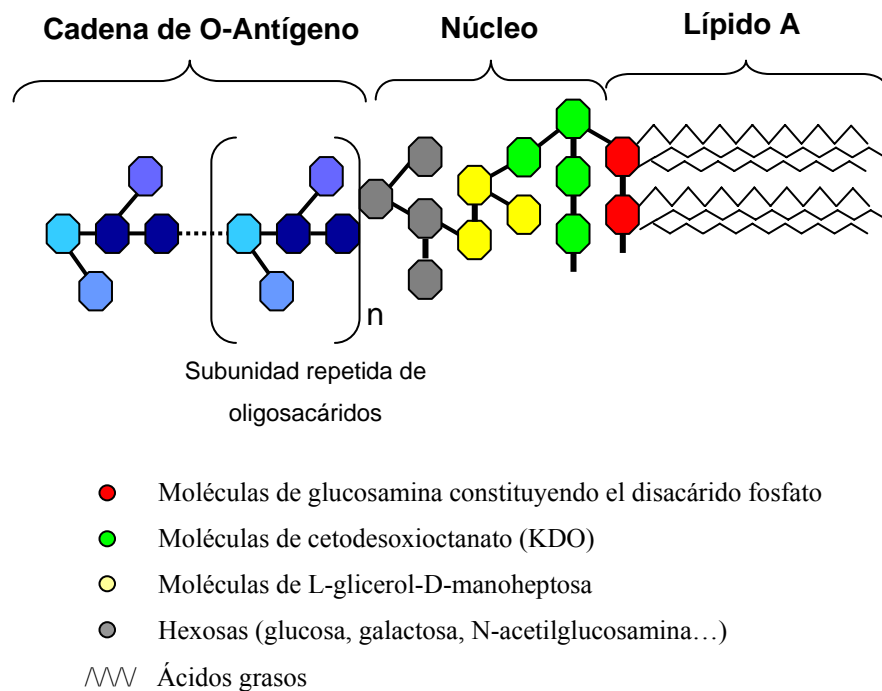
En las bacterias Gram-negativas (Figura 1.1), el peptidoglicano forma una malla fina alrededor de la membrana citoplasmática de la bacteria. Hacia el exterior se encuentra la membrana externa la cual está estrechamente unida al peptidoglicano a través de lipoproteínas, por lo que se considera un componente más de la pared bacteriana (Archibald, 1989). La membrana externa tiene una estructura clásica en forma de doble capa fosfolipídica y contiene gran cantidad de proteínas (algunas de las cuales regulan la permeabilidad, como las porinas), fosfolípidos y una molécula única denominada lipopolisacárido (LPS) (Whitfield y Valvano, 1993). Entre la membrana externa y la citoplasmática se encuentra el denominado espacio periplásmico que frecuentemente se encuentra relleno de un “gel” periplásmico denso, y que también contiene gran variedad de proteínas y enzimas, algunas de ellas implicadas en los mecanismos de importación y exportación de macromoléculas (Whitfield y Valvano, 1993).



**Figura 1.1** Estructura de la pared celular de bacterias Gram-negativas. Figura modificada de Whitfield y Valdano (1993).

El LPS es una molécula exclusiva de la cara externa de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y es responsable de muchas de las propiedades de estas bacterias. Esta molécula forma una capa lipídica que, además de fosfolípidos, contiene polisacáridos y proteínas que confieren un ambiente hidrofílico a la superficie bacteriana. El LPS es un glicolípido complejo compuesto de tres partes: el lípido A, el oligosacárido nuclear y la cadena lateral específica (unidad repetida) (Figura 1.2). El lípido A es la porción más proximal del LPS y es prácticamente idéntica en todas las bacterias. Está compuesto de un disacárido difosfato formado por dos unidades de glucosamina unidas por un enlace  $\beta(1-6)$  y tiene todos sus grupos hidroxilo, excepto uno, y amino sustituidos por ácidos grasos. El lípido A es el responsable de que al LPS se le denomine también endotoxina. Sin embargo, debido a que está inmerso en el centro de la membrana, el lípido A sólo ejerce sus efectos tóxicos cuando la célula está lisada. Además, de todas las regiones del LPS, ésta es la única indispensable para la viabilidad de la bacteria (Raetz, 1990).

El oligosacárido medular, también llamado *core* o núcleo, se une al lípido A mediante un enlace en el que está implicado el grupo hidroxilo libre en posición 3' del disacárido difosfato. Esta región consta de dos fracciones: un núcleo interno, formado



**Figura 1.2** Estructura general del lipopolisacárido en bacterias Gram-negativas (tomada de “Brock Biology of Microorganisms”, 8 Ed., Madigan, Martinko y Parker, 1998).

por dos azúcares exclusivos de bacterias Gram-negativas que son el 2-ceto-3-desoxioctanato (KDO) y el L-glicerol-D-manoheptosa, y un núcleo externo, constituido a base de hexosas (principalmente glucosa, galactosa y GlcNAc) (Raetz, 1990).

Por último, la cadena lateral específica (antígeno O) es un polisacárido repetitivo que se proyecta hacia el exterior celular. El polisacárido O está unido al núcleo y consta generalmente de galactosa, glucosa, ramnosa y manosa, así como uno o más dideoxiazúcares poco frecuentes como abecuesa, colitosa, paratosa o tivelosa. Todos estos azúcares están unidos entre sí formando secuencias de tres, cuatro o cinco unidades y a menudo se encuentran ramificados originando una gran variedad de antígenos O (Rick, 1987).

Adicionalmente, muchas bacterias tienen la capacidad de producir una capa extracelular que envuelve la superficie bacteriana y permite la interacción de los microorganismos con el medio. A excepción de las bacterias que poseen capa-S (compuesta por proteínas y glicoproteínas), en general, la superficie celular de muchas bacterias está principalmente compuesta por polisacáridos (Beveridge y Graham, 1991; Whitfield y Valvano, 1993).

### 1.3 Polisacáridos de la superficie bacteriana

Muchas bacterias pertenecientes a diversos nichos ecológicos se encuentran rodeadas por una capa de polisacárido extracelular conocido como exopolisacárido o EPS (*Extracellular Polymeric Substance*) (Whitfield y Valvano, 1993). Aunque los exopolisacáridos no son esenciales para la supervivencia de la bacteria, la mayoría de patógenos invasivos los producen tanto en medios terrestres como acuáticos (Beveridge y Graham, 1991; Whitfield y Valvano, 1993).

Estudios previos han demostrado que la capa que forman los exopolisacáridos alrededor de las bacterias constituye una barrera física de protección, haciéndolas más resistentes a la fagocitosis, al ataque de anticuerpos (Schwarzmann y Boring, 1971; Glynn, 1972) y de bacteriófagos y a la presencia de toxinas hidrofóbicas, entre otros (Weiner *et al.*, 1995). Las bacterias sintetizan los exopolisacáridos en respuesta a situaciones de estrés medioambiental, como por ejemplo, necesidad de captar iones esenciales del medio (Harder y Dijkhuizen, 1983; Wilkinson, 1958). Los exopolisacáridos bacterianos también influyen en el reconocimiento célula-célula y sus interacciones, y resultan ser ventajosos en la unión de las bacterias a determinados sustratos (Weiner *et al.*, 1995).

Los exopolisacáridos sintetizados por células microbianas varían mucho en su composición, y por lo tanto, en sus propiedades físicas y químicas. Aunque algunos de ellos son macromoléculas neutras, la mayoría de los exopolisacáridos son polianiónicos debido a la presencia de ácidos urónicos (siendo ácido D-glucurónico el más común, aunque también han sido encontrados el ácido D-galacturónico y el D-manurónico) o cetopiruvatos. Residuos inorgánicos, como grupos fosfato o, raramente, sulfato, podrían también conferir un estado polianiónico (Sutherland, 1990). Muy pocos exopolisacáridos son policatiónicos, entre los que se encuentra el polímero adhesivo obtenido de cepas de *Staphylococcus epidermidis* asociadas con la formación de biopelículas (biofilms) (Mack *et al.*, 1996).

La composición y secuencia de un polisacárido determina su configuración primaria y, frecuentemente, la conformación secundaria ordenada toma la forma de hélices agregadas. En algunos de estos polímeros, la composición de un eje central con uniones de tipo  $\beta(1-3)$  o  $\beta(1-4)$  puede conferir una considerable rigidez, como se ha

visto en la goma xantana de *Xanthomonas campestris*. Otras uniones en los polisacáridos pueden originar estructuras más flexibles, como por ejemplo las uniones  $\alpha(1-2)$  o  $\alpha(1-6)$  encontradas en muchos dextranos. Cuando los polisacáridos están en solución, la transición desde rollos desordenados hasta ordenados agregados helicoidales se encuentra, a menudo, influenciada en gran medida por la presencia o ausencia de sustituyentes acilo, como ésteres O-acetilo u O-succinilo, o cetopiruvatos (Sutherland, 1997).

Los polisacáridos son, esencialmente, cadenas delgadas y largas con una masa molecular del orden de entre  $0,5 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  Da, aunque pueden asociarse de múltiples maneras. En varias preparaciones realizadas por Mayer *et al.* (1999), los exopolisacáridos fueron visualizados como finas hebras ancladas a la superficie celular bacteriana y formando una compleja red alrededor de la célula, sugiriendo que las uniones electrostáticas y puentes de hidrógeno son las fuerzas dominantes implicadas. Sin embargo, podrían estar presentes otro tipo de enlaces tales como las interacciones iónicas, aunque en este caso, la formación de un complejo cadena-cadena en el que una macromolécula encaja dentro de otra podría dar lugar a la formación de un flóculo o de redes poco solubles en solventes acuosos. Otra disposición puede ser la formación de geles fuertes o débiles asociados con la presencia de biofilms (Sutherland, 2001).

Los exopolisacáridos bacterianos tienen aplicaciones en un amplio rango de campos. Así, entre sus aplicaciones clínicas destacamos las actividades antitumorales, antivirales e inmunoestimulantes de algunos exopolisacáridos (Okutani, 1992). Otros sirven como agentes gelificantes (Lin y Casida, 1984), emulsionantes (Rosenberg *et al.*, 1979), moléculas que permiten la eliminación de metales pesados del medio ambiente (Kong *et al.*, 1998) e incluso una recuperación del petróleo más efectiva (Wells, 1977; Calvo, 1995). Por otra parte, los exopolisacáridos bacterianos sirven como fuente de monosacáridos (Vanhooren y Vandamme, 2000; Kumar *et al.*, 2007).

En la naturaleza, los exopolisacáridos se organizan en la superficie celular bacteriana de diferentes maneras. Así, podemos encontrarlos como un conjunto de polisacáridos viscosos que rodean a la bacteria pero con poca o ninguna asociación con la superficie celular y que se denominan polisacáridos mucosos o *slime polysaccharides* (Figura 1.1). Estos exopolisacáridos son liberados directamente al exterior sin ninguna molécula terminal que les sirva de anclaje a la superficie. Sin embargo, en la mayoría de



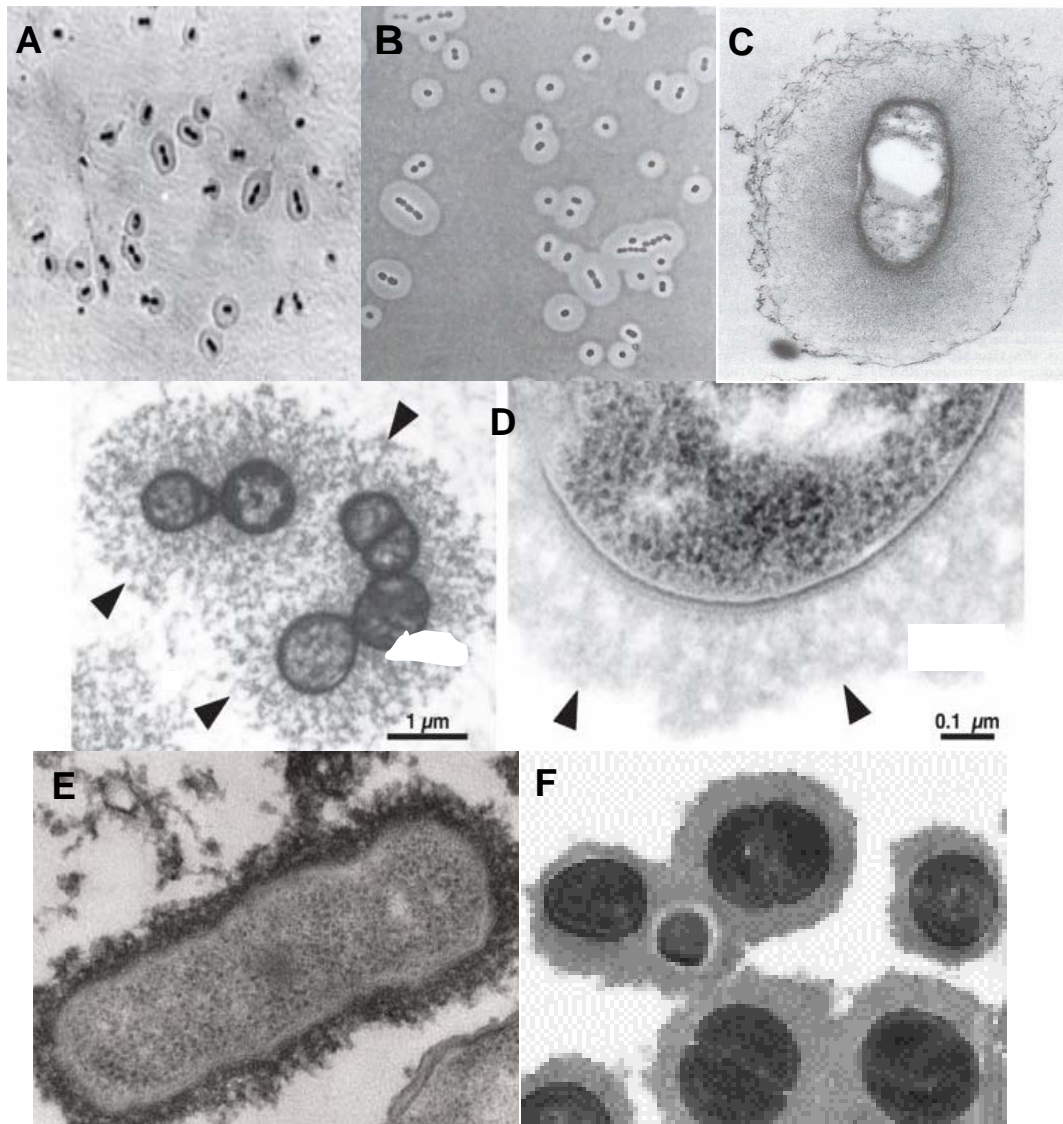
los casos la definición de *slime* (moco o baba) es operativa, ya que normalmente se basa en la retención del EPS en la superficie celular durante la centrifugación. Así, la liberación del polímero sería evidentemente mayor en las células que producen abundante EPS con lo que la mayoría de bacterias fuertemente encapsuladas serían consideradas como productoras de *slime* (Whitfield y Valvano, 1993).

Por otra parte, las características físicas de un polímero en particular pueden determinar el grado de asociación a la superficie celular. Sorprendentemente, algunos exopolisacáridos son retenidos en la superficie, a pesar de la ausencia de una estructura de anclaje identificable. Por ejemplo, estudios del EPS de *Aerobacter aerogenes* DD45 fracasaron a la hora de identificar un anclaje no polisacárido; sin embargo, el 80% del polisacárido fue asociado con la superficie celular y sedimentó con las células durante la centrifugación. En este caso, queda por establecer si las interacciones iónicas o de otros tipos son suficientes para mantener la asociación a la célula (Troy *et al*, 1971; Whitfield y Valvano, 1993).

Además del “polisacárido mucoso” liberado por las bacterias con poca o ninguna asociación a la superficie celular, los exopolisacáridos pueden estar fuertemente asociados a la superficie celular bacteriana, y en este caso, constituyen una entidad morfológica conocida como cápsula, CPS (*Capsular Polymeric Substance*) o antígeno K (Whitfield y Valvano, 1993). Se ha descrito que la manera en la que los exopolisacáridos capsulares se asocian con la superficie celular es a través de una molécula hidrofóbica que les sirve de anclaje, ya sea un lípido o un fosfolípido (Jann y Jann, 1990).

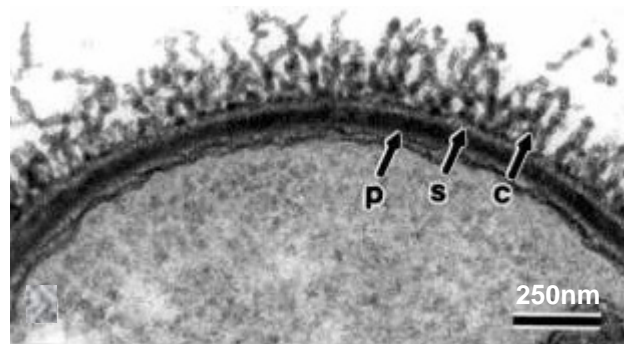
### **1.3.1 La cápsula bacteriana**

La cápsula bacteriana es una envoltura externa ubicada por fuera de la pared celular, consistente en la acumulación de material mucoso o viscoso formando un gel que se adhiere a la bacteria (Beveridge, 1988) y que le permite interactuar con el medio ambiente (Figura 1.3). Se trata de una estructura superficial que presentan las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas en sus ambientes naturales.



**Figura 1.3** Estructuras capsulares en diferentes especies bacterianas. (A) Observación de la cápsula de *Streptococcus pneumoniae* mediante tinta china y microscopía óptica. (B) Detección de la cápsula de una especie de *Acinetobacter* mediante tinción negativa con tinta china y microscopía de contraste de fases. (C) Microfotografía electrónica de una sección fina de una célula de *Rhizobium trifolii* (el diámetro de la célula es de aproximadamente  $0,7\mu\text{m}$ ). (D) Observación de una sección de células de *Streptococcus zooepidemicus* observadas a  $1$  (izquierda) y  $0,1\mu\text{m}$  (derecha). (E) Observación de una sección ultrafina de una célula de *Haemophilus influenzae* ser. b mediante contraste con acetato de uranilo 2% y microscopio electrónico de transmisión (imagen ampliada 67.000 veces). (F) Microfotografías con el microscopio electrónico de transmisión de células de *Staphylococcus aureus* previamente estabilizadas con anticuerpos específicos. (A) Figura tomada de Beveridge (1988) (B) y (C) Figuras tomadas de “Brock Biology of Microorganism 8 Ed. (Madigan, Martinko y Parker, 1998). (D) y (E) Microfotografías tomadas de “Essentials of Glycobiology”, 2ª Edición (Varki, Cummings, Esko, Freeze, Stanley, Bertozzi, Hart y Etzler, 2009). (F) Figura tomada de O’Riordan y Lee (2004).

La gran mayoría de las cápsulas son de naturaleza polisacáridicas y pueden estar formadas por: (i) heteropolisacáridos aniónicos, cuyas unidades repetidas constan de azúcares, aminoazúcares y ácido urónicos, (ii) homopolisacáridos ácidos como los ácidos polisiálicos (Barry, 1959) o neutros como los levanos, los dextranos y la celulosa (iii) o alginatos (alternan distintos tipos de ácidos urónicos) (Boulnois y Jann, 1989). No obstante, las cápsulas también pueden ser polipeptídicas (solo encontradas en el género *Bacillus*) (Beveridge y Graham, 1991). En este caso siempre poseen un resto de ácido glutámico en el extremo de la cadena polipeptídica (glutamil-polipeptidos) o incluso, como en *B. anthracis*, el péptido está formado solamente por restos de ácido D-glutámico (Figura 1.4) (Mesnage *et al.*, 1998).



**Figura 1.4** Observación de la superficie celular de *Bacillus anthracis* mediante microscopia electrónica. En la imagen se observa el peptidoglicano de la pared celular (P), la capa-S de naturaleza proteica (S) y la cápsula compuesta por moléculas de ácido-D-glutámico (C). Tomado de Mesnage *et al.* (1998).

La cápsula bacteriana es una estructura inerte e, inicialmente, carente de papel metabólico activo, pero que confiere a la bacteria importantes propiedades que dependen del nicho ecológico particular de la misma. Parece evidente que la expresión de una cápsula confiere una ventaja selectiva al hospedador en una gran variedad de medios naturales (Beveridge, 1988; Corbett y Roberts, 2008).

Además de algunas de las funciones anteriormente descritas para los polisacáridos de superficie en general, la cápsula bacteriana facilita la difusión de nutrientes hacia la célula mediando en el intercambio de agua, iones y sustancias nutritivas, sirve como almacén de recursos externos y protege a la célula de determinados factores medioambientales como la desecación, la predación por parte de protozoos y del ataque de agentes antibacterianos como detergentes (Beveridge, 1988).

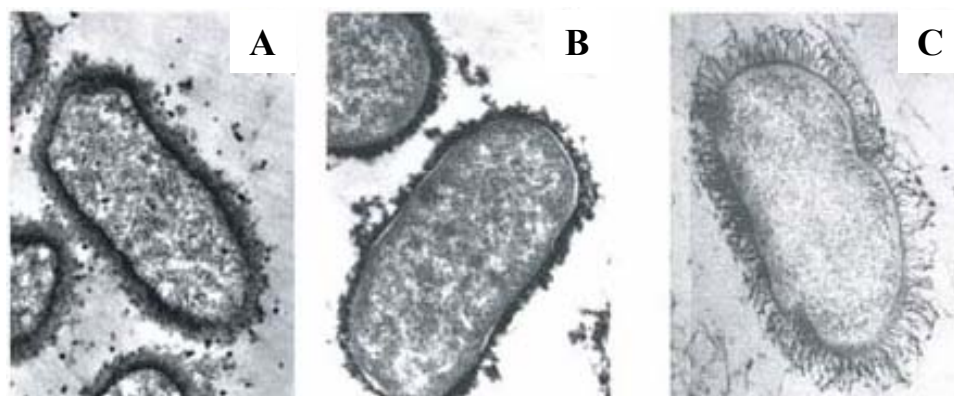
Por otra parte, la cápsula ofrece resistencia frente al sistema de defensa innato del hospedador, esencial en el caso de patógenos invasivos, frente a la respuesta inmune adaptativa, y facilita la supervivencia intracelular de la bacteria (Corbett y Roberts, 2008). Es conocido, desde hace tiempo, que la expresión de determinadas cápsulas polisacáridicas confieren a la bacteria resistencia frente a la muerte causada por el sistema del complemento (Roberts, 1996). Este es el caso de las cápsulas que contienen ácidos siálicos: la unión del factor H (proteína de la ruta alternativa del complemento) a la superficie polisialilada de la bacteria inhibe la activación de la cascada del complemento y como consecuencia la posible respuesta inmune (Janeway *et al.*, 2003). Sin embargo, el fundamento de la resistencia al sistema inmune no siempre está clara y en otros tipos de cápsulas este efecto pudiera ser debido a efectos estéricos y al enmascaramiento de la superficie celular (Corbett y Roberts, 2008). Lo que parece evidente es que en la resistencia mediada por el complemento están probablemente implicadas un número de estructuras celulares superficiales que contribuyen al efecto global (Burns y Hull, 1998 y 1999).

Además, la capacidad de las cápsulas bacterianas para conferir resistencia a la fagocitosis por las células polimorfonucleares (PMNL) ha sido atribuida a la repulsión entre las cargas negativas de las cápsulas polisacáridicas y las superficies celulares de las PMNL (Roberts, 1996). Sin embargo, es probable que la pobre opsonización por el sistema del complemento de las bacterias encapsuladas tenga que ver en esta protección (Corbett y Roberts, 2008).

### **1.3.2 Exopolisacáridos capsulares en *E. coli***

Entre los microorganismos capaces de producir cápsulas polisacáridicas se encuentra *E. coli*. Esta bacteria es un bacilo Gram-negativo anaerobio facultativo que forma parte de la flora del intestino grueso en los seres humanos aunque también podemos encontrarlo en superficies tanto terrestres como acuáticas del medio ambiente, normalmente como resultado de una contaminación fecal. Sin embargo, como patógeno oportunista, esta bacteria es capaz de causar un amplio rango de enfermedades en humanos, incluyendo infecciones del tracto gastrointestinal y urinario, meningitis, y septicemia.

Las cápsulas de *E. coli* (Figura 1.5) están formadas por polisacáridos de alto peso molecular y se encuentran firmemente ancladas a la superficie celular. Una característica que tienen en común las cepas de *E. coli* causantes de las anteriores patologías es la expresión de un polisacárido capsular. De esta manera, la expresión de determinados antígenos K está estrechamente asociada con infecciones concretas. Por ejemplo, el antígeno K1, formado por ácido polisiálico, es el tipo de cápsula más común encontrada en cepas de *E. coli* que causan infecciones del tracto urinario y meningitis neonatal (Corbett y Roberts, 2008). Por otro lado, el antígeno K5 está vinculado con infecciones del tracto urinario y sepsis, pero no con meningitis (Kaijser y Jodal, 1984). En ambos casos, estas cápsulas se encuentran más frecuentemente asociadas con un proceso de infección que con la flora normal intestinal de individuos sanos (Corbett y Roberts, 2008).



**Figura 1.5** Fotografías tomadas con el microscopio electrónico de diferentes cepas encapsuladas de *E. coli*: (A) antígeno K1 previamente estabilizado con anticuerpos específicos (Whitfield *et al.*, 1984). (B) Antígeno K30 marcado con ferritina catiónica con afinidad por los polianiones (Reid y Whitfield, 2005) o (C) después de sustitución por congelación (Graham *et al.*, 1991). Imágenes tomadas de Whitfield, 2006.

La remarcada versatilidad ambiental con la que siempre se ha relacionado a *E. coli* se ve reflejada en la gran variación que existe en los polisacáridos de la superficie celular de las diferentes cepas (Whitfield *et al.*, 1994). Así, el serotipado en *E. coli* se establece solamente en base a los polisacáridos de su superficie que poseen capacidad antigénica, entre los que se incluyen los antígenos O del LPS y los antígenos K capsulares. Sin embargo, existen otros polímeros que no son específicos de serotipo. Por ejemplo, la mayoría (sino todas) de las cepas de *E. coli* producen un polisacárido conocido como antígeno común enterobacteriano o ECA (“Enterobacterial Common

Antigen”) (Rick *et al.*, 1998; Corbett y Roberts, 2008), y muchas, bajo determinadas condiciones de crecimiento, producen un exopolisacárido llamado ácido colánico (CA) o antígeno M (Orskov *et al.*, 1977; Corbett y Roberts, 2008). Además, se han identificado dos exopolisacáridos adicionales en *E. coli* implicados en la agregación celular y en la formación de biofilms sobre sustratos inertes: la celulosa bacteriana (glucano de tipo  $\beta$ -(1-4)) (Zogaj *et al.*, 2001) y el polímero de (1-6)- $\beta$ -N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Itoh *et al.*, 2005).

Todos los sistemas de ensamblaje de las cápsulas conocidos hasta el momento y observados en bacterias Gram-negativas están representados en *E. coli*, así como la mayoría de las estrategias de regulación estudiadas. Por lo tanto, *E. coli* proporciona una gran variedad de modelos de trabajo sobre los cuales se basan (o pueden hacerlo) muchos estudios realizados en otras bacterias (Whitfield y Roberts, 1999).

### 1.3.2.1 Clasificación de las cápsulas en *E. coli*

Los diferentes serotipos K y O que aparecen en *E. coli* resultan de la variación en la composición de azúcares de superficie (pentosas, hexosas, heptosas, aminoazúcares, azúcares metilados y ácidos urónicos) y de las uniones específicas entre ellos, además de la presencia de otras sustituciones de residuos distintos de carbohidratos tales como fosfatos, aminoácidos, glicerol y ribitol. Hasta el momento, en *E. coli* se han descrito 167 serogrupos O diferentes y más de 80 antígenos K de los cuales ya han sido determinadas muchas de sus estructuras primarias (Orskov *et al.*, 1977; Whitfield y Roberts, 1999), aunque cabe la posibilidad de que nuevos descubrimientos posibiliten la aparición de elementos que modifiquen la clasificación actual de las cápsulas de *E. coli*.

Atendiendo al antígeno K, los más de 80 serogrupos descritos en *E. coli* fueron inicialmente separados en tres grupos diferentes teniendo en cuenta su relativa termoestabilidad (Orskov *et al.*, 1977; Jann y Jann, 1997). Más recientemente, se ideó una nueva clasificación utilizando criterios de variedad bioquímica y genética, aunque manteniendo las características serológicas como componente primario (Jann y Jann, 1997). En la actualidad, este esquema ha requerido algunas modificaciones debido a una nueva caracterización genética y bioquímica de los antígenos K. De este modo, se ha propuesto un sistema de clasificación (Tabla I) en el que se diferencian cuatro grupos de

cápsulas polisacáridicas en *E. coli* y que está basado exclusivamente en criterios biosintéticos y genéticos, eliminando la dependencia de denominaciones serológicas y el uso de estructuras polisacáridicas como elemento predictivo. Uno de los puntos clave es que, mientras todos los antígenos polisacáridicos K forman una estructura capsular, lo inverso no siempre es verdad, es decir, no todas las cápsulas están compuestas de antígenos K. Algunas cápsulas en *E. coli* son debidas a la producción de una capa extensa compuesta por un polímero estructuralmente idéntico al antígeno O del LPS, pero que se distingue de éste por la ausencia de un componente terminal lipídico (Whitfield y Roberts, 1999).

**Tabla I** Clasificación de las cápsulas en *E. coli*. Tomada de Whitfield y Roberts, 1999.

Características	GRUPO			
	1	2	3	4
Antiguo grupo del antígeno K	IA	II	I/II o III	IB(cápsulas de antígeno-O)
Termoestabilidad del antígeno K	Si	No	No	Si
Coexpresado con serogrupos O	Rango limitado (O8, O9, O20, O101)	Muchos	Muchos	O8 y O9
Coexpresado con ácido colánico	No	Si	Si	Si
Locus genético	<i>cps</i>	<i>kps</i>	<i>kps</i>	<i>rfb</i>
Expresión termorregulada	No	Si	No	No
Altos niveles de CMP-Kdo sintetasa	No	Si	No	No
Motivo lipídico terminal	LPS Lípido A-core en K <sub>LPS</sub> . Desconocido para antígeno K capsular	$\alpha$ -glicerofosfato	$\alpha$ -glicerofosfato?	LPS Lípido A-core en K <sub>LPS</sub> . Desconocido para antígeno K capsular
Crecimiento de cadena del polímero	En extremo reductor	En extremo no reductor	En extremo no reductor?	En extremo reductor
Sistema de polimerización	Wzy-dependiente	Actividad glicosiltransferasa	Actividad glicosiltransferasa?	Wzy-dependiente
Transportador ABC	No	KpsMT	KpsMT?	No
Sistema(s) modelo en <i>E. coli</i>	Serotipo K30	Serotipos K1, K5	Serotipos K10, K54	Serotipos K40, O111
Cápsulas similares en	<i>Klebsiella</i> , <i>Erwinia</i>	<i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i>	<i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i>	Ninguno conocido





de la existencia de rutas comunes biosintéticas y de exportación, así como de la presencia de proteínas específicas que determinan la estructura única de la unidad repetitiva de cada antígeno K. De este modo, la biosíntesis de los antígenos capsulares del grupo 4 se produce de la misma manera que las del grupo 1 pero con una pequeña diferencia, y es que la enzima encargada de transferir el primer azúcar a la unidad repetitiva de los polisacáridos capsulares del grupo 4 es la glicosiltransferasa Wca, que transfiere GlcNAc o GalNAc, mientras que en las cápsulas del grupo 1 es la glicosiltransferasa WbaP la que transfiere el azúcar (Whitfield y Roberts, 1999). Por otra parte, el mecanismo por el cual las cápsulas del grupo 4 son transportadas hacia el exterior celular es llevado a cabo por proteínas homólogas a las que realizan la misma función en las cápsulas del grupo 1, como Wza, Wzb (Etp) y Wzc (Etk) (Peleg, 2005).

Los antígenos K de las cápsulas del grupo 1 y 4 se expresan de dos formas diferentes en la superficie celular bacteriana. En la primera, el anclaje a la membrana lo constituye el lípido A del LPS de manera que a este antígeno K se le denomina  $K_{LPS}$  para diferenciarlo de las moléculas de LPS que portan el antígeno O en el mismo organismo. En las cápsulas del grupo 4,  $K_{LPS}$  contiene largas cadenas de antígeno K, mientras que el  $K_{LPS}$  del grupo 1 está restringido a cortas cadenas de oligosacáridos que contienen una o pocas unidades repetitivas de antígeno K. La longitud de cadena de la molécula  $K_{LPS}$  en las cápsulas del grupo 4 se encuentra bajo el control de la proteína Wzz y su ausencia justifica las cortas cadenas de oligosacáridos encontradas en las cápsulas del grupo 1 (Corbett y Roberts, 2008). Este tipo de anclaje también es característico del antígeno O del LPS y de determinados ECA ( $ECA_{LPS}$ ).

Aunque para el resto de antígenos K de los grupos 1 y 4 las uniones precisas entre el antígeno y la superficie celular no han sido bien establecidas, se sabe que el LPS no está implicado en el anclaje. En este segundo caso, la cápsula es más evidente ya que se compone de un auténtico antígeno K capsular de alto peso molecular, y las interacciones entre las cadenas del polisacárido sobre la superficie celular crean una estructura muy ordenada (Whitfield, 2006). Además, no parece existir una relación precursor-producto entre el  $K_{LPS}$  y el auténtico antígeno K capsular de alto peso molecular, con lo que todo parece indicar que el ensamblaje de este tipo de cápsulas de los grupos 1 y 4 requiere un sistema diferente de translocación que no es utilizado por  $K_{LPS}$ .

Dada la similitud estructural entre el  $K_{LPS}$  de las cápsulas del grupo 4 y el antígeno O del LPS, no es sorprendente que la serología sea a menudo confusa. Algunas cepas producen una cápsula del grupo 4 como el único polisacárido específico de serotipo, con lo que a estas cápsulas se les da el rango de antígeno O (por ejemplo: O26, O55, O100, O113 y O127). En cambio, otras cápsulas del grupo 4 tienen rango de antígeno K (por ejemplo K40) ya que se encuentran en cepas que se coexpresan con un antígeno neutral adicional (Whitfield, 2006).

A pesar de la semejanza estructural que existe entre las cápsulas del grupo 1 y 4, existen diferencias claras en cuanto a la organización de los loci genéticos y la distribución de genes críticos en distintas regiones cromosómicas. Estas diferencias justifican que los sistemas de biosíntesis de las cápsulas de grupos 1 y 4 sean diferentes (Whitfield, 2006).

Diferentes estudios han revelado la existencia de un tipo especial de cápsulas, ampliamente distribuidas entre las enterobacterias (Sledjeski y Gottesman, 1996) y conocidas como ácido colánico (CA). En un principio, este tipo capsular se incluyó dentro del grupo 1 en las cápsulas de *E. coli* (Keenleyside *et al.*, 1992). Sin embargo, estudios moleculares han revelado una distribución genética diferente (Whitfield y Roberts, 1999) por lo que hoy en día, el CA se estudia como un tipo capsular independiente y se le denomina específicamente por su nombre: ácido colánico.

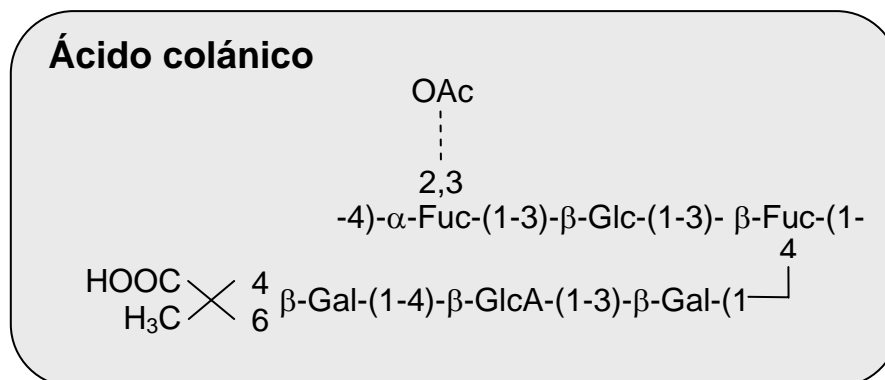
No obstante, las cápsulas de CA y las pertenecientes al grupo 1 comparten semejanzas significativas. En primer lugar, los loci responsables de la biosíntesis del CA (*cps<sub>ca</sub>* o *wca*) y de las cápsulas del grupo 1 (*cps*) ocupan la misma localización general, aunque con sutiles diferencias en el orden de los genes como consecuencia de pasados eventos de recombinación. Además, el hecho de que el locus de cápsulas del grupo 1 también se encuentre conservado en cuanto a localización y organización en *Klebsiella pneumoniae*, evidencia una antigua transferencia lateral de genes entre *E. coli* y *K. pneumoniae* (Whitfield y Paiment, 2003). Este evento ha originado que las cepas que presentan cápsulas del grupo 1 carezcan de los genes necesarios para la biosíntesis del CA, y por lo tanto, sean incapaces de producirlo. Es importante señalar que, por el contrario, el CA puede ser sintetizado por cepas capaces de sintetizar cápsulas de los grupos 2, 3 y 4 (Whitfield y Roberts, 1999).

Por otra parte, la estructura polisacáridica de las cápsulas del grupo 1 (Figura 1.6) recuerda a la del CA (Figura 1.7) y sus procesos de biosíntesis y ensamblaje son esencialmente idénticos (Whitfield, 2006). En adelante, para explicar los procesos de biosíntesis y exportación de las cápsulas de CA tomaremos como modelo los procesos mejor estudiados acontecidos en bacterias con cápsulas del grupo 1.

Como hemos visto, existen muchas semejanzas entre el CA y las cápsulas del grupo 1, sin embargo, hay una serie de diferencias tanto a nivel genético como bioquímico entre ambos tipos de cápsulas que justifican que las cápsulas de ácido colánico no sean englobadas dentro del grupo 1 (Whitfield y Roberts, 1999; Whitfield, 2006). Básicamente, existen dos diferencias importantes a nivel genético que hay que señalar. En primer lugar, *wzi* es el primer gen del locus de cápsulas del grupo 1 pero no se encuentra en el del CA. Este gen codifica para una proteína de la membrana externa implicada en el ensamblaje de las cápsulas del grupo 1 en la superficie celular (Rahn *et al.*, 2003). En segundo lugar, a diferencia de las cápsulas del grupo 1, el *clúster* de CA se encuentra transcripcionalmente regulado por el sistema Rcs (Regulation of Capsule Synthesis). En base a este sistema de regulación, las cápsulas de ácido colánico no son sintetizadas normalmente a 37°C, sino que su síntesis se ve activada a bajas temperaturas (o bajo condiciones de estrés). Sin embargo, las cápsulas del grupo 1 son sintetizadas a 37°C y el sistema Rcs solo tiene efectos indirectos sobre su regulación (Whitfield y Paiment, 2003; Whitfield, 2006).

### **1.3.2.3 Cápsulas de ácido colánico. Estructura y función**

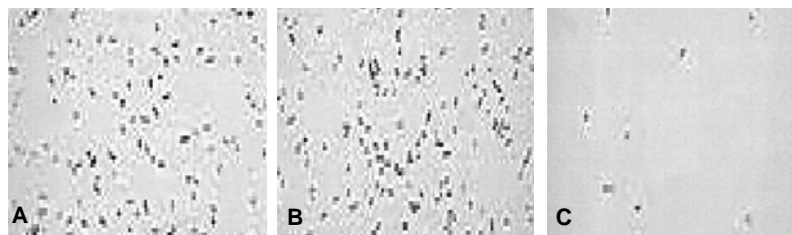
El ácido colánico o antígeno M es un exopolisacárido mucoide sintetizado por numerosas enterobacterias (Sledjeski y Gottesman, 1996). Este polímero capsular está cargado negativamente y en su estructura están presentes moléculas de glucosa (Glc), galactosa (Gal), fucosa (Fuc) y ácido glucurónico (GlcA) que constituyen aproximadamente el 90% de su peso además de un grupo O-acetil (OAc) y una molécula de piruvato (Figura 1.7) (Garegg *et al.*, 1971; Stevenson, 1996; Hanna *et al.*, 2003). Este exopolisacárido forma una densa matriz alrededor de la superficie celular bacteriana originando colonias de células que llegan a ser extremadamente mucoides en medios que contienen glucosa (Junkins y Doyle 1992; Obadia *et al.*, 2007).



**Figura 1.7** Estructura de la unidad repetida del exopolisacárido ácido colánico (unidad E). Abreviaturas: OAc, O-acetilación; Fuc, fucosa; Glc, glucosa; Gal, galactosa; GlcA, ácido glucurónico. Figura tomada de Whitfield, 2006.

Como previamente hemos indicado, la expresión de las cápsulas de ácido colánico tiene lugar bajo determinadas condiciones de crecimiento, tales como estímulos medioambientales adversos y condiciones subóptimas de crecimiento (Mao *et al.* 2001; Chen *et al.* 2004; Mao *et al.*, 2006). Así, el CA es sintetizado cuando la bacteria se encuentra en situaciones estresantes que pueden afectar negativamente a su supervivencia, como por ejemplo la desecación, un *shock* osmótico o las bajas temperaturas, así como alteraciones que afectan a la síntesis de pared celular o la membrana externa (Gottesman y Stout, 1991; Sledjeshi y Gottesman, 1995; Chen *et al.*, 2004; Lee y Chen, 2004).

El hecho de que todas estas condiciones, inicialmente adversas, favorezcan la biosíntesis de CA sugiere que su papel biológico se encuentra primariamente ligado a un estilo de vida de *E. coli* fuera del hospedador (Majdalani y Gottesman, 2005). En concordancia con esto, las cápsulas de CA no participan en los procesos patogénicos, y adicionalmente, se ha comprobado que altos niveles de expresión de CA interfirieren negativamente en la adhesión de cepas uropatógenicas de *E. coli* (Figura 1.8) (Whitfield, 2006). Así, estudios previos demuestran que el CA no potencia las primeras fases de adhesión bacteriana, sino que bloquea el establecimiento de uniones específicas así como las interacciones dependientes del tiempo entre bacterias y sustratos inertes (Hanna *et al.*, 2003).



**Figura 1.8** Fotografías de *E. coli* adheridas a vidrio tratado después de 30 minutos de incubación. El mutante deficiente en CA (A) y la cepa silvestre (B) muestran una mayor adherencia que la cepa modificada genéticamente con el fin de expresar gran cantidad de CA (C). Las bacterias comenzaron a adherirse pasados los 15 minutos. Figura tomada de Hanna *et al.* (2003).

Sin embargo, se ha demostrado que es necesaria la expresión de los genes del CA para la síntesis de los biofilms maduros de *E. coli* (Whitfield y Keenleyside, 1995; Danese *et al.*, 2000; Hanna *et al.*, 2003; Whitfield, 2006). Como consecuencia, se ha propuesto que las cepas de *E. coli* desprovistas de CA se adhieren inicialmente a las superficies inertes y luego, cuando expresan este polisacárido viscoso, forman voluminosos biofilms maduros (Hanna *et al.*, 2003; Sung *et al.*, 2006).

#### 1.3.2.4 Parentesco entre las cápsulas del grupo 2 y 3

Las cápsulas de los grupos 2 y 3 se encuentran en cepas de *E. coli* que causan infecciones extraintestinales. Su incapacidad para provocar una respuesta inmunológica protectora, limita el uso de vacunas efectivas. Las características estructurales y los componentes de las unidades repetitivas de estas cápsulas varían extensivamente (Figura 1.9). Varios grupos de polisacáridos bacterianos se parecen a los glicoconjugados de vertebrados, entre los que se incluyen el antígeno K1 (ácidos siálicos unidos por enlaces  $\alpha(2-8)$ ), K4 (una cadena central de residuos de condroitina) y K5 (una cadena central de residuos de heparosa) (Whitfield, 2006). Las cápsulas del grupo 2 de *E. coli* incluyen un número de estructuras muy similares. Así, los antígenos K13 y K20 difieren de K23 solamente en la presencia o ubicación de los grupos O-acetilo (Vann *et al.*, 1983). Algunas cepas como *E. coli* K100 contienen residuos fosfato en sus estructuras centrales y son reminiscentes de los ácidos teicoicos de las bacterias Gram-positivas (Rodríguez *et al.*, 1988a). Otras cápsulas del grupo 2 tienen estructuras



Desde el punto de vista biosintético y de exportación, las cápsulas de los grupos 2 y 3 comparten muchas características comunes (Tabla I). Se ha considerado la posibilidad de que las cepas con cápsulas del grupo 3 sean descendientes de un progenitor con cápsula del grupo 2 que ha adquirido un nuevo *clúster* de genes capsulares como consecuencia de una transferencia horizontal (Corbett y Roberts, 2008). En ambos casos, la biosíntesis de las cápsulas es llevada a cabo por proteínas codificadas por los loci *kps*, con gran cantidad de proteínas conservadas entre ellos que sirven como marcadores para sus sistemas biosintéticos (Whitfield, 2006).

Otro punto que tienen en común estos dos tipos de cápsulas es la manera en la que se anclan a la superficie celular bacteriana. En ambos casos, la estructura del anclaje queda representada por un residuo diacilglicerol (Kuo *et al.*, 1985) unido a través de un puente fosfodiéster a un azúcar reducido terminal del polisacárido. Este sistema es similar al encontrado en polisacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* (Gotschlich *et al.*, 1981) y, probablemente, de *Haemophilus influenzae* (Tsui *et al.*, 1981). Una pequeña variación ha sido vista en algunas cepas de *E. coli* del grupo 2. Así, en los antígenos capsulares K12 y K85, el residuo L-glicerofosfatidil se encuentra unido al polisacárido a través de un residuo de KDO localizado en el extremo reductor del polisacárido aunque no forma parte de su unidad estructural repetitiva (Schmidt y Jann, 1983). Sin embargo, el KDO no ha sido encontrado en ningún polisacárido capsular que contenga ácidos siálicos en su estructura (Gotschlich *et al.*, 1981), lo que ha llevado a considerar que la similitud estructural entre el ácido siálico y el KDO evita la necesidad de que algunos polisacáridos capsulares necesiten KDO (Whitfield y Valvano, 1993).

De manera general, la información sobre la biosíntesis y ensamblaje de las cápsulas del grupo 3 es escasa y el sistema es, en gran parte, deducido de la conservación de genes que codifican para proteínas implicadas en los pasos críticos de los procesos de biosíntesis, exportación y translocación y de los estudios de complementación mediante mutantes de cápsulas del grupo 2. Sin embargo, una característica importante que diferencia la expresión de ambas cápsulas es que, a diferencia de las cápsulas del grupo 2, las cápsulas del grupo 3 no están sometidas a termorregulación con lo que son sintetizadas a todas las temperaturas de crecimiento (Whitfield, 2006).

### 1.3.3 Los ácidos siálicos en las cápsulas bacterianas

Los ácidos siálicos son una familia estructuralmente compleja de monosacáridos de nueve carbonos que aunque pueden aparecer de forma libre, normalmente se encuentran en posición terminal de la fracción glucídica de muchos oligosacáridos, glicoproteínas, glicolípidos y de algunos polímeros bacterianos (Rutishauser, 1996; Gamian, 2000; Sato *et al.*, 2000). El ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) es el más común de los ácidos siálicos y actualmente cuenta con más de cuarenta derivados que resultan, entre otros, de la sustitución de uno o más grupos hidroxilo por grupos acetil, metil, lactil, fosfato o sulfato (Kelm y Schauer, 1997; Schauer, 1997).

Los ácidos siálicos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza pudiendo formar parte de vertebrados, invertebrados, hongos, bacterias y virus (Cordfield y Schauer, 1982), aunque de momento, ni el ácido acetilneuramínico ni sus derivados han sido identificados en el reino vegetal. En las bacterias, los ácidos siálicos se encuentran integrados en las estructuras lipopolisacáridicas y/o formando parte de las estructuras capsulares (Tabla II), y su presencia (como factores de virulencia) está restringida a especies que presentan una relación simbiótica o parasitaria con organismos que también poseen ácidos siálicos en sus estructuras macromoleculares (Vimr y Lichtensteiger, 2002).

Con respecto a la presencia de restos sialilados en la estructura capsular bacteriana, éstos pueden encontrarse como único componente (homopolímeros) o combinados con otros glúcidos (heteropolímeros). Se han identificado tres homopolímeros de ácidos polisialílicos en las estructuras capsulares bacterianas, los cuales se diferencian por el tipo de enlace entre el Neu5Ac. Así, el primero que se descubrió fue el polímero de restos de Neu5Ac unidos mediante enlaces de tipo  $\alpha(2-8)$  (McGuire *et al.*, 1964), también conocido como ácido colomínico y que se encuentra en cepas como *Neisseria meningitidis* grupo B (Masson y Holbein, 1983), *E. coli* K1 (Barry, 1959), *Moraxella nonliquefaciens* (Sarvamangala *et al.*, 1983) y *Manhemia haemolytica* A2 (Adlam *et al.*, 1986). En el segundo tipo, los restos de Neu5Ac se encuentran unidos por enlaces de tipo  $\alpha(2-9)$  y está presente en *N. meningitidis* grupo C (Bhattacharjee *et al.* 1975). En el tercer tipo, los restos de Neu5Ac están unidos por



**Tabla II.** Polímeros bacterianos que contienen ácidos siálicos.

	<b>Bacteria</b>	<b>Unidades y enlace</b>
<b>Homopolímeros</b>	<i>Escherichia coli</i> K1 (Barry, 1959)	-8)Neu5Ac $\alpha$ (2-8)Neu5Ac(2-
	<i>E. coli</i> K92 (Bos 12) (Egan <i>et al.</i> , 1977)	-9)Neu5Ac $\alpha$ (2-8)Neu5Ac(2-
	<i>Neisseria meningitidis</i> grupo B (Masson y Holbein, 1983)	-8)Neu5Ac $\alpha$ (2-8)Neu5Ac(2-
	<i>Moraxella nonliquefaciens</i> (Sarvamangala <i>et al.</i> , 1991)	-8)Neu5Ac $\alpha$ (2-8)Neu5Ac(2-
	<i>N. meningitidis</i> grupo C (Bhattacharjee <i>et al.</i> , 1975)	-9)Neu5Ac $\alpha$ (2-9)Neu5Ac(2-
	<i>Manhemia haemolytica</i> (Adlam <i>et al.</i> , 1987)	-8)Neu5Ac $\alpha$ (2-8)Neu5Ac(2-
<b>Heteropolímeros</b>	<i>N. meningitidis</i> grupo W135 (Bhattacharjee <i>et al.</i> , 1976)	-4)Neu5Ac $\alpha$ (2-6)Gal $\beta$ (1-
	<i>Photobacterium damsela</i> JTO160 (Yamamoto <i>et al.</i> , 1996)	Neu5Ac(2-3/6)Gal $\beta$ (1-
	<i>N. meningitidis</i> grupo 406Y (Pavliak <i>et al.</i> , 1993)	-4)Neu5Ac $\alpha$ (2-3)Gal $\beta$ (1-
	<i>Streptococcus</i> grupo B (Jennings <i>et al.</i> , 1983)	Asociado a estructuras glucídicas complejas
	<i>Salmonella toucra</i> O:48 (Kedzierska, 1978)	
	<i>Salmonella arizona</i> O:5 y O:29 (Barry <i>et al.</i> , 1962)	
	<i>Salmonella djakarta</i> O:48 (Basu <i>et al.</i> , 1994)	
	<i>Salmonella isazeg</i> O:48 (Basu <i>et al.</i> , 1994)	
	<i>E. coli</i> O:24 y O:56 (Gamian <i>et al.</i> , 1994)	
	<i>Campylobacter jejuni</i> (Auki <i>et al.</i> , 1993)	
	<i>Campylobacter fetus</i> (Moran <i>et al.</i> , 1994)	Antígeno O
	<i>Vibrio cholerae</i> H11 (Bock <i>et al.</i> , 1994)	
	<i>Hafnia alvei</i> 2 (Ravenscroft <i>et al.</i> , 1995)	
	<i>Haemophylus ducrei</i> 35000 (Melaugh <i>et al.</i> , 1994)	
	<i>Citrobacter freundii</i> O:5 (Barru <i>et al.</i> , 1962)	
	<i>N. meningitidis</i> sp. (Mandrel <i>et al.</i> , 1991)	
	<i>N. gonorrhoeae</i> (Gotschlich, 1994)	
	<i>Corinebacterium parvum</i> (Dawes <i>et al.</i> , 1974)	Situación desconocida
	<i>Actinomyces viscosus</i> (Jones <i>et al.</i> , 1986)	

enlaces alternativos  $\alpha(2-8)$  y  $\alpha(2-9)$  y se encuentra en cepas como *E. coli* K92 (Egan *et al.*, 1977).

La mayoría de los microorganismos en los que se han detectado ácidos siálicos son patógenos oportunistas y miembros habituales de la flora bacteriana humana. Debido al carácter ácido de los ácidos siálicos, éstos les sirven como escudos frente a los sistemas de defensa del hospedador. Como consecuencia, las bacterias encapsuladas con ácidos polisiálicos causan numerosas enfermedades invasivas tales como meningitis e infecciones del tracto urinario (Jann *et al.*, 1992). Así, *E. coli* K1, *N. meningitidis* y *Streptococcus* grupo B, microorganismos que solo representan el 15% de la flora intestinal, son los responsables del 80% de las meningitis neonatales (McCracken *et al.*, 1974; Robbins *et al.*, 1974), de entre el 30 y 40% de las septicemias y de numerosos casos de polionefritis infantil (Jann *et al.*, 1970; Sarff *et al.*, 1975; Glode *et al.*, 1977; Kaijser *et al.*, 1977; Robbins *et al.*, 1980). El antígeno K1 de *E. coli* es vital para atravesar la barrera hematoencefálica del cerebro ya que modera el proceso de maduración de *E. coli* a través de vacuolas que previenen la fusión con los lisosomas dentro de las células endoteliales (Kim *et al.*, 2003).

Los ácidos siálicos contenidos en las estructuras capsulares realizan otras muchas funciones importantes para la supervivencia de la bacteria. Así, los ácidos siálicos protegen al microorganismo dificultando su fagocitosis (Charland *et al.*, 1996; Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1992) e impidiendo la activación de la vía alternativa del complemento (Pangburn, 2000). Algunas bacterias como *E. coli* K1 y *N. meningitidis* grupo B son capaces de evadir el sistema inmune de su hospedador impidiendo la formación de anticuerpos frente a ella. Este escaso carácter inmunogénico es debido a que las cápsulas de estas bacterias son similares estructuralmente a los motivos de los ácidos polisiálicos presentes en las moléculas de adhesión celular neural (N-CAM) de mamíferos (Orskov *et al.*, 1977; Zuber *et al.*, 1992). En consecuencia, estos microorganismos sialilados son enmascarados por el polisacárido capsular y no son reconocidos como extraños por el hospedador (Vimr y Lichtensteiger, 2002).

## 1.4 Organización de los *clústers* de genes capsulares en *E. coli*.

La cepa utilizada en el presente trabajo, *E. coli* K92, se caracteriza por su capacidad para sintetizar PA como estructura capsular (Egan *et al.*, 1977; Lively *et al.*, 1986; González-Clemente *et al.*, 1990). Sin embargo, como veremos más adelante, esta bacteria es también capaz de sintetizar CA como polisacárido capsular. Por este motivo, al hablar de la organización genética centraremos la presentación en la organización de los *clústers* de PA y CA: *kps* y *cps* respectivamente.

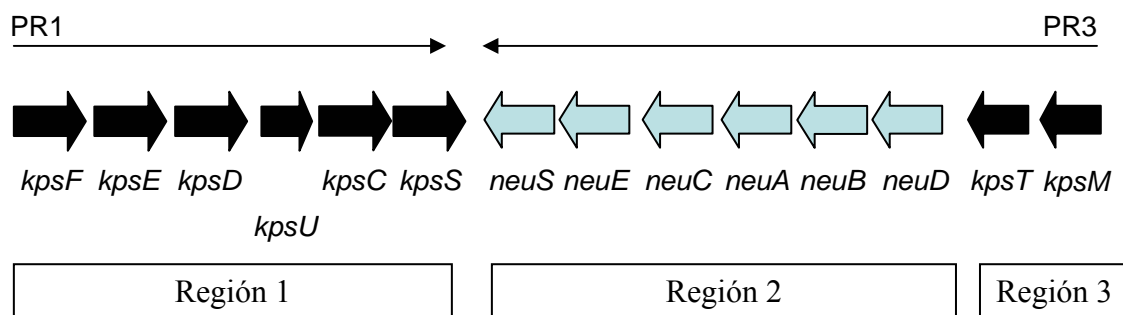
### 1.4.1 Organización genética de las cápsulas del grupo 2 (ácido polisiálico)

Como se describe en la tabla II, los únicos polímeros capsulares polisialilados descritos en *E. coli* pertenecen a antígenos capsulares del grupo 2: K1 y K92. Como consecuencia y con objeto de facilitar la presentación, de ahora en adelante, para explicar los procesos implicados en la biosíntesis y regulación de los ácidos polisiálicos, tomaremos, como modelo general, los procesos acontecidos en las cápsulas del grupo 2 con las particularidades correspondientes de los polímeros de Neu5Ac.

El locus *kps* para la expresión de cápsulas del grupo 2 en *E. coli* está organizado en tres regiones principales. Las regiones 1 y 3 contienen los genes responsables para el transporte del nuevo polisacárido desde el citoplasma hasta la superficie celular, y están conservadas en todos los loci del grupo 2 (Figura 1.10). La región 2 codifica para los genes responsables de la síntesis del polisacárido y sus precursores (Whitfield, 2006).

La región 1 se compone de una simple unidad transcripcional que contiene seis genes, *kpsFEDUCS* y un promotor  $\sigma^{70}$  (PR1) ubicado corriente arriba de *kpsF*, y que además contiene un sitio de unión para la proteína IHF (*Integration Host Factor*), una proteína arquitectónica del DNA. La transcripción desde PR1 genera un mensaje policistrónico de 8 kb que será procesado para dar lugar a un transcrito *kpsS*-específico de 1,3 kb, y se ha propuesto que este proceso juegue un papel en la expresión diferencial de este gen (Roberts, 2000). El gen *kpsF* contiene un terminador transcripcional Rho-dependiente. La proteína Rho es una molécula hexamérica de unión al ARN que sigue a la ARN polimerasa en la transcripción. Si la ARN polimerasa se detiene, la

transcripción se termina cuando la proteína Rho la alcanza. Se cree que estos terminadores intragénicos juegan un papel regulador durante los momentos de estrés fisiológico reduciendo la transcripción innecesaria (Corbett y Roberts, 2008).



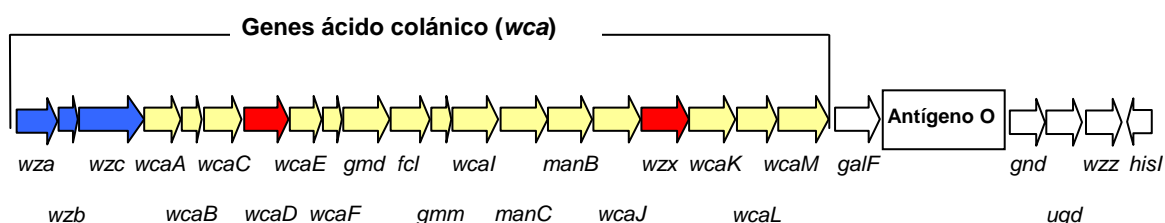
**Figura 1.10** Organización de los genes requeridos para la expresión de cápsulas del grupo 2. Los genes conservados (regiones 1 y 3) están representados en negro. Los genes específicos de serotipo (en este caso, *E. coli* K1) están representados en azul. Figura modificada de Whitfield (2006) y Corbett y Roberts (2008).

La región 3 contiene dos genes, *kpsMT*, implicados en el transporte del polisacárido capsular a través de la membrana citoplasmática. La transcripción desde este promotor (PR3) es conducida a través de la región 2, atravesando un terminador transcripcional dependiente de la proteína Rho que existe entre *kpsT* y *neuD* (el primer gen de la región 2), generando un transcrito policistrónico que contiene los genes de ambas regiones 2 y 3 (Whitfield, 2006; Corbett y Roberts, 2008).

A diferencia de las regiones 1 y 3, la región 2 es específica de serotipo. Así, por ejemplo, en el serotipo K5 esta región contiene 4 fragmentos abiertos de lectura u ORFs (*Open Reading Frame*) mientras que en K1, contiene 6 genes denominados *neuDBACES* (Whitfield, 2006). En *E. coli* K5, esta región posee un alto contenido en A+T (66%) mientras que sus regiones 1 y 3 poseen un 50 y 57% respectivamente, valores más típicos para el cromosoma de *E. coli*. Este hecho sugiere que entre las regiones 1 y 3 han surgido eventos de recombinación homóloga de *clústers* de ADN capsular (Corbett y Roberts, 2008).

### 1.4.2 Organización genética del *clúster* del ácido colánico

El *clúster* de genes responsable de la síntesis de CA en *E. coli*, conocido como *wca* o *cps<sub>ca</sub>* (*Capsular Polysaccharide Synthesis*) (Trisler y Gottesman, 1984) es un segmento de ADN de 23 kb que contiene 20 genes orientados de la misma forma (Figura 1.11) (Stevenson *et al.*, 1996). El promotor se encuentra a continuación de una región JUMPStart (*Just Upstream of Many bacterial Polysaccharide gene Starts*) (Hobbs y Reeves, 1994), un elemento altamente conservado que se encuentra corriente arriba de muchos *clústers* de genes polisacáridicos (Whitfield, 2006). Solamente hay una evidente secuencia de terminación transcripcional, lo que sugiere que los 20 genes son parte de una única y larga unidad transcripcional (Stevenson *et al.*, 1996).



**Figura 1.11** Organización de los genes requeridos para la expresión de ácido colánico en cepas de *E. coli* con cápsulas del grupo 2 y 3 y en *E. coli* K-12. Los genes implicados en la regulación de altos niveles de polimerización y translocación son representados en azul. Los genes implicados en la biosíntesis son representados en amarillo, entre los que se incluyen los característicos genes *wcaD* y *wcaJ* destacados en rojo. Figura modificada de Whitfield, 2006.

El locus *wca* se compone de dos regiones separadas por un supuesto bucle atenuador transcripcional. La región 5' del locus contiene tres genes conservados (*wza*, *wzb* y *wzc*) implicados en el control de la polimerización y la translocación del producto desde la membrana interna hasta la superficie celular y operan independientemente de la estructura final de la cápsula. La región 3' es específica del serotipo y codifica para enzimas de un sistema de biosíntesis WcaD-dependiente. Éste incluye las enzimas para la producción de precursores nucleotídicos, glicosiltransferasas (GTs), y dos proteínas integrales de la membrana interna (WcaD y Wzx) (Whitfield, 2006; Corbett y Roberts, 2008). Cabe señalar que en el *clúster wca* solo se encuentran los genes responsables de

la producción de GDP-fucosa, uno de los precursores nucleotídicos que constituyen la unidad E del ácido colánico. Los otros tres constituyentes de la unidad E, UDP-D-glucosa, UDP-D-galactosa y UDP-D-ácido glucurónico son utilizados por las células para otros propósitos por lo que los genes responsables de su producción están localizados en otros sitios del cromosoma de *E. coli* K-12 (Stevenson, 1996).

La región JUMPStart es una secuencia conservada de 39 bp de la región 5' que no se traduce (UTR: 5'*untranslated region*) y que está presente en muchos genes implicados en la biosíntesis de polisacáridos. Contiene un motivo conservado conocido como *ops* (*operon polarity supresor*), el cual tiene que estar presente en el mRNA transcrito de un gen para que funcione (Nieto *et al.*, 1996). Durante la transcripción es posible que, al igual que ocurre con las cápsulas del grupo 1 en *E. coli*, la proteína RfaH sea reclutada por la secuencia *ops* e interactúe con la ARN polimerasa. Esta unión provocaría que se acelere la transcripción y, en consecuencia, el complejo ARN polimerasa-RfaH sería menos sensible a las señales de terminación transcripcional, favoreciendo así la elongación de la transcripción (Bailey *et al.*, 2000; Artsimovitch y Landick, 2002; Whitfield, 2006). Debido a su papel, RfaH es a menudo esencial para la transcripción de largos *clústers* de genes polisacáridicos. En ausencia de RfaH, la lectura transcripcional disminuye al pasar por un bucle atenuador transcripcional con lo que la producción de cápsula se reduce significativamente (Bailey *et al.*, 1997).

## **1.5 Biosíntesis y ensamblaje de las cápsulas en *E. coli*.**

### **Continuidad en los procesos**

La biosíntesis y ensamblaje de los polisacáridos capsulares es un fenómeno complejo. Los precursores activados (derivados de azúcares nucleotidilfosfato) en el citoplasma, son ensamblados al polímero creciente mediante enzimas asociadas a la cara interna de la membrana. A través de una ruta de translocación, el polímero atraviesa el periplasma y la membrana externa y llega a la superficie celular. Determinados aspectos posibilitan la existencia de un complejo de ensamblaje transmembranal que coordina la biosíntesis del polímero con la exportación y translocación tanto espacial como temporalmente. Esta idea proporciona una cierta continuidad a nivel de síntesis entre el citoplasma y la superficie celular y simplifica los problemas derivados de que una superficie celular esté compuesta por dos membranas diferentes, un periplasma y una capa de peptidoglicano. A pesar de la gran diversidad de los glicoconjugados bacterianos, las bacterias usan un limitado repertorio de estrategias de biosíntesis y ensamblaje y las cápsulas de *E. coli* se utilizan como modelos de trabajo (Whitfield, 2006).

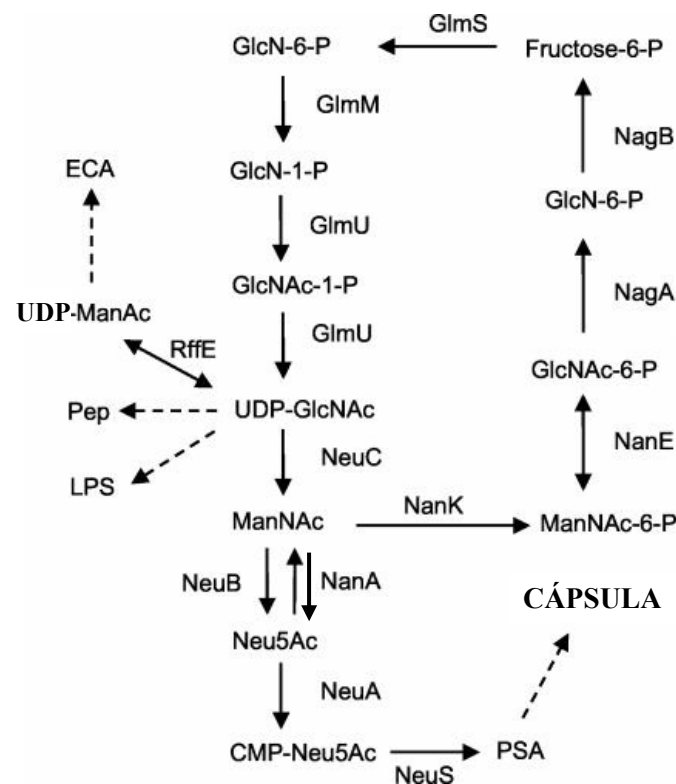
#### **1.5.1 Biosíntesis y ensamblaje de las cápsulas del grupo 2 (ácido polisiálico)**

La biosíntesis de las cápsulas del grupo 2 en *E. coli* la llevan a cabo proteínas codificadas en el locus *kps*, muchas de las cuales son proteínas conservadas que sirven como modelos de sus sistemas de biosíntesis.

##### **1.5.1.1 Síntesis de novo de ácidos polisiálicos en *E. coli***

Como se muestra en la figura 1.12, se cree que la síntesis de novo de los ácidos polisiálicos (PSA) comienza con la conversión de UDP-GlcNAc (un precursor común de las paredes bacterianas) en ManNAc en una reacción catalizada por la N-acetilmanosamina sintetasa (NeuC). La condensación de ManNAc con fosfoenolpiruvato (PEP) mediante la acción de la NeuNAc sintasa (NeuB) (Vimr, 1992), o con piruvato mediante la acción de la NeuAc liasa (NanA) (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1995; Ferrero *et al.*, 1996), origina ácido siálico libre. El ácido siálico es

activado mediante la CMP-ácido siálico sintetasa (NeuA) originando CMP-Neu5Ac, el donador de ácidos siálicos para todas las sialiltransferasas conocidas tanto en procariontas como en eucariotas (Vimr *et al.*, 2004). La función exacta del producto del *neuD* es desconocida, aunque si parece necesario para la biosíntesis de ácido polisialílico, quizás estabilizando a NeuB mediante la unión de ambas (Vimr *et al.*, 2004).



**Figura 1.12.** Rutas propuestas para la síntesis y degradación de los ácidos siálicos en *E. coli*. Abreviaturas. GlcN, glucosamina; GlcNAc, N-acetilglucosamina; UDP-GlcNAc, uridin-difosfato-N-acetilglucosamina; ManNAc, N-acetilmanosamina; Neu5Ac, N-acetilneuramínico; CMP-Neu5Ac, citosín-monofosfato-N-acetilneuramínico; PSA, ácido polisialílico; ECA, antígeno común enterobacteriano; UDP-ManNAc, uridin-difosfato-acetilmanosamina; Pep, peptidoglicano; LPS, lipopolisacárido; P, ortofosfato. Figura modificada de Vimr *et al.* (2004).

### 1.5.1.2 Reacción de iniciación y naturaleza del aceptor endógeno

Aunque las enzimas NeuS (polisialiltransferasas) son suficientes para llevar a cabo la elongación del polisacárido, son incapaces de iniciar la formación de ácido polisialílico. Esto indica que es necesaria una enzima “iniciadora” difícilmente caracterizable hasta el momento ya que se desconoce la naturaleza real del aceptor



endógeno implicado en el crecimiento de la cadena de ácido polisiálico (Whitfield, 2006).

Estudios previos sobre la biosíntesis del ácido polisiálico de *E. coli* K1 han permitido considerar a la molécula und-P-Neu5Ac como un posible intermediario, sugiriendo un mecanismo parecido al observado en otros glicoconjugados bacterianos. Sin embargo, no se ha encontrado la forma ácido polisiálico unida a lípido, y hasta ahora, los datos existentes no discriminan entre un modelo donde la cadena crece sobre el und-P o donde el und-P-Neu5Ac sirve como donador de otro aceptor, como por ejemplo el diacilglicerolfosfato (Whitfield, 2006). Cabe la posibilidad de que el aceptor endógeno sea el diacilglicerolfosfato (o diacilglicerolfosfato-KDO), el cual se sabe que, de una manera u otra, interviene en el proceso de iniciación. Sin embargo, la reacción de iniciación de la cadena polisacáridica para cápsulas de ácidos polisiálicos en *E. coli* sigue sin esclarecerse (Whitfield, 2006).

### 1.5.1.3 Elongación y terminación de las cadenas

Se ha demostrado que las enzimas glicosiltransferasas (GTs) tienen actividad de extensión de cadena *in vitro* con un aceptor apropiado (Ferrero, 1991). Estas enzimas están muy bien representadas por las polisialiltransferasas de los serotipos K1 y K92 (Ortiz *et al.*, 1989; González-Clemente *et al.*, 1989; Whitfield, 2006). Investigaciones previas han concluido con la identificación de NeuS como una GT que transfiere residuos de Neu5Ac desde CMP-Neu5Ac hasta el extremo no reductor del glicano naciente (Ferrero *et al.*, 1996; Troy, 1992; Vimr *et al.*, 1995). La poli- $\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (NeuS) de *E. coli* K1 elonga, a partir de tres residuos de ácidos siálicos (Ferrero *et al.*, 1991), ambos aceptores endógenos y exógenos *in vitro* (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1988a; Steenbergen *et al.*, 1992). Lo mismo ocurre con el homólogo altamente conservado NeuS de *E. coli* K92, que genera un polímero que alterna enlaces  $\alpha(2,8)$  y  $\alpha(2,9)$  (González-Clemente *et al.*, 1990; McGowen *et al.*, 2001). Los datos recogidos muestran que las enzimas NeuS son los únicos determinantes específicos de serotipo (Steenbergen y Vimr, 2003).

En *E. coli* K1, la mayoría de las cadenas llegan hasta un estrecho margen de longitud de entre 160-230 residuos, sugiriendo la existencia de un mecanismo que determina el tamaño. Hasta el momento, el final de la polimerización continúa siendo

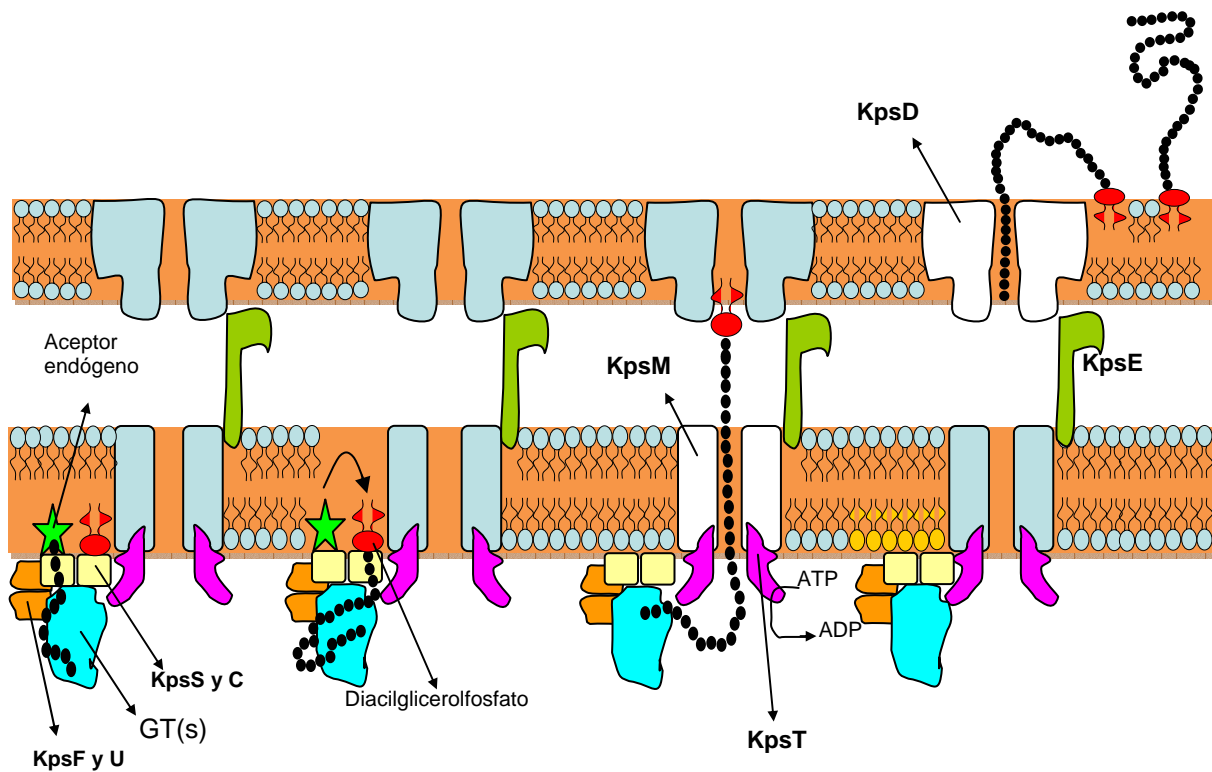
un enigma. Sin embargo, este proceso recibe una considerable atención, ya que se cree que tiene un importante significado en la virulencia de la bacteria (Whitfield, 2006).

#### 1.5.1.4 Exportación dependiente de transportador ABC

La translocación de las cadenas de ácidos polisiálicos de *E. coli* a través de la membrana citoplasmática constituye un importante problema para la bacteria debido a su carga negativa y su alto peso molecular. El proceso es llevado a cabo por un tipo de transportadores de la superfamilia ABC (*ATP Binding Cassettes*), de los cuales existen más de 80 miembros en *E. coli*. Los transportadores ABC conducen la importación y exportación de sustratos a expensas de la hidrólisis del ATP y constan de dos dominios, un dominio transmembranal o TMD (*TransMembrane Domain*) y un dominio de unión a nucleótido o NBD (*Nucleotide-Binding Protein Domain*) que contiene las secuencias Walker A y B (indicativo de unión a ATP). Ambos dominios pueden estar presentes como polipéptidos individuales o fusionados formando proteínas mayores (Davidson y Chen, 2004).

Se ha propuesto un modelo de cointegración para tratar de explicar cómo la transferencia del polisacárido a través de la membrana plasmática es llevada a cabo por las proteínas KpsM (TMD) y KpsT (NBD), mientras que KpsD y KpsE serían los responsables de su transporte a través del periplasma (Fig 1.13) (Silver *et al.*, 2001).

En este modelo se puede observar como la proteína KpsT se asocia con el ácido polisiálico, posiblemente mediado por KpsC o KpsS. En esta situación, la unión del ATP a KpsT produce un cambio conformacional en la proteína permitiendo la inserción de KpsT en el poro formado por dos moléculas de KpsM en la membrana interna, al tiempo que se introduce el polímero dentro de ese canal de exportación. Para volver a la situación inicial, el ATP unido es hidrolizado, eliminando el complejo KpsM/T de la membrana y liberando el polisacárido en el periplasma. Ciclos repetidos de inserción-reinserción podrían ser necesarios para completar el proceso de exportación. Diversos estudios parecen mostrar que el sustrato para el sistema de transporte ABC debe ser un polímero unido a un determinado lípido que precede al transporte. Aun así no parece ser suficiente para su exportación (Corbett y Roberts, 2008).

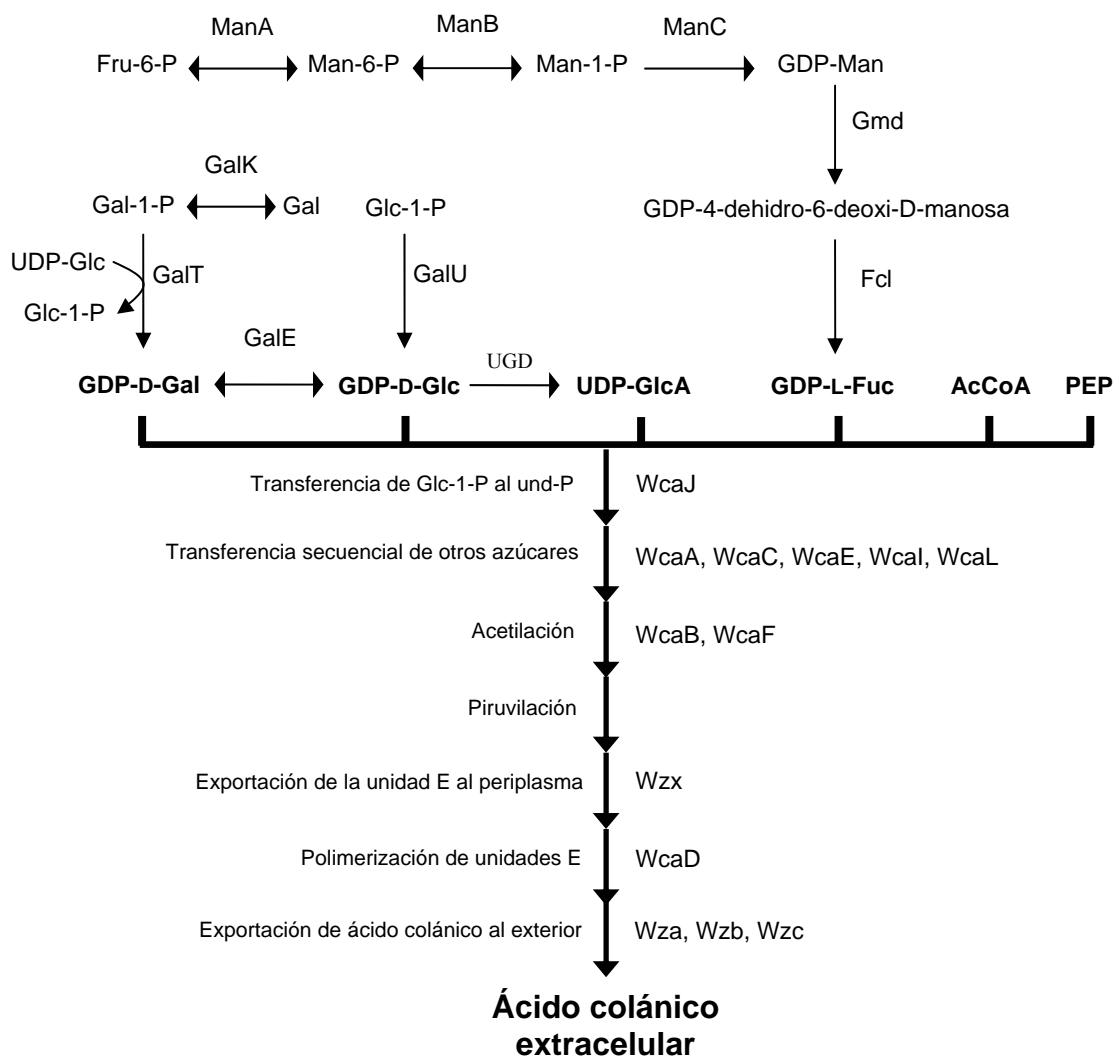


**Figura 1.13** Modelo propuesto para la biosíntesis y ensamblaje de las cápsulas de ácidos siálicos en *E. coli*. Comenzando desde la izquierda, la formación del polímero es iniciada por un aceptor endógeno desconocido y continuada por sucesivas glicosiltransferasas, las cuales añaden residuos al extremo no reductor de la cadena. El producto final se une al diacilglicerolfosfato (o diacilglicerolfosfato-KDO), pero no está claro si éste está presente en la iniciación o es añadido durante o después (como se muestra aquí) de la polimerización. El polímero es exportado a través del transportador ABC (KpsM y KpsT). KpsS y C son esenciales para este proceso y aunque KpsF y KpsU también participan, no se conocen más detalles sobre su función. La translocación a través de la membrana periplásmica y externa requiere KpsE y KpsD, los cuales proporcionan una proteína de fusión a membrana (adaptador) y funciones de proteína OMA (*Outer-Membrane Auxiliary*). Figura modificada de Whitfield (2006).

### 1.5.2 Biosíntesis y ensamblaje del ácido colánico

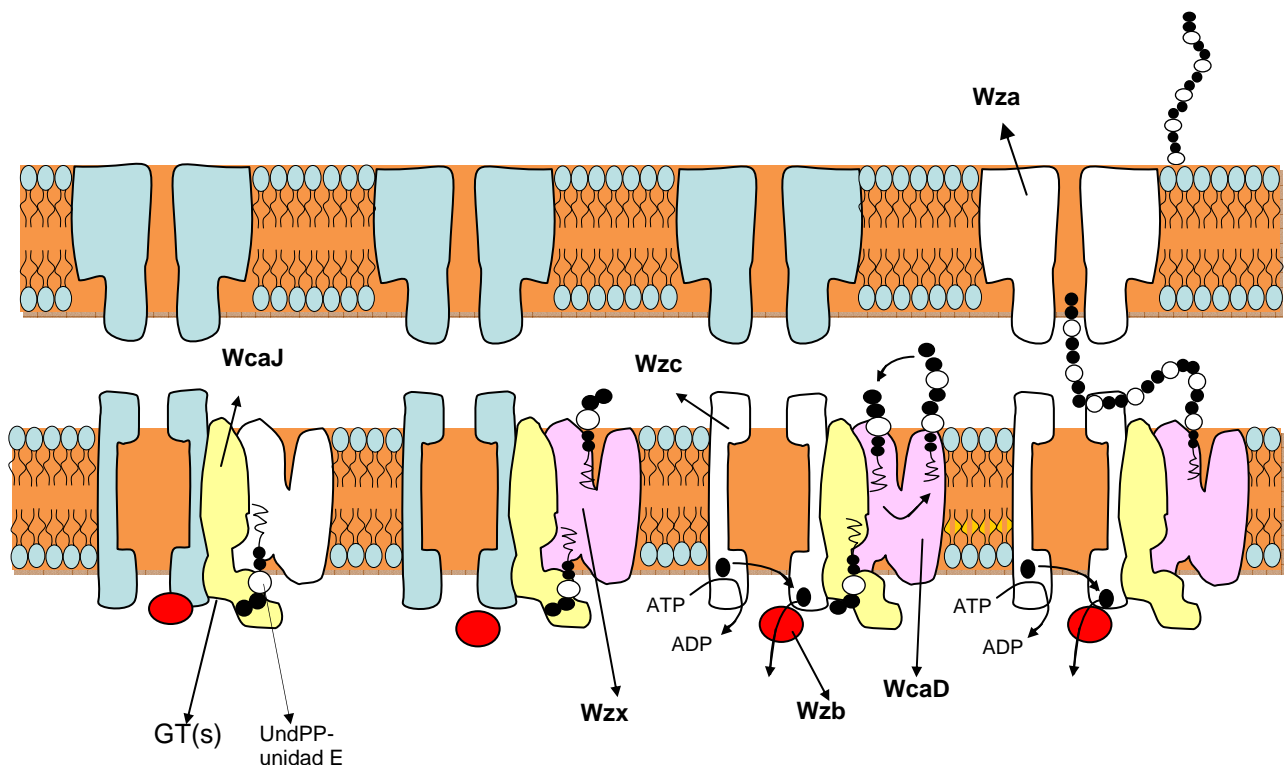
La síntesis del CA es un complejo proceso que envuelve reacciones que ocurren en diferentes compartimentos celulares. En primer lugar, los precursores derivados de azúcares (UDP-D-glucosa, UDP-D-galactosa, UDP-D-ácido glucurónico y GDP-L-fucosa) son sintetizados en el citoplasma (Figura 1.14). A partir de estos precursores, un conjunto de enzimas glicosiltransferasas localizadas en la cara citoplasmática de la membrana interna son las encargadas de formar la estructura repetitiva del ácido

colánico, denominada unidad E, la cual se sintetiza sobre un lípido transportador, posiblemente el undecaprenol-pirofosfato (und-PP) (así lo vamos a considerar en este trabajo). Parece ser que el primer precursor que es transferido al lípido transportador es la UDP-glucosa, un proceso catalizado por una glucosa-1-P transferasa (WcaJ) que transfiere Glc-1-P al lípido transportador. WcaJ y sus homólogos poseen al menos un segmento transmembranal como se podría esperar para enzimas que interactúan con un



**Figura 1.14** Ruta propuesta para la biosíntesis de ácido colánico en *E. coli*. Abreviaturas: Fru, fructosa; Man, manosa; GDP-Man, guanósino-difosfato-manosa; UDP-Glc, uridino-difosfato-glucosa; P, ortofosfato; GDP-D-Gal, guanósino-difosfato-D-galactosa; GDP-D-Glc, guanósino-difosfato-D-glucosa; UDP-GlcA guanósino-difosfato-ácido glucurónico; GDP-L-Fuc guanósino-difosfato-L-fucosa; AcCoA, acetil-coenzima A; PEP, fosfoenolpiruvato. Esquema tomado de Stevenson *et al.* (1996).

aceptor lipídico anclado a la membrana (Stevenson, 1996). Las subsecuentes glicosiltransferasas (posiblemente WcaA, WcaC, WcaE, WcaI, y WcaL) parecen ser proteínas periféricas de membrana que actúan secuencialmente para completar la unidad repetitiva unida al lípido (Whitfield y Paiment, 2003). En el proceso final de la síntesis de la unidad E participan las proteínas WcaB y WcaF que están estrechamente ligadas a una gran familia de acetiltransferasas. Presumiblemente, una de las dos es la responsable de la adición del grupo acetilo que se encuentra unido al primer residuo fucosil de la unidad E mediante un enlace O-glucosídico. Sin embargo, el papel concreto de la segunda O-acetiltransferasa permanece desconocido (Stevenson, 1996).



**Figura 1.15** Modelo para la biosíntesis y ensamblaje de las cápsulas de ácido colánico representado secuencialmente de izquierda a derecha. Una vez que el complejo undPP-unidad E es transportado hasta la cara periplásmica de la membrana interna en un proceso mediado por Wzx, dicho complejo constituye el sustrato necesario para la polimerasa (WcaD). La cadena polimérica va creciendo en el espacio periplásmico a medida que nuevas unidades E se van transfiriendo en un proceso dependiente de las proteínas Wzb y Wzc. Finalmente, el polímero es translocado hacia el exterior en un proceso mediado por una proteína que actúa como un canal, Wza. Figura modificada de Whitfield y Paiment (2003) y Whitfield (2006).

A continuación, cada unidad E unida al und-PP debe ser transportada desde la cara interna hasta la cara periplásmica de la membrana interna, lugar donde se produce la polimerización (Figura 1.15) (Whitfield y Paiment, 2003). Diferentes estudios sugieren que la proteína Wzx podría jugar un papel fundamental en el proceso de exportación y que posiblemente sea específica para el azúcar inicial de la unidad E unida al lípido transportador. Esta proteína tiene homología de secuencia con una familia de supuestas “proteínas exportadoras de polisacáridos” designadas como PST(1) (*Polysaccharide Transport*) (Whitfield y Paiment, 2003).

### 1.5.2.1 Proteínas de polimerización

Las unidades repetitivas unidas al und-PP proporcionan los sustratos necesarios para la polimerasa (WcaD) en un proceso donde el polímero naciente va creciendo por el extremo reductor al añadirse una nueva unidad E.

Una vez que el polímero unido al und-PP ha alcanzado una longitud de cadena adecuada parece ser que la propia polimerasa es capaz de liberarlo e introducirlo en la ruta de translocación hacia el exterior (Whitfield, 2006). Un candidato para el control de la extensión de la polimerización es la proteína Wzc, que pertenece a la familia de las MPA-1 (*Membrana Periplasmic Auxiliary*), también llamadas proteínas PCP-2a (*Polysaccharide Co-Polymerase*). Se sabe que las proteínas Wzc tienen capacidad para oligomerizar, aunque todavía no se ha precisado su función concreta en la biosíntesis de las cápsulas. Una posibilidad es que estas proteínas actúen realmente como copolimerasas que interactúan con la polimerasa WcaD (Whitfield, 2006).

### 1.5.2.2 Exportación y ensamblaje en la superficie celular

Mientras algunos aspectos de las rutas de polimerización están razonablemente bien documentados, en los pasos finales de exportación y ensamblaje de la cápsula todavía hay muchas incógnitas. Estos procesos incluyen la liberación del intermediario lipídico del nuevo polímero sintetizado y la translocación del polímero a través del periplasma y hasta la cara externa de la membrana externa. Un complejo de ensamblaje coordinado proporcionaría una unión física y funcional entre la superficie celular y la maquinaria de polimerización en la membrana interna y, posiblemente, superaría el

problema de transferir polímeros capsulares de alto peso molecular ( $P_m > 100000$ ) a la superficie (Whitfield y Paiment, 2003).

Un componente del complejo de translocación/ensamblaje de la cápsula es la proteína Wza, una lipoproteína de membrana externa que pertenece a la familia de auxiliares de membrana externa OMA (*Outer-Membrane Auxiliary*) y que forma unas estructuras en anillo semejantes a las de las proteínas secretinas. Estos anillos proteicos constituyen largos canales formados por complejos multiméricos de ocho monómeros (Nesper *et al.*, 2003; Whitfield, 2006). Presumiblemente, los canales formados por Wza estarán cerrados, ya que en caso de estar abiertos comprometerían la integridad de la membrana debido al gran tamaño que poseen. El estado abierto/cerrado del canal está determinado por interacciones entre componentes de la membrana interna y externa, entre los cuales podría encontrarse la proteína Wzc (Whitfield, 2006; Obadia *et al.*, 2007). Estos componentes formarían un complejo transmembranal que acoplaría la biosíntesis y la translocación en un proceso fuertemente coordinado (Corbett y Roberts, 2008).

## 1.6 Regulación de la expresión de las cápsulas en *E. coli*

Debido a las importantes inversiones de energía que los procesos de biosíntesis y exportación de un polisacárido capsular representa para la bacteria y que la expresión de la cápsula no es necesaria para las bacterias en todas las circunstancias, cabe esperar que la expresión de las cápsulas esté finamente regulada (Corbett y Roberts, 2008). En los siguientes apartados intentaremos revisar el conocimiento actual que se tiene sobre la expresión de PA y CA en *E. coli*.

### 1.6.1 Regulación de la síntesis de las cápsulas del grupo 2

Hasta el momento, poco se sabe sobre la regulación de las cápsulas del grupo 2 y ningún hallazgo hace suponer una regulación conjunta con la de la biosíntesis del ácido colánico. No obstante, en los últimos años se han identificado posibles reguladores comunes a las dos rutas que pueden ayudar a entender la relación que existe entre la biosíntesis de ambos tipos de cápsulas, la respuesta a las condiciones medioambientales bajo las que se producen y las implicaciones que su expresión tiene sobre la fisiología de la bacteria.

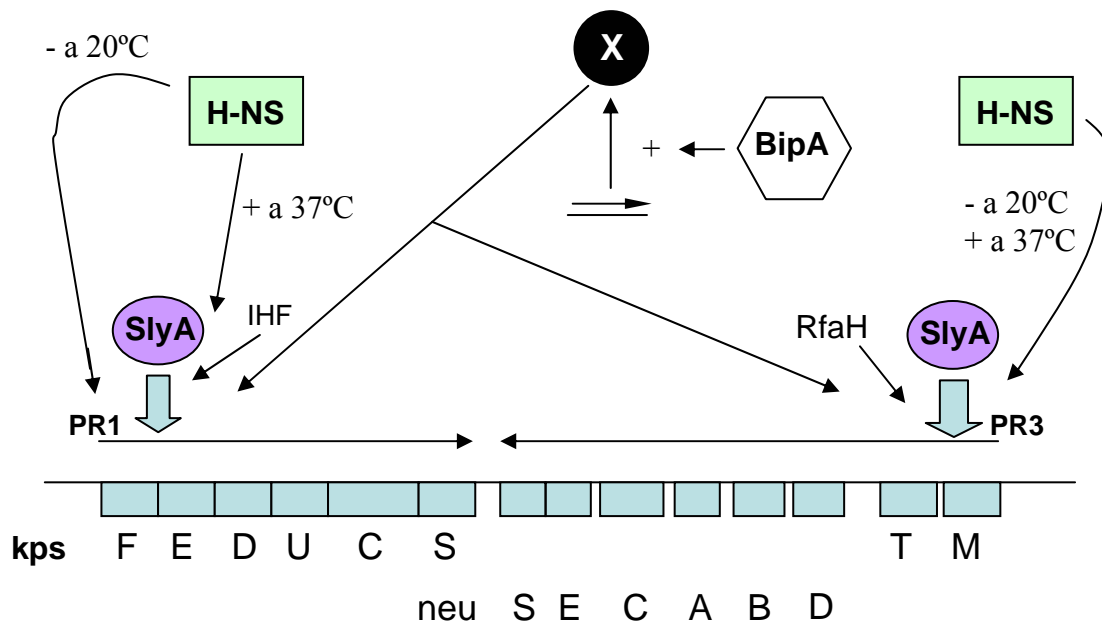
Como indicamos anteriormente (véase apartado 1.4.1), la transcripción de los *clústers* de genes de cápsulas del grupo 2 es llevada a cabo por dos promotores convergentes termorregulados localizados corriente arriba de las regiones 1 (PR1) y 3 (PR3). Ambos se encuentran silenciados transcripcionalmente a temperaturas iguales o inferiores de 20°C, siendo esta termorregulación una característica que define las cápsulas del grupo 2 y, aunque todavía no se comprende el proceso de regulación, estudios recientes indican la posible implicación de un complejo sistema multifactorial (Whitfield, 2006; Corbett y Roberts, 2008).

La regulación de la transcripción desde PR1 es compleja, con la participación de un gran número de proteínas reguladoras entre las que se incluyen H-NS, BipA e IHF (Figura 1.16). Por una parte, se ha comprobado que H-NS juega un inusual papel dual en esta regulación, siendo necesario para la máxima transcripción a 37°C pero también actuando para reprimir la transcripción a 20°C. Recientemente, se ha comprobado que la transcripción desde este promotor está regulada a través de la interacción entre H-NS y



SlyA (un activador transcripcional) (Xue *et al.*, 2009). Así, a 37°C, la máxima expresión desde PR1 requiere de la interacción de ambas proteínas con el promotor. Además, una expresión menor de SlyA a 20°C origina un complejo núcleoproteico controlado por H-NS que reprime la transcripción desde PR1. En este sistema, las disponibilidades relativas de H-NS y SlyA son probablemente importantes para la activación de la transcripción dependiente de temperatura (Corbett y Roberts, 2008).

Además de H-NS y SlyA, la proteína IHF es también requerida para la máxima transcripción desde PR1 a 37°C. Finalmente, se ha visto que la proteína BipA tiene un comportamiento similar al de H-NS. Sin embargo, la regulación de PR1 por BipA es independiente de SlyA y poco se conoce sobre ella (Xue *et al.*, 2009).



**Figura 1.16** Modelo de regulación de la expresión de genes de las cápsulas del grupo 2. A 37°C, SlyA y H-NS activan la transcripción de ambos promotores PR1 y PR3, siendo la actividad de SlyA dependiente de la unión de H-NS. A 20°C, H-NS actúa reprimiendo la transcripción. BipA es un regulador de la traducción y su ausencia provoca un descenso en la transcripción desde ambos PR1 y PR3, posiblemente debido a que BipA regula la traducción de un activador transcripcional desconocido denominado X. Figura modificada de Corbett y Roberts (2008).

El promotor PR3 está localizado en la región 5' del gen *kpsM*, y la transcripción desde PR3 continúa a través de la región 2 con la ayuda del factor de antiterminación

transcripcional RfaH. La actividad de RfaH es dependiente de la secuencia *ops* perteneciente a una región JUMPStart (UTR, *untranslated region*) ubicada entre el lugar de inicio de la transcripción y el primer gen del operón, *kpsM*.

La transcripción desde PR3 es dependiente de las proteínas H-NS y BipA, ya que ambos reguladores son necesarios para la máxima expresión a 37°C y para la represión mediada por temperatura a 20°C. Xue *et al.* (2009) han demostrado que H-NS se une a ambos extremos (5' y 3'UTR) del lugar de inicio de la transcripción, y que en esta región 3' existe una zona llamada DRE (*Downstream Regulatory Element*) esencial para la represión dependiente de temperatura efectuada por H-NS. Por otro lado, se ha demostrado que, independientemente de H-NS, SlyA activa la transcripción desde PR3 a 37°C aunque la máxima transcripción requiere de H-NS. Incluso, se ha identificado el sitio de unión para SlyA en PR3 y se ha comprobado que en presencia de ambas H-NS y SlyA, se forma un complejo núcleo-proteico diferente en PR3. Además, se ha demostrado que la región UTR también participa en esta termorregulación, ya que además de contener el H-NS DRE, funciona moderando el grado de transcripción que alcanza *kpsM* y permite la unión de RfaH (Xue *et al.*, 2009)

Finalmente, resaltar que el papel que juega BipA, una proteína GTPasa de unión al ribosoma necesaria para el crecimiento a bajas temperaturas en *E. coli* K-12 (Pfennig *et al.*, 2001), en la regulación de los *clústers* de genes de cápsulas del grupo 2, permanece desconocido. No obstante, es probable que su participación sea a través de un activador transcripcional todavía sin identificar (Corbett y Roberts, 2008).

### **1.6.2 Regulación de la síntesis de ácido colánico**

Extensos estudios genéticos han revelado que en *E. coli* existe un complejo circuito de señales que modulan la expresión de los genes implicados en la biosíntesis del CA. La expresión de los mismos está coordinadamente regulada en respuesta a una gran variedad de señales medioambientales tales como *shock* osmótico, desecación o combinación de bajas temperaturas de crecimiento (20°C), en presencia de glucosa como fuente de carbono y ante altas concentraciones de zinc (Huang *et al.*, 2006). Sin embargo, los mecanismos moleculares que inducen la síntesis de polisacárido capsular no han sido completamente esclarecidos (Hagiwara *et al.*, 2003).

En general, la expresión del CA en *E. coli* se encuentra sometida a termorregulación y el polímero es sintetizado principalmente a bajas temperaturas. Esto parece ser debido a que la transcripción del *clúster cps<sub>ca</sub>* se encuentra activada a dichas temperaturas de crecimiento o bajo determinadas condiciones de estrés (Whitfield y Paiment, 2003). Además de esta regulación transcripcional, se ha comprobado la existencia de otro sistema que regula la biosíntesis de CA a nivel de biosíntesis.

### 1.6.2.1 Regulación a nivel de transcripción: el sistema Rcs

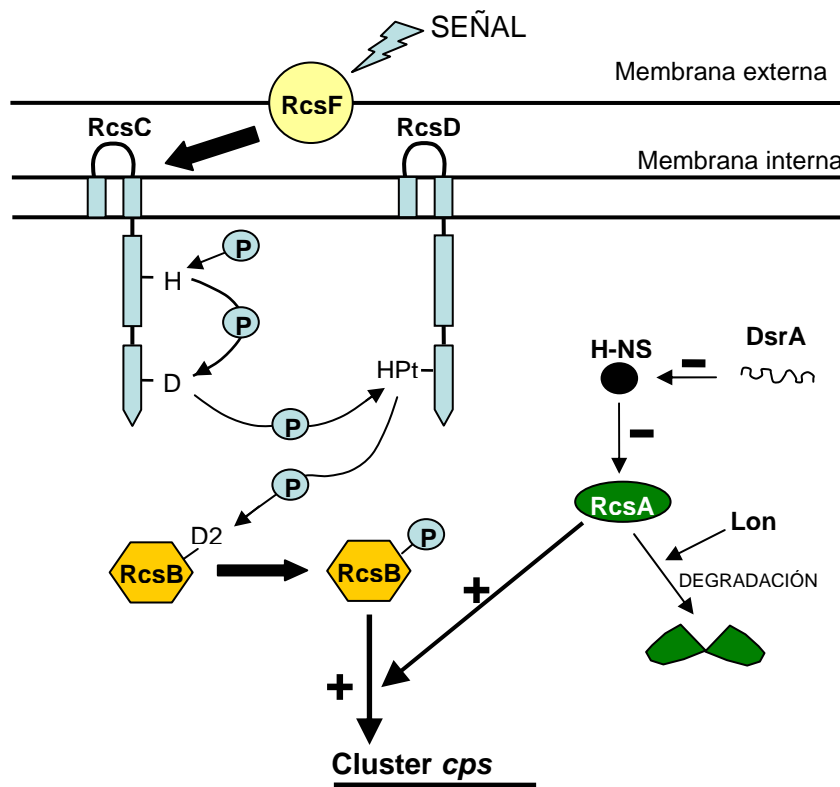
El sistema Rcs es un complejo sistema de cascadas de fosforilación-desfosforilación de proteínas (*phosphorelay*) implicado en la regulación de la síntesis del ácido colánico. De manera global, el sistema Rcs está integrado en varios circuitos de regulación y controla, en gran medida, el aspecto y composición de la superficie celular de *E. coli* en respuesta a cambios en el estilo de vida (Majdalani y Gottesman, 2005; Whitfield, 2006).

El sistema Rcs fue originalmente descrito como un regulador del operón *cps<sub>ca</sub>*. Este sistema es único en *E. coli* y está compuesto de tres proteínas que contienen cuatro dominios de señalización. En este sistema (Figura 1.17), existe una proteína histidina quinasa (HK) denominada RcsC, que se encuentra unida a la membrana interna donde actúa como sensor. Esta proteína contiene ambos dominios H1 (dominio transmisor) y D1 (dominio receptor), que cuentan con residuos conservados de histidina y aspartato implicados en el sistema de fosforilación. La proteína RcsB es el regulador de la respuesta (RR) y contiene un dominio receptor conservado (D2). La tercera proteína, RcsD, se encuentra anclada a la membrana interna (Majdalani y Gottesman, 2005) y contiene un dominio fosfotransferasa de histidina (HPt) (Takeda, 2001; Huang *et al.*, 2006). El modelo ha sido recientemente revisado y ahora se incluye una cuarta proteína denominada RcsF, una lipoproteína de membrana externa que podría actuar como sensor. Esta proteína actúa corriente arriba del gen *rcsC*, y, aunque no se ha esclarecido completamente su función, probablemente incrementa la expresión de genes mediante el envío de señales a RcsC (Majdalani y Gottesman, 2005; Huang *et al.*, 2006).

Se han descrito una gran variedad de condiciones capaces de activar el sistema Rcs de una manera dependiente de RcsC, como por ejemplo, el crecimiento sobre superficies sólidas (Ferrieres y Clarke, 2003). También cabe destacar, debido a su

relación con la síntesis de CA, que el sistema Rcs se activa de una manera RcsC-dependiente bajo determinadas condiciones medioambientales como *shock* osmótico, desecación o una combinación de crecimiento a bajas temperaturas (20°C) y en presencia de glucosa como fuente de carbono (Ophir y Gutnick, 1995; Sledjeski y Gottesman, 1995; Hagiwara *et al.*, 2003).

Cuando RcsC capta una señal medioambiental (por ejemplo: bajas temperaturas de crecimiento), probablemente a través de RcsF, la histidina conservada del dominio H1 es fosforilada mediante un evento de autofosforilación y el grupo fosforilo es transferido al aspartato conservado del dominio D1 (Figura 1.17). A continuación, el grupo fosforilo es transferido a un residuo de histidina del dominio HPt de RcsD y



**Figura 1.17** Modelo del sistema de fosforilación-Rcs (*phosphorelay*) en *Enterobacteriaceae*. La fosforilación de RcsB está mediada por un sistema de fosforilaciones en el que participan RcsC y RcsD. RcsB-P se une al ADN y regula la expresión de cápsula. Es posible que RcsC y RcsD puedan defosforilar a RcsB. Para la regulación del *clúster cps<sub>ca</sub>* se requiere la proteína auxiliar RcsA. Figura modificada de Huang *et al.* (2006).

finalmente al dominio D2 de RcsB. En este estado de activación, la proteína RcsB fosforilada (RcsB-P) forma un homodímero que es capaz de unirse a las regiones promotoras del *clúster cps*, probablemente a través de la interacción con la ARN polimerasa, estimulando la transcripción de los genes implicados en la biosíntesis del ácido colánico (Majdalani y Gottesman, 2005).

Además de las proteínas descritas, el control de la expresión del operón *cps<sub>ca</sub>*, depende de una proteína denominada RcsA que proporciona un componente de regulación positiva independiente del sistema Rcs. La proteína RcsA posee una vida media corta debido a que es rápidamente degradada por la proteasa Lon y, por consiguiente, se encuentra normalmente a bajos niveles en la célula. Diferentes estudios sugieren que RcsA actúa como una proteína auxiliar dentro del sistema Rcs debido a que la sobreexpresión de RcsB es suficiente para activar los genes *cps* en ausencia de RcsA. Por el contrario, no existe expresión de genes *cps* en ausencia de RcsB, independientemente de los niveles de RcsA (Majdalani y Gottesman, 2005).

La presencia de RcsB-P estabiliza a RcsA, ya que ambas proteínas son capaces de formar un heterodímero que protege a RcsA de la degradación por acción de la proteasa Lon y, así, permite la consiguiente activación directa del *clúster cps<sub>ca</sub>*. Además, la formación del heterodímero facilita la unión de RcsB-P a una región promotora específica llamada caja RcsAB (distinta de donde se une RcsB como homodímero) situada corriente arriba del operón *cps*, permitiendo así la activación del promotor de *cps<sub>ca</sub>* (Huang *et al.*, 2006).

Por otra parte, el promotor del gen *rcsA* está sujeto a una regulación negativa mediada por la proteína H-NS (histone-like nucleoid structuring), probablemente a través de la unión de H-NS a una región anterior al punto de inicio de la transcripción (Sledjeski y Gottesman, 1995). Esta proteína regula la transcripción de muchos genes en respuesta a cambios medioambientales jugando, así, un papel fundamental en la adaptación a las diferentes condiciones, incluyendo la temperatura (White-Ziegler, 2009).

Otra molécula reguladora que afecta a la transcripción de *rcsA* es DsrA, un pequeño ARN no codificante. Experimentos previos han demostrado que cuando DsrA esta presente en un plásmido multicopia a bajas temperaturas, es capaz de inducir un

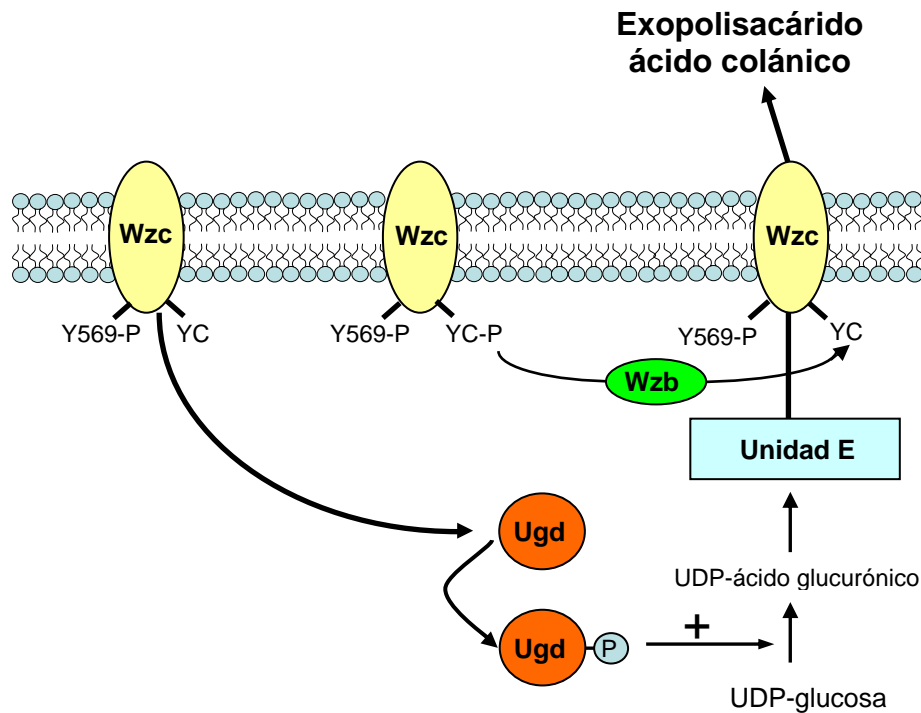
fenotipo mucoso incrementando la transcripción de *rcaA* debido a una regulación negativa sobre la síntesis de H-NS, probablemente interfiriendo sobre el ARNm que codifica para H-NS (Sledjeski y Gottesman, 1995). Al igual que el ácido colánico, DsrA es especialmente producido a bajas temperaturas, lo que podría reflejar un importante papel *in vivo* (Majdalani y Gottesman, 2005).

### 1.6.2.2 Regulación a nivel de biosíntesis. El papel de Wzc

Estudios previos han demostrado que la biosíntesis de ácido colánico en *E. coli* K-12 se encuentra regulada por la actividad de la tirosina autoquinasa Wzc, una proteína que en su extremo C-terminal contiene secuencias Walter A y B (indicativo de unión a ATP) y una región rica en tirosinas susceptibles de fosforilaciones (Collins *et al.*, 2007; Nesper *et al.*, 2003; Wugeditsch *et al.*, 2001). Se ha demostrado que para la biosíntesis del ácido colánico es necesaria la presencia de ambas formas fosforilada y no fosforilada de la proteína Wzc. Además, también es necesaria la presencia de Wzb, una proteína fosfatasa que desfosforila a Wzc (Obadia *et al.*, 2007).

Grangeasse *et al.* (2003) han propuesto un modelo que en el que Wzc regularía la producción de CA (Figura 1.18). Según estos autores, Wzc recibe una determinada señal y su actividad se potencia debido a una autofosforilación en la Tyr<sup>569</sup>, con lo que Wzc se activa y estimula una interfosforilación en su *clúster* de Tyr C-terminal. Posteriormente, Obadia *et al.* (2007) han demostrado que es necesaria la forma no fosforilada de Tyr C-terminal de Wzc para que se produzca la biosíntesis del CA, ya que cuando se encuentra en forma fosforilada, se evita la producción del polímero. Sin embargo, la forma fosforilada también es necesaria para que el tamaño del polímero generado sea adecuado (Obadia *et al.*, 2007). De esta manera, la defosforilación de Wzc por parte de Wzb controlaría la polimerización y/o transporte del CA.

A su vez, la autofosforilación en la Tyr<sup>569</sup> de Wzc estimula la fosforilación de UGD con lo que se incrementa su actividad aumentando los niveles de UDP-ácido glucurónico, uno de los cuatro precursores de la síntesis de CA (Figura 1.18) (Grangeasse *et al.*, 2003).



**Figura 1.18** Modelo esquemático propuesto para explicar el papel que juegan Wzb y Wzc en el control de la biosíntesis de ácido colánico. Figura modificada de Granjease *et al.* (2003).

Por otra parte, es muy probable que Wzc también sea capaz de fosforilar la glicosiltransferasa WcaJ (Granjease *et al.*, 2003). El gen que codifica para WcaJ es parte del operón *cps<sub>ca</sub>* (o *wca*), el cual comprende otros cuatro genes denominados *wcaA*, *wcaC*, *wcaE* y *wcaI*, los cuales también codifican para glicosiltransferasas. De esta manera, es posible que Wzc ejerza su papel regulador a través de fosforilaciones en el resto de las glicosiltransferasas que permiten la síntesis de CA (Obadia *et al.*, 2007).

Finalmente, otro aspecto a tener en cuenta para establecer la relación existente entre la fosforilación de Wzc y la síntesis de CA, concierne al posible efecto de las proteínas que interactúan con Wzc tales como Wzx, WcaD o Wza (véase apartado 1.5.2). Estas interacciones podrían jugar un papel importante en la fosforilación de Wzc (Obadia *et al.*, 2007). Así, en el caso de bacterias con cápsulas del grupo 1, se ha observado una asociación de Wza con Wzc a través de sus dominios periplásmicos (Collins *et al.*, 2007) y se cree que esta interacción mantiene a Wza en una conformación abierta que propicia la exportación de la cápsula. Por el contrario, en ausencia de Wzc, el anillo Wza está cerrado en ambas caras: periplásmica y externa

(Beis *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2006). Para que Wzc sea funcional es necesario que se encuentre fosforilada en al menos cuatro tirosinas de su extremo C-terminal, y aunque esta fosforilación no dicta la interacción con Wza, podría potencialmente modular la conformación del complejo para abrir o cerrar el canal de translocación. En este sistema, también es necesaria la proteína tirosina fosfatasa Wzb, que desfosforila Wzc y permite que se realicen los ciclos de fosforilación-desfosforilación que regulan la expresión de la cápsula (Corbett y Roberts, 2008).







**Cuando *E. coli* K92 crece a 37°C sintetiza un exopolisacárido capsular conocido como ácido polisiálico. Cuando esta bacteria crece a bajas temperaturas no se genera ácido polisiálico y sin embargo se observa un aumento en la viscosidad del medio de crecimiento, probablemente como consecuencia de la síntesis y liberación de un nuevo exopolisacárido capsular. Por este motivo nos hemos propuesto los siguientes objetivos:**

- Aislar e identificar el polímero capsular sintetizado, principalmente, cuando *E. coli* K92 crece a bajas temperaturas, y establecer las condiciones fisico-químicas que favorecen y regulan su producción.**
- Caracterizar y establecer las propiedades del polímero capsular sintetizado principalmente a bajas temperaturas y tratar de comprender su significado biológico y la interrelación existente con la síntesis de ácido polisiálico en *E. coli* K92.**
- Identificar los genes implicados en la biosíntesis y regulación del polímero capsular y analizar el efecto que la temperatura de crecimiento tiene sobre los mismos.**
- Establecer las posibles relaciones existentes entre los sistemas de termorregulación que rigen la biosíntesis de polímeros capsulares en *E. coli* K92.**



## **2. Materiales y Métodos**

---



## 2.1 Materiales

### 2.1.1 Material biológico

***Escherichia coli* K92** (Egan *et al.*, 1977)

Cepa silvestre procedente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), ATCC 35860. Produce un polisacárido de ácido siálico de Neu5Ac  $\alpha(2-8)$   $\alpha(2-9)$ .

Serotipo: O16:K92:H-

***Escherichia coli* K1** (Barry, 1957)

Cepa silvestre de la ATCC, ATCC 13027. Esta cepa fue originalmente conocida como *E. coli* K235 y produce un polisacárido de ácido siálico de Neu5Ac  $\alpha(2-8)$  conocido como ácido colomínico.

Serotipo: O7:K1

***Escherichia coli* K-12 MG1655** (Guyer, 1981)

Cepa silvestre de la ATCC, ATCC 700926.

Genotipo: F<sup>+</sup> lambda<sup>+</sup> *ilvG*<sup>-</sup> *rfb*-50 *rph*-1

Serotipo: OR:H48:K-

***Escherichia coli* DH5 $\alpha$**  (Hanahan, 1985)

Cepa empleada de manera rutinaria en los experimentos de transformación debido a su alta eficiencia.

Genotipo: F' *endA1 hsdR17*(rk,m-k) *supE44 thi*-1  $\lambda$ - *recA1 gyrA96 relA1*  $\phi$ 80*dlacZ1M15*  $\Delta$ (*lacZYA*-argF) *deoR*.

***Escherichia coli* BL21 (DE3)** (Studier *et al.*, 1990)

Cepa que contiene integrado en su cromosoma el gen que codifica para la ARN polimerasa del bacteriófago T7, el cual se encuentra bajo el control del promotor *lacUV5* inducible por IPTG. Esta cepa se utilizó para la sobreexpresión de genes en *E. coli*.

Genotipo: F<sup>-</sup> *ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>*(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)  $\lambda$ (DE3 [*lacI lacUV5*-T7 gene 1 *ind1 sam7 nin5*])

***Escherichia coli* S17-1  $\lambda$ pir** (Herrero *et al.*, 1990)

Cepa que expresa el gen *pir* a partir de una copia lisógena del fago  $\lambda$ pir, y está diseñada para la propagación de plásmidos con el origen de replicación R6K. Esta cepa tiene integradas en su cromosoma funciones RP4 (genes *tra*) de transferencia por conjugación que permiten la transferencia directa de los plásmidos a la cepa receptora sin necesidad de llevar a cabo un acoplamiento triparental con una cepa *Helper*. Esta cepa fue utilizada como donadora en el proceso de conjugación de *E. coli* K92.

Genotipo: Tp<sup>r</sup> Sm<sup>r</sup> *recA thi pro hsdR* M<sup>+</sup> RP4:2-Tc:Mu:Km Tn7 fago lisógeno  $\lambda$ pir.

***Borrelia burgdorferi* B31** (Johnson *et al.*, 1984)

Este microorganismo es una espiroqueta patógena, microaerófila, catalasa-negativa y aislada inicialmente de la garrapata *Ixodes dammini* (*I. scapularis*). Esta bacteria es causante de la borreliosis de Lyme y se utilizó en este trabajo para la infección de ratones de la cepa C3H/HeN.

**Células Caco-2**

Cepa silvestre de la ATCC, HTB-37. Estas células fueron obtenidas de adenocarcinoma de colon humano (*Human Adenocarcinoma Intestinal Epithelial Cells*) y son capaces de expresar elementos de diferenciación característicos de las células intestinales maduras, como los enterocitos. En este trabajo, se han utilizado para el estudio *in vitro* de la adhesión de *E. coli* K92.

En este trabajo, también hemos utilizado ratones de la cepa C3H/HeN para la infección con *Borrelia burgdorferi* y conejos blancos para la obtención de anticuerpos.

**2.1.1.1 Condiciones de crecimiento**

De manera general, el crecimiento de las bacterias en medio sólido se realizó en placas de Petri o tubos inclinados (*slant*) a 37°C en medio LB, salvo que el microorganismo o experimento requiera de algún tipo de modificación, en cuyo caso será indicado en cada momento.



Igualmente y de manera habitual, los cultivos en medio líquido se realizaron en medio LB utilizando matraces Erlenmeyer de 250ml que contienen 62,5 ml de medio y con una agitación orbital de 250 rpm. Para el desarrollo de estos cultivos se partió de tubos inclinados crecidos en las condiciones descritas anteriormente. Las células fueron resuspendidas en agua destilada estéril ajustando la suspensión a una DO=1 a una longitud de onda de 540nm medido en un espectrofotómetro Beckman DU640. De la suspensión obtenida se inoculó 1 ml por cada 62,5 ml de medio de cultivo.

El crecimiento de las bacterias se determinó midiendo la turbidez de los cultivos a una longitud de onda de 540nm.

### 2.1.1.2 Mantenimiento de las cepas

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo han sido conservadas mediante siembras periódicas cada 15 días en placas de Petri de LB con agar y los aditivos necesarios en cada caso. Las placas de Petri se mantuvieron selladas con *Parafilm* a 4°C durante 1 mes como máximo. La conservación de los microorganismos a más largo plazo se realizó mediante congelación de alícuotas de 1 ml a -80°C en suspensiones con una concentración final de 20% (v/v) en glicerol.

### 2.1.2 Vectores

#### **pUC18** (Norrander *et al.*, 1983)

Vector de clonación que contiene el replicón pMB1, un gen de resistencia a ampicilina y el péptido  $\alpha$  de la proteína LacZ.

#### **pGEM-T Easy** (Promega)

Vector que contiene el origen de replicación ColE1 de *E. coli* y un gen de resistencia a ampicilina. Permite la clonación directa de fragmentos de ADN obtenidos por PCR utilizando la Taq polimerasa.

#### **pET-42a(+)** (Novagen)

Vector que contiene el origen de replicación ColE1 de *E. coli* y un gen de resistencia a kanamicina. Permite fusionar secuencias que codifican para varias histidinas y para la proteína GST en los extremos 5' o 3' de un determinado producto génico.

**pDS132** (Philippe *et al.*, 2004)

Vector que contiene el origen de replicación R6K y solamente es capaz de replicarse en cepas de *E. coli* que expresen la proteína Pir. También tiene integrado el origen de transferencia del plásmido conjugativo RP4, un gen de resistencia a kanamicina y el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*.

**2.1.3 Ácidos nucleicos**

Como marcadores de peso molecular en los geles de electroforesis se han utilizado el ADN del bacteriófago  $\lambda$  digerido con la endonucleasa *HindIII* y el marcador *1KB Plus DNA ladder*, ambos adquiridos de la casa comercial Invitrogen.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron adquiridos de Roche y se detallan en el anexo I.

**2.1.4 Medios de cultivo**

**Medio LB (Luria-Bertani)** (Miller, 1972). Medio de cultivo utilizado para el crecimiento *E. coli*.

Bacto-triptona	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
H <sub>2</sub> O destilada hasta	1 l

Se ajustó el pH a 7,5 con NaOH y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos. Para preparar medio sólido (**Medio LA**) se añadió un 2% de agar y se esterilizó igualmente.

**Medio TSB (Tryptone Soy Broth)** (Maniatis *et al.*, 1982). Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli*.

Peptona de caseína	16,0 g
Peptona de soja	3,0 g
NaCl	6,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
Glucosa	2,5 g
H <sub>2</sub> O destilada hasta	1 l

Se ajustó el pH a 7 con NaOH y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos. Para preparar medio sólido (**Medio TSA**) se añadió un 2% de agar y se esterilizó igualmente.

**Medio SOC** (Hananah, 1983). Medio de cultivo para la electroporación de *E. coli*.

Bacto-triptona	20,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
NaCl	0,5 g
KCl 250 mM	10 ml
H <sub>2</sub> O destilada hasta	1 l

Se ajustó el pH a 7 con NaOH 0,5 M y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos. Se dejó enfriar y se añadieron 10 ml de Mg Cl<sub>2</sub> 1 M (esterilizado mediante autoclave) y 10 ml de solución de glucosa 2 M previamente esterilizada a través de un filtro estéril de 0,22 µm de diámetro de poro.

**Medio φ-Broth** (Hananah, 1983). Medio de cultivo utilizado en la obtención de células competentes por el método del cloruro de rubidio.

Bactotriptona	20,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
KCl	7,5 g
MgSO <sub>4</sub>	4,0 g
H <sub>2</sub> O destilada hasta	1 l

Se ajustó el pH a 7,6 con KOH y se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos.

**Medio mínimo (MM)** (Rodríguez-Aparicio, 1987). Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli*.

Tampón	160 ml
Sales (10x)	100 ml
Xilosa 60%(fuente de carbono)	14 ml
Aspargina (fuente de nitrógeno)	11,3 g
H <sub>2</sub> O destilada	726 ml

Se disolvió la fuente de nitrógeno en agua y se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos, y posteriormente se añadieron el resto de componentes previamente esterilizados del mismo modo. Para su utilización como medio sólido se añadió un 2% de agar.

Cuando se necesitó cambiar la fuente de carbono y/o nitrógeno siempre se mantuvo constante la proporción del número de átomos de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo. Otros medios mínimos que se prepararon fueron: Xil-Asn, Glc-Pro, Glc-Asn, Glc-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, GlcN-Asn, GlcN-Pro, GlcN-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Mal-Asn, Lac-Asn, Gal-Asn, Gly-Asn, y Fru-Asn.

La composición de las sales (10x) es:

NaCl	10,0 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,0 g
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,2 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01 g
H <sub>2</sub> O destilada	1 l

Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos.

La composición del tampón es de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 M) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5 M) a pH 8. La solución se esterilizó en autoclave durante 15 minutos.

### 2.1.5 Aditivos de los medios de cultivo

En determinados experimentos, los medios de cultivo fueron suplementados con diferentes aditivos siguiendo normalmente las recomendaciones de Sambrock *et al.* (1989). En el caso de los antibióticos, todos fueron adquiridos a la casa comercial Sigma.

Ampicilina (Ap). Se preparó una solución de 200 mg/ml en agua y se utilizó a una concentración final de 100 µg/ml.

Cloranfenicol (Cm). Se preparó una solución de 60 mg/ml en etanol y se utilizó a una concentración final de 30  $\mu\text{g/ml}$ .

Kanamicina (Km). Se preparó una solución de 25 mg/ml en agua y se utilizó a una concentración final de 25  $\mu\text{g/ml}$  en medio líquido y 12,5  $\mu\text{g/ml}$  en medio sólido.

Rifampicina (Rf). Se preparó una solución de 20 mg/ml en metanol y se utilizó a una concentración final de 20  $\mu\text{g/ml}$  en medio líquido y 5  $\mu\text{g/ml}$  en medio sólido.

Para la inducción de los sistemas basados en promotores del tipo *lacI*, que reconocen la lactosa como inductor, se utilizó un análogo no metabolizable del inductor natural: el Isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG). Se preparó una solución 100mM en agua y se utilizó a una concentración final de 0,05 mM. El IPTG fue adquirido a la casa comercial USB.

Cuando se utilizaron vectores en los que la presencia del péptido  $\alpha$  de la proteína LacZ permitía una selección blanco-azul, se añadió al medio de cultivo 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal). Se preparó una solución de 20 mg/ml en dimetilformamida y se utilizó a una concentración final de 40  $\mu\text{g/ml}$ . El X-Gal fue adquirido a la casa comercial USB.

Las soluciones stock de los aditivos disueltos en agua se esterilizaron con filtros estériles Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, mientras que las disueltas en metanol, etanol o diformamida no fueron esterilizadas.

El resto de los reactivos empleados en el presente trabajo fueron de calidad analítica.

## 2.2 Métodos empleados para la purificación y el análisis de glúcidos

### 2.2.1 Cuantificación del ácido colánico (CA) y del ácido polisialico (PA)

La cuantificación de la producción de ambos polisacáridos capsulares se realizó sobre caldos de cultivo obtenidos tras el crecimiento de las diferentes cepas bacterianas en medios de cultivo líquido. El crecimiento en medio líquido de las cepas utilizadas en este trabajo permite la liberación de sus estructuras capsulares al medio y su posterior cuantificación (González-Clemente *et al.*, 1989; Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1988b).

Para la obtención de los caldos de cultivo, los cultivos celulares fueron incubados a diferentes temperaturas con agitación orbital de 250 rpm durante el tiempo necesario en cada caso. Las células se eliminaron mediante centrifugación a 15000 rpm durante 20 minutos, con la excepción de los cultivos de cepas bacterianas productoras de ácido colánico incubadas a 19°C, en los que fue necesario centrifugar a 20000 rpm durante 45 minutos debido a la enorme viscosidad de los cultivos bacterianos.

Los caldos de cultivo libres de células fueron dializados utilizando membranas Medicell LTD con un tamaño de poro de 10 KDa (Sigma) frente a 1000 volúmenes de agua destilada a 4°C durante 24 horas. Diferentes diluciones de los caldos de cultivos fueron tomados para la cuantificación de CA y PA.

Para la cuantificación de CA se utilizó el método del orcinol (Mejbaum, 1939), un método colorimétrico que detecta la cantidad de ácidos urónicos contenidos en la muestra. De esta manera, a 1 ml de muestra conteniendo entre 0,02-0,15  $\mu$ moles de ácidos urónicos se le añadieron 3 ml de reactivo de orcinol y se calentó a 100°C durante 40 minutos en un termoblot. Transcurrido este tiempo, se enfrió la mezcla en hielo y se midió la absorbancia a 660nm. Este método nos permite cuantificar la cantidad de ácido glucurónico que existe en la muestra, el cual es uno de los constituyentes básicos del ácido colánico (Garegg *et al.*, 1971). En todos los experimentos se utilizó ácido glucurónico comercial (Sigma) a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu$ g/ml) para elaborar la recta patrón.

Para la cuantificación de PA contenido en los caldos de cultivo dializados se utilizó el método del resorcinol (Svennerholm, 1958). A 1 ml de muestra se le añadió 1 ml de solución de resorcinol previamente preparada y la mezcla se incubó a 100°C durante 15 minutos en tubos de vidrio. Transcurrido este tiempo, los tubos fueron enfriados en hielo y se añadieron 1,5 ml de acetato de butilo:butanol (85:15 v/v). Las muestras fueron agitadas con vortex hasta extraer bien el color y se midió su absorbancia a 580nm. En todos los experimentos se utilizó ácido siálico comercial (Sigma) a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/ml) para elaborar la recta patrón.

---

**Reactivo de orcinol.** Se disuelven 400 mg de orcinol (Sigma) en 155 ml de HCl y se añaden 10 ml de FeCl<sub>3</sub> disuelto previamente en HCl 0,01 M.

**Solución de resorcinol.** Se disuelven 0,2 g de resorcinol (Sigma) en 10 ml de agua milliQ y se añaden 0,25 ml de CuSO<sub>4</sub> 0,1 M y 80 ml de HCl. Finalmente, se ajusta el volumen a 100 ml con agua milliQ.

### 2.2.2 Cuantificación de azúcares totales

Para cuantificar la cantidad de azúcares totales contenidos en los caldos de cultivo obtenidos (véase apartado anterior) se empleó el método del Fenol-Sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). A 2 ml de la muestra se le añadieron 0,05 ml de solución acuosa de fenol al 80% (p/v) y rápidamente 5 ml de ácido sulfúrico al 95% (v/v). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego en un baño a 30°C durante 20 minutos. La absorbancia del color desarrollado se midió a 490nm. En todos los experimentos se utilizó glucosa comercial (Sigma) a diferentes concentraciones (25, 50, 75, 100, 125 y 150 µg/ml) para elaborar la recta patrón.

### 2.2.3 Purificación del polímero capsular de ácido colánico

La purificación del CA se llevó a cabo sobre caldos de cultivo obtenidos tras el crecimiento de *E. coli* K92 a 19°C y con agitación a 250 rpm durante 140 horas de crecimiento. El medio empleado fue un medio mínimo glucosa y prolina (MM Glc-Pro) como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, debido a que en este medio de cultivo se obtienen los mayores valores de producción de CA (véase Resultados y Discusión).

Se siguió el método descrito por Cescutti *et al.* (1996) aunque con algunas modificaciones que detallaremos a continuación:

1- Una vez obtenidos, los caldos de cultivo libres de células (véase apartado 2.2.1) se liofilizaron. El líofilo resultante se resuspendió en agua a una concentración de 100µg/ml. Con el fin de precipitar el ADN bacteriano se añadió sulfato de estreptomicina al 0,75% (p/v) y se mantuvo a 4°C y agitación durante 15 minutos. La muestra se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante.

2- La muestra libre de ADN se trató con ácido acético glacial al 1% (v/v) a 100°C durante 2 horas. La hidrólisis suave del LPS con ácido acético permite la ruptura del enlace entre la glucosamina del lípido A y el KDO del núcleo, liberándose así la fracción polisacáridica del LPS. Posteriormente, se centrifugó a 15000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

3- El sobrenadante obtenido fue sometido a una extracción con el mismo volumen de una solución de cloroformo:metanol (2:1) para la eliminación de proteínas. Se recogió la fase acuosa (fase superior), se dializó y se liofilizó.

4- El líofilo resultante fue resuspendido en agua destilada hasta una concentración de 100 µg/ml y se cuantificó la composición de ácidos nucleicos, proteínas, azúcares totales, ácidos siálicos y ácidos urónicos.

### **2.2.3.1 Método de purificación de ácido colánico empleado para el análisis mediante RMN**

Debido a que el método anteriormente descrito para la purificación del ácido colánico no nos permitió obtener unos buenos resultados a la hora de analizar el producto purificado mediante resonancia magnética nuclear (RMN), fue necesaria la elaboración de otro método para conseguir una mejor elucidación de la estructura del ácido colánico mediante RMN.

El protocolo utilizado fue tomado de Freitas *et al.* (2009) con ligeras modificaciones que detallamos a continuación:

1- El caldo de cultivo dializado fue diluido con agua desionizada para reducir la viscosidad y centrifugado a 20000 rpm durante 45 minutos.



2- El sobrenadante fue sometido a una desnaturalización de las proteínas mediante la adición de ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 10% (v/v) durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 20000 rpm durante 1 hora y se recogió el sobrenadante.

3- Para conseguir precipitar el polímero, se añadió etanol absoluto frío al sobrenadante obtenido (1:3 v/v) y se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos. El precipitado obtenido fue lavado con etanol absoluto, redissuelto en agua deionizada y liofilizado.

4- Al igual que en el caso anterior, el líofilo resultante fue resuspendido en agua destilada hasta una concentración de 100 µg/ml y se cuantificó la composición de ácidos nucleicos, proteínas, azúcares totales, ácidos siálicos y ácidos urónicos.

#### **2.2.4 Purificación del LPS de *E. coli* K92**

Para la purificación del LPS de *E. coli* K92 se ha seguido básicamente el método descrito por Whestphal *et al.* (1952). Las células crecidas en MM Glc-Pro a 19°C y 37°C y 250 rpm hasta  $A_{540nm}=1,5$  se recogieron por centrifugación a 15000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El precipitado celular se lavó 2 veces con tampón fosfato salino (PBS) y 1 vez con agua, y se resuspendió en agua destilada hasta  $A_{540nm}=30$ . Las células se mezclaron con el mismo volumen de una solución de fenol:agua (1:1) y se mantuvieron a 65°C durante 30 minutos. El lisado celular se dejó reposar a 4°C durante 1 hora tras lo cual se centrifugó a 5000 rpm a 4°C durante 20 minutos. Se recogió la fase superior que fue dializada extensivamente frente a agua destilada y finalmente liofilizada.

#### **2.2.5 Análisis mediante espectroscopia infrarrojos (FT-IR) del ácido colánico**

Una vez purificado el CA (ver apartado 2.2.3) se procedió a su análisis mediante espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR), una técnica que permite la detección de señales muy débiles o muestras que se encuentran a bajas concentraciones. Para la preparación de la muestra, se añadieron 200 mg de bromuro potásico a 1 mg de ácido colánico purificado, y se hicieron pastillas en una prensa hidráulica aplicando 8 toneladas de presión durante 10 minutos. Las pastillas resultantes

se analizaron mediante un espectrómetro de infrarrojos equipo System 2000 FT-IR de Perkin Elmer (MA, USA) que midió en un rango MIR entre  $4500\text{ cm}^{-1}$  y  $450\text{ cm}^{-1}$ .

### **2.2.6 Análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) del ácido colánico**

Esta técnica fue empleada para analizar la composición glucídica de la muestra de ácido colánico purificado. La preparación de la muestra consta de dos pasos: obtención de alditoles de los azúcares y su posterior acetilación. Básicamente se siguió el protocolo descrito por Sasaki *et al.* (2005) aunque fueron necesarios varios cambios para optimizar los resultados.

Para la obtención de los alditoles de los azúcares, el ácido colánico purificado fue sometido a una hidrólisis ácida para muestras con azúcares neutros. 750  $\mu\text{g}$  de ácido colánico purificado fueron tratados con 750  $\mu\text{l}$  de ácido trifluoroacético (TFA) 2M y la mezcla se incubó a  $121^\circ\text{C}$  durante 2 horas. A continuación el TFA fue evaporado por secado bajo corriente de  $\text{N}_2$  a temperatura ambiente y las trazas restantes se eliminaron mediante 2 lavados con 500  $\mu\text{l}$  de 2-propanol. Las muestras hidrolizadas y secas se disolvieron en 500  $\mu\text{l}$  de hidróxido amónico 1M conteniendo borohidruro sódico (10mg/ml) y fueron posteriormente incubadas a temperatura ambiente durante 2-18 horas. Para la eliminación del exceso de borato se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de ácido acético glacial y se evaporó a temperatura ambiente con corriente de  $\text{N}_2$ . A continuación, se pasaron las muestras previamente disueltas en 500  $\mu\text{l}$  de agua por una columna catiónica DOWEX 50H<sup>+</sup> (Amersham) a pH=6 para eliminar el exceso de sodio. Al eluido recogido se le añadieron 750  $\mu\text{l}$  de metanol:acético (9:1 v/v) y se evaporó con corriente de  $\text{N}_2$ . Éste último paso se realizó tres veces.

Una vez obtenidos los alditoles de los azúcares, se procedió a la acetilación de los mismos mediante la adición de 0,1 ml de anhídrido acético y 0,1 ml de piridina. La mezcla resultante se incubó en estufa a  $121^\circ\text{C}$  durante 20 minutos y se secó por corriente de  $\text{N}_2$ , añadiéndose entre 50 y 100  $\mu\text{l}$  de tolueno antes de la evaporación para facilitar la eliminación de los reactivos. El residuo seco resultante se disolvió en 0,5 ml de cloroformo, se añadieron 0,5 ml de agua y tras una agitación en vórtex se centrifugó a 3000 rpm durante 2 minutos. La fase orgánica fue transferida a otros tubos con una

pipeta Pasteur y disuelta en 100  $\mu\text{l}$  de acetona, dejando la muestra preparada para el análisis en el espectrómetro de gases-masas.

Este mismo método fue empleado para los compuestos constitutivos del ácido colánico: fucosa, glucosa, galactosa y ácido glucurónico (adquiridos de Sigma), que se emplearon como estándares.

Aproximadamente 1  $\mu\text{l}$  de muestra se inyectó en el cromatógrafo Variant CP-3800 Gas Chromatography Saturn 220 Mass Chromatography, que dispone de una columna capilar Variant VF-5ms 30m 0,25mm 0,25 $\mu\text{m}$ . El autoinyector utilizado es el CP 8400 y el software es el Variant MSW Workstation V6 3.0.

### 2.2.7 Análisis mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Se empleó la técnica de RMN para determinar la estructura del CA purificado. Las muestras se prepararon disolviendo 1.8 mg del polímero purificado en 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  y se transfirieron a un rotor de HR-MAS. Los espectros se adquirieron a 298.2 K con rotación en el ángulo mágico a una velocidad de rotación de 4000 Hz. Los espectros de RMN se adquirieron en un espectrómetro Bruker Avance-III de 500 MHz de frecuencia de protón equipado con una sonda HR-MAS de  $^1\text{H}/^{31}\text{P}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$  con gradiente en el ángulo mágico. El procesado y análisis de los espectros se realizó mediante software MestreC v.3.9 (*Mestrelab Inc*).

Se adquirieron los experimentos 1D de protón, 2D-HSQC, 2D-DQF-COSY, 2D-TOCSY, y 2D-NOESY. El experimento 2D HSQC se adquirió utilizando la versión del experimento con pulsos de reenfoque de  $^{13}\text{C}$  180° adiabáticos que mejora la sensibilidad. Se utilizaron pulsos adiabáticos de  $^{13}\text{C}$  de tipo CHIRP de 500  $\mu\text{s}$  y 60 kHz y CHIRP compuesto de 2 ms y 60 kHz para inversión y reenfoque, respectivamente. El experimento 2D-TOCSY se adquirió con un período de mezcla de confinamiento de espines tipo XM16 que utiliza pulsos adiabáticos sincronizados con la velocidad del rotor (*rotor-synchronized adiabatic TOCSY*) (Peti *et al.*, 2000; Zektzer *et al.*, 2004). Los pulsos adiabáticos aplicados durante los 100 ms del periodo de mezcla isotrópica fueron de tipo WURST-8 de 444  $\mu\text{s}$  de duración, campo 6500 Hz y se sincronizaron con la velocidad del rotor a 1/velocidad de rotación.

### 2.2.8 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Las electroforesis desnaturalizantes en presencia de SDS (SDS-PAGE) se llevaron a cabo según el método descrito por Laemmli (1970). Este sistema utiliza dos tipos de geles de poliacrilamida que difieren en su porosidad, pH y fuerza iónica. En la parte superior se sitúa el gel concentrador, y en la parte inferior, el gel separador. La discontinuidad en los geles permite la reducción del volumen de las muestras incorporadas al gel concentrador, a la vez que favorece la resolución de las bandas según su tamaño molecular en el gel separador.

Como marcadores electroforéticos se utilizó un conjunto de patrones compuesto por: fosforilasa b (PM 94 kDa), albúmina sérica bovina (PM 67 kDa), ovoalbúmina (PM 43 kDa) y anhidrasa carbónica (PM 30 kDa), inhibidor de la tripsina de soja (PM 20,1 kDa) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (PM 14,4 kDa) suministrados por la casa comercial Bio-rad. Como indicador de la distancia recorrida por el frente se empleó azul de bromofenol.

Para la realización de la electroforesis se realizó el siguiente protocolo:

1- En primer lugar, se montaron los soportes para la elaboración de los geles utilizando el sistema Mini Protean II (Bio-Rad) para geles de 7 x 8 cm.

2- A continuación, se preparó la mezcla de la que se compone el gel separador. Los últimos que se añadieron son el persulfato amónico y del TEMED (tetrametiletildiamina) como catalizadores de la reacción. Se mezclaron todos los componentes y se depositó la solución entre los cristales de la cubeta hasta alcanzar la altura deseada. En este momento, se cubrió la solución del gel con butanol para asegurarse una polimerización horizontal y se dejó polimerizar durante 30-45 minutos.

Componentes	Concentración de acrilamida	
	10%	12%
Solución Acrilamida/Bis-acrilamida 1	1920 $\mu$ l	2310 $\mu$ l
Tris-HCl 3M pH 8,8	730 $\mu$ l	730 $\mu$ l
SDS 10%	58,5 $\mu$ l	58,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O MilliQ	3100 $\mu$ l	2710 $\mu$ l
Persulfato amónico 20%	29,25 $\mu$ l	29,25 $\mu$ l

TEMED	1,9 $\mu$ l	1,9 $\mu$ l
-------	-------------	-------------

3- Mientras polimeriza el gel separador, se va preparando el gel concentrador del mismo modo que el anterior, dejando para el final la adición de persulfato amónico y TEMED.

Solución Acrilamida/Bis-acrilamida 2	625 $\mu$ l
Tris-HCl 3M pH 8,8	500 $\mu$ l
SDS 10%	20,75 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O MilliQ	927 $\mu$ l
Persulfato amónico 10%	12,5 $\mu$ l
TEMED	2,5 $\mu$ l

4- Una vez polimerizado el gel concentrador, se eliminó el butanol y se secó con papel de filtro. A continuación se añadió el gel separador y se colocó un peine entre los dos cristales para formar los pocillos (donde se cargan las muestras) y se dejó polimerizar durante 15 minutos.

5- La muestra problema se diluyó en relación 1:1 con la solución de ebullición y se hivió la mezcla durante 5 minutos.

6- Se montó la cubeta de electroforesis, se llenó con tampón de electroforesis y se cargaron las muestras en los pocillos.

7- Finalmente, se conectaron los electrodos a una fuente de corriente continua a 200 V y dejó que se desarrolle la electroforesis hasta que la banda de azul de bromofenol de la solución de ebullición comenzó a salir del gel.

---

**Solución Acrilamida/Bis-acrilamida 1.** 30 g de acrilamida y 0,8 g de bis-acrilamida en 100 ml de agua milliQ. Se filtra antes de usar.

**Solución Acrilamida/Bis-acrilamida 2.** 2 g de acrilamida y 0,1 g de bis-acrilamida en 20 ml de agua milliQ. Se filtra antes de usar.

**Solución de ebullición.** 96,25  $\mu$ l de solución saturante de sacarosa (o agua); 93,75  $\mu$ l de Tris-HCl 0,5M pH 6,8; 10  $\mu$ l de azul de bromofenol 1%; 50  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol; 250  $\mu$ l de SDS 10%.

**Tampón de electroforesis.** Tris 3g/l; glicina 14,4 g/l; SDS 1 g/l; se ajusta a pH 8,8 con HCl.

## 2.2.9 Tinción de geles SDS-PAGE (tinción con plata)

Se utilizó la tinción con plata para detectar la presencia de estructuras glicosiladas en las muestras de CA parcial o totalmente purificado.

Básicamente se siguió la metodología descrita por Tsai y Frasch (1982) aunque con algunas modificaciones que detallamos a continuación:

1- Fijación: se incubó el gel en solución de fijación durante 30 minutos.

2- Sensibilización: se sumergió el gel en solución de sensibilización durante 30 minutos, tras los cuales se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con agua destilada.

3- Tinción: se incubó el gel en la solución de tinción durante 20 minutos y a continuación se realizaron 2 lavados de 1 minutos cada uno con agua destilada.

4- Revelado: se sumergió el gel en solución de revelado entre 2-5 minutos y se detuvo la reacción con solución de parada durante 10 minutos. Finalmente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con agua destilada.

---

**Solución de fijación.** 100 ml de etanol; 25 ml de ácido acético glacial; agua milliQ hasta 250 ml.

**Solución de sensibilización.** 75 ml de etanol; 10 ml de tiosulfato sódico (5% p/v); 17 g de acetato sódico; agua milliQ hasta 250 ml.

**Solución de tinción.** 25 ml de solución de nitrato de plata (2,5% p/v); agua milliQ hasta 250 ml.

**Solución de revelado.** 6,25 g de carbonato sódico; 100 µl de formaldehído (37% p/v); agua milliQ hasta 250 ml.

**Solución de parada.** 3,65 g de EDTA- $\text{Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; agua milliQ hasta 250 ml.

### 2.2.10 Transferencia a membrana de nitrocelulosa de carbohidratos

Básicamente se siguió el protocolo descrito por Towbin *et al.* (1992) descrito para la transferencia de proteínas desde un gel de poliacrilamida a un soporte sólido y este proceso se conoce con el nombre de *Western-blot*. Cuando fue necesario, se depositó la muestra problema directamente sobre la membrana de nitrocelulosa previamente equilibrada y seca, método que se conoce como *Dot-blot*.

El protocolo para el *Western-blot* fue el siguiente:

1- Una vez realizado el desarrollo electroforético, el gel de poliacrilamida se incubó durante 5 minutos en solución de transferencia a temperatura ambiente. Durante este tiempo se cortaron 4 hojas de papel *Whatman* 3MM y una hoja de nitrocelulosa

(*Supported Nitrocellulose Membrane*, Bio-rad) del mismo tamaño que el gel de acrilamida y se equilibran en solución de transferencia.

2- La transferencia se llevó a cabo en un equipo *Mini Trans Blot* (Bio-rad). Sobre el ánodo se colocaron 2 láminas de papel *Whatmann*. A continuación se colocó la membrana de nitrocelulosa y, sobre esta, el gel de poliacrilamida. Finalmente, otras dos láminas de papel *Whatmann* se situaron sobre el gel para finalizar el sandwich.

3- A continuación, se colocó la tapa del *transblot* y se conectó a una fuente de alimentación a 15 V durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se desmontó el sandwich y la membrana de nitrocelulosa continuará el proceso de inmunodetección.

---

**Solución de transferencia.** 605 mg de Tris; 2,88 g de glicina; 40 ml de metanol; 160 ml de agua milliQ. Se ajusta a pH 7,5.

**Solución rojo ponceau.** 0,1% de rojo ponceau y 5% de ácido acético en agua milliQ.

### 2.2.11 Inmunodetección

Este protocolo fue utilizado para la inmunodetección del LPS en las muestras de ácido colánico parcial o totalmente purificado previamente transferido a membranas de nitrocelulosa. La detección se llevó a cabo mediante el empleo de anticuerpos específicos para estas moléculas siguiendo el protocolo descrito por Rodríguez-Aparicio *et al.* (1993).

Para la realización del procedimiento se utilizó el *Immun-Blot® Assay Procedure* (Bio-rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

1- Una vez realizada la transferencia a la membrana de nitrocelulosa, ésta se sumergió en solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente (alternativamente se puede incubar a 4°C toda la noche). Transcurrido este tiempo, se realizó un lavado de 10 minutos con agitación suave en tampón TTBS.

2- A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido con solución de anticuerpo (el título del anticuerpo dependerá del experimento en cuestión) y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Posteriormente se efectuaron dos lavados en TTBS durante 5 minutos para eliminar el exceso de anticuerpos.

3- Una vez realizados los lavados, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (anti-inmunoglobulinas G de conejo, Bio-rad) diluido 1:3000 con solución

de anticuerpo durante 1 hora. Se realizaron dos lavados con tampón TTBS de 5 minutos cada uno para eliminar el exceso de anticuerpo, y un lavado adicional con TBS durante 5 minutos para eliminar el Tween20 de la superficie de la membrana.

4- Finalmente, se procedió al revelado mediante localización de la actividad de la enzima peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario. Para ello, la membrana se mantuvo en solución de revelado durante 15-30 minutos en oscuridad y con agitación suave. Una vez visualizada la formación del complejo antígeno-anticuerpo, el revelado se detuvo por inmersión de la membrana durante 10 minutos en agua destilada. Finalmente, la membrana se guardó protegiéndola de la luz para evitar su deterioro.

---

**Solución de bloqueo.** TBS con gelatina al 3%.

**TBS (5X).** 2,45 g de Tris; 29,22 g de NaCl; 200 ml de H<sub>2</sub>O; se ajusta a pH 7,5.

**TTBS.** TBS con 0,05% de Tween 20.

**Solución de anticuerpo.** TTBS con 1% de gelatina.

**Solución de revelado.** 30 ml de TBS; 18 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 18 de HCl-4-naftol; 6 ml de metanol. Se prepara inmediatamente antes de ser usado.

## 2.2.12 Estudio de la capacidad inmunogénica del ácido colánico

El CA previamente purificado fue utilizado para inmunizar conejos blancos de entre 1,5 y 2 Kg de peso siguiendo el método descrito por Rodríguez-Aparicio *et al.* (1993).

Se inocularon 3 conejos con 100 µg, 50 µg y 10 µg respectivamente de ácido colánico purificado de *E. coli* K92. El polisacárido, disuelto en 1,5 ml de agua destilada estéril, se emulsionó con 2,5 volúmenes de adyuvante completo de Freund (Sigma). Se efectuaron dos pinchazos intramusculares de 1 ml y cuatro pinchazos subcutáneos de 0,5 ml cada uno. La siguiente dosis fue administrada un mes después de la primera en las mismas condiciones, pero utilizando, en este caso, adyuvante incompleto de Freund. Como control se utilizó un conejo en el que las inyecciones contenían el adyuvante y agua, pero no CA. Cada mes (durante tres meses) y antes de la administración de una nueva dosis, se hicieron extracciones de sangre de la vena marginal de la oreja de los conejos con el fin de detectar la presencia de anticuerpos frente al CA. La sangre se recogió 15 días después de la tercera inyección y los sueros resultantes se titularon por



*Dot-Blot* y se guardaron en alícuotas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.13 Estudio de la capacidad protectora del ácido colánico frente al estrés osmótico y oxidativo**

Para estudiar el posible papel que ambos CA y PA puedan tener sobre la viabilidad de la bacteria bajo condiciones estresantes, se desarrollaron cultivos de *E. coli* K92 a  $37^{\circ}\text{C}$  y  $19^{\circ}\text{C}$  en medio LA durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en PBS suavemente para evitar el desprendimiento de la cápsula y utilizadas para inocular tubos de cristal conteniendo MM con Glc (sin fuente de nitrógeno para evitar el crecimiento celular) con diferentes concentraciones del compuesto utilizado como agente agresor externo

Del mismo modo, para estudiar el papel que el CA juega sobre la viabilidad de la bacteria bajo condiciones estresantes de crecimiento, se establecieron cultivos de *E. coli* K92 (cepa productora de CA) y *E. coli* K92 $\Delta$ *rcaA* (cepa deficiente en la producción de CA debido a una delección en el gen *rcaA*) en MM Glc-Pro con agar a  $19^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. El empleo de este MM favorece la producción de CA (véase Resultados y Discusión) en *E. coli* K92 originando un fenotipo mucoso claramente visible. Tras este tiempo, ambos tipos de células fueron resuspendidas en PBS suavemente para evitar el desprendimiento de la cápsula y utilizadas para inocular tubos de cristal conteniendo MM (sin fuente de nitrógeno para evitar el crecimiento bacteriano) con diferentes concentraciones del compuesto utilizado como agente agresor externo.

En este trabajo se evaluó la viabilidad de las bacterias frente a estrés osmótico y oxidativo causado por diferentes concentraciones de NaCl (0,5, 5 y 10 mM) y de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2,5, 5 y 10 mM) respectivamente. Los inóculos permanecieron a temperatura ambiente durante el tiempo necesario hasta completar el estudio.

Para evaluar el impacto del agente agresor sobre la viabilidad de la bacteria, periódicamente se realizaron recuentos de células utilizando el método miniaturizado denominado “siembra de gotas en superficie” siguiendo las instrucciones de la *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF, 1981). El método consiste en hacer diluciones de la solución bacteriana cuya concentración de células se quiere evaluar y se depositan dos gotas de 20  $\mu\text{l}$  cada una de cada dilución sobre placas de LA. A continuación, se dejan secar las gotas y se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$

durante 12-16 horas. Una vez crecidas las bacterias se procede al recuento de UFC (Unidades Formadoras de Colonia).

### **2.2.14 Estudio de la influencia del ácido colánico sobre la capacidad de adhesión de *E. coli* K92**

Para comprobar la implicación del CA en la adhesión de las bacterias a determinadas superficies, se han estudiado las diferencias que existen entre *E. coli* K92 silvestre y *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA* en cuanto a su adhesión a determinadas sustratos inertes y comprobar cómo ésta puede verse afectada por el empleo de varios medios de cultivo suplementados con diferentes aditivos. Por otra parte, también se estudiaron las posibles diferencias en adhesión entre *E. coli* K92 sintetizando PA a 37°C o CA a 19°C.

#### **2.2.14.1 Adhesión a placas de poliestireno de 24 pocillos**

Este método, descrito por Vianney *et al.* (2005), fue inicialmente empleado para establecer las posibles diferencias de adhesión entre *E. coli* K92 crecida a 37°C (síntesis de PA) y a 19°C (síntesis de CA). Se cultivó esta cepa en tubos con LA a 37°C y 19°C durante 24 horas. Posteriormente, las células se resuspendieron cuidadosamente en LB y se utilizaron para inocular placas de poliestireno de 24 pocillos (IWAKI) conteniendo un volumen máximo de 2 ml. Para permitir la adhesión, se incubaron las bacterias a temperatura ambiente durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, se recogió el sobrenadante para cuantificar las células no adheridas (células planctónicas). Por otra parte, las células adheridas se recogieron en 1 ml de LB mediante escrapeo y pipeteo. Para determinar el porcentaje de adherencia, las biomasas de las células planctónicas y de las células adheridas se estimaron por medida de sus respectivas densidades ópticas a 600 nm.

#### **2.2.14.2 Adhesión a placas de poliestireno de 96 pocillos**

El protocolo seguido para estudiar la adhesión de ambas cepas se detalla a continuación:

- 1- En primer lugar, ambas cepas fueron cultivadas en placas de MM Glc-Pro con agar durante aproximadamente 48 horas a 19°C.
- 2- Transcurrido este tiempo, los cultivos obtenidos se resuspendieron en 5 ml del

mismo MM sin agar. Las suspensiones celulares obtenidas se utilizaron para inocular tubos estériles conteniendo 5 ml de cada uno de los diferentes medios de cultivo y aditivos estudiados y se mantuvieron a 19°C sin agitación durante 24 horas.

3- A continuación, los preinóculos fueron subcultivados (1:50) en placas de poliestireno de 96 pocillos (Techno Plastic Products AG) en un volumen final de 200 µl con el mismo cultivo que el preinóculo y se mantuvieron a 19°C durante 48 horas para permitir la adhesión de las células.

Para cuantificar la adhesión celular se siguió el método de tinción con cristal de violeta descrito por Torres *et al.* (2002) con algunas modificaciones:

1- Se eliminó el sobrenadante de los pocillos y se lavó tres veces con 200 µl de PBS.

2- Se dejó secar la placa invertida durante 10 minutos y se añadieron 125 µl de solución de cristal violeta al 0,1% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

3- A continuación, se lavó de nuevo dos veces con PBS y se dejó secar la placa durante 10 minutos.

4- Finalmente, se añadieron 200 µl de etanol para disolver el colorante y se midió la absorbancia a 570nm en un lector de placas de microtítulo (Anthos 2020).

Los medios de cultivo empleados fueron: LB y MM Glc-Pro. Los aditivos empleados fueron: glucosa (0,5% p/v); CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> y MgCl 5 mM; Furanona 5 y 0,5 mM; N-acilhomoserinalactona (AHL) 50 µM.

### **2.2.14.3 Adhesión a placas de acero inoxidable, capuchones de silicona y teflón**

Otro tipo de materiales como acero inoxidable, silicona, teflón, aluminio o cristal fueron utilizados en este trabajo para estudiar la capacidad de adhesión de distintas superficies de ambas cepas bacterianas.

Se utilizaron plaquitas de acero inoxidable, teflón, aluminio y cristal de dimensiones 10mmx10mmx0,5mm adquiridas de *Alfa Aesar*, a excepción del cristal que fue de fabricación casera. También se utilizaron capuchones de silicona de dimensiones 20mmx10mm adquiridos de Saint-Gorain Verneret. Para llevar a cabo los experimentos, todos los tipos de plaquitas fueron colocados en placas de 24 pocillos (Iwaki).

Antes de cada experimento, todo el material se limpió siguiendo las indicaciones

de Merritt *et al.* (1998) y Kim *et al.* (2006) con modificaciones. El material fue sonicado en solución PBS durante 30 minutos y aclarado con agua destilada. A continuación, se dejó secar y se esterilizó mediante inmersión en etanol al 70% durante 10 minutos, en el caso de la silicona y el teflón, y mediante autoclave a 121°C durante 15 minutos, en el caso del acero inoxidable, del aluminio y del cristal.

El procedimiento utilizado para este experimento está basado en el descrito por Sung *et al* (2006) con modificaciones.

1- En primer lugar, se establecieron cultivos de *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA* en MM Glc-Pro con agar durante aproximadamente 48 horas.

2- Una vez crecidas, las células fueron resuspendidas en 5 ml del mismo MM sin agar. Las suspensiones celulares resultantes se utilizaron para inocular las placas de 24 pocillos (conteniendo los diferentes tipos de plaquitas) con  $5 \times 10^8$  células/ml en un volumen final de 1 ml de MM Glc-Pro. A continuación, se incubaron durante cinco días a 20°C sin agitación para permitir la formación de biofilms.

3- Transcurrido este tiempo, se retiraron las plaquitas, se efectuaron dos lavados con PBS y se resuspendieron las células mediante pipeteo y agitación en 1 ml de PBS en el caso del acero inoxidable y del teflón, y en 500  $\mu$ l de PBS en el caso de los capuchones de silicona.

4- Una vez resuspendidas bien todas las células, efectuamos el recuento de células mediante el sistema “siembra de gotas en superficie” como se describe en el apartado 2.2.13.

#### **2.2.14.4 Ensayo de la adhesión *in vitro* a células Caco-2**

En este trabajo, quisimos evaluar la capacidad de ambas cepas *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA* para adherirse a células Caco-2 (*Human Adenocarcinoma Intestinal Epithelial Cells*).

El procedimiento utilizado para este experimento está basado en el descrito por Torres y Kaper (2003) con modificaciones.

1- Las células Caco-2 fueron cultivadas a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml en placas de 24 pocillos con 1 ml de medio *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) conteniendo una 20% de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico antimicótico (Sigma. CO), y se incubaron a 37°C con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> durante 15 días.

Antes de su uso, se lavaron las células con PBS (pH 7,4) y se repusieron con medio EMEM.

2- Se desarrollaron cultivos de *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA* en MM Glc-Pro con agar durante 48 horas.

3- A continuación, las bacterias fueron resuspendidas en 5 ml de medio EMEM y utilizadas para infectar a las células Caco-2 a una concentración de  $5 \times 10^8$  células/ml y se incubaron a 37°C durante 1 hora.

4- Transcurrido el tiempo de infección, las células fueron lavadas tres veces con PBS para eliminar las bacterias que no se hayan adherido. A continuación, se añadieron 200  $\mu$ l de tripsina al 0,25% durante 10 minutos para despegar las células Caco-2 adheridas y, finalmente, se procedió al conteo de bacterias mediante el método de “siembra de gotas en superficie”.

### **2.2.15 Determinación de la capacidad del ácido colánico para modular la inflamación debida a infección con *Borrelia burgdorferi***

Grupos de ratones de la cepa C3H/HeN fueron infectados con  $10^5$  *B. burgdorferi* mediante una inyección subcutánea en la región situada entre los hombros. Un grupo de ratones fue tratado con CA y otro grupo, utilizado como control, fue tratado con PBS (el diluyente usado para disolver el CA). El tratamiento consistió en una inyección en el peritoneo con 100  $\mu$ l de una solución de CA a 1  $\mu$ g/ml, equivalente a 25  $\mu$ g/kg peso. Los ratones fueron tratados cada 2 días durante 2 semanas y posteriormente fueron sacrificados y analizados. Este tiempo representa el pico de la enfermedad, caracterizado en el modelo de ratón por espiroquetemia generalizada y el desarrollo de inflamación en articulaciones (artritis, especialmente en articulaciones de huesos largos como rodilla y talón) y corazón (carditis).

Para el análisis del desarrollo de la inflamación, se fijaron las piernas y los corazones mediante formalina y las piernas se decalcificaron posteriormente. A continuación, se embebieron en parafina, se cortaron en secciones de 5 micras y se tiñeron con hematoxilina/eosina.

Para analizar las posibles diferencias en el reconocimiento de antígenos de *B. burgdorferi* por parte de los sueros de ratones infectados tratados con CA y sin tratar, se

utilizó la técnica de *Western-Blot* y la posterior inmunodetección tal y como se indica en el apartado 2.5.7.

La cuantificación de la respuesta humoral a antígenos de *B. burgdorferi* y producción de citoquinas de los sueros y los sobrenadantes reestimulados se realizó mediante la técnica de ELISA utilizando anticuerpos específicos para las diferentes citoquinas (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones:

1- Las placas de ELISA de 96 pocillos fueron cubiertas con anticuerpos de captura (2 µg/ml) en solución de captura a 4°C durante toda la noche.

2- Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron dos veces con PBS-T y se bloquearon con solución PBS/FCS durante 2 horas a temperatura ambiente

3- A continuación, se aplicaron las muestras a los pocillos y se incubaron a 37°C durante 2 horas.

4- Se realizaron cuatro lavados con PBS-T, se añadió el anticuerpo de detección biotinilado (1 µg/ml) disuelto en solución PBS/FCS y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

5- Posteriormente, se realizaron seis lavados con PBS-T, se añadió la enzima estreptoavidin-peroxidasa (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) disuelta en PBS/FCS (1:250) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

6- Finalmente, se realizaron ocho lavados con PBS-T y se añadió el sustrato de la enzima para la detección de la actividad enzimática; en nuestro caso utilizamos TMB (tetrametilbenzidina) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD).

7- La reacción enzimática se detuvo añadiendo solución de parada (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA para cuantificar los niveles de citoquina. Los valores indicados son calculados comparando los valores de absorbancia obtenidos con aquellos obtenidos para concentraciones conocidas de citoquina.

---

**PBS (10X):** 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4; se añade agua destilada hasta 1 litro.

**Solución de captura:** 8,4 g NaHCO<sub>3</sub>; 3,56 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; pH 9,5; se añade agua destilada hasta 1 litro.

**PBS/FCS:** PBS + 10% de suero fetal bovino (FCS)

**PBS-T:** PBS + 0,05% Tween20.

## **2.2.16 Observación de las estructuras capsulares**

### **2.2.16.1 Observación de las estructuras capsulares. Tinción negativa**

Debido a las características químicas de las cápsulas, éstas no se tiñen con colorantes básicos como el cristal violeta o la safranina. Sin embargo, las cápsulas se pueden observar indirectamente mediante tinción negativa. Las sustancias utilizadas para la tinción negativa son de naturaleza opaca que no tienen afinidad por los constituyentes celulares por lo que no son capaces de fijarse ni penetrar en ellas sino que, simplemente rodea las células. Algunos ejemplos de sustancias utilizadas para la tinción negativa son la tinta china o la nigrosina (un colorante negro insoluble en agua). En el caso de la tinta china, este colorante está compuesto por partículas finas de carbono suspendidas en agua formando un auténtico coloide. Las partículas son demasiado grandes para penetrar a través de la matriz de la cápsula, por lo que sólo se teñirá el medio circundante y las células aparecerán sin teñir sobre un fondo de color negro. En estas condiciones, la cápsula aparecerá como un halo transparente alrededor de la célula, que se verá de color grisáceo.

La tinción negativa es un modo satisfactorio de aumentar el contraste de las células en la microscopía óptica, pero su máxima utilidad está en revelar la presencia de cápsulas alrededor de las células bacterianas.

#### **2.2.16.1.1 Tinción con ácido fosfotúngstico**

Una de las técnicas que hemos empleado para la detección de las estructuras capsulares sintetizadas por *E. coli* K92 a 37°C y 19°C es la tinción negativa mediante ácido fosfotúngstico (Glauert y Lewis, 1998). El protocolo seguido se detalla a continuación:

1- Para la preparación de las células, se desarrollaron cultivos de *E. coli* K92 en medio TSA a 37°C y 19°C durante 3 días.

2- Se recogieron las células del cultivo en medio sólido y se resuspendieron lentamente en 500 µl de agua milliQ.

3- A continuación, se añadió una gota de la suspensión bacteriana a la rejilla y se dejó secar.

4- Se añadió una gota de fosfotungstato potásico al 2% (p/v) ajustado a pH 6,8 y se mantuvo durante 1 minuto.

5- Se eliminó cuidadosamente el exceso del colorante de la rejilla con ayuda de papel y se dejó secar a temperatura ambiente.

6- Finalmente, las gradillas con las muestras fueron observadas al microscopio electrónico de transmisión JEM1010 (JEOL, Tokyo).

#### **2.2.16.1.2 Tinción Burry-Tinta china**

Otra de las tinciones negativas empleadas para la visualización de las estructuras capsulares es la que utiliza el colorante Burry-tinta china, una variante de la tinción negativa que se combina con la tinción mediante un colorante que se une a los carbohidratos de las células y permite su visualización. Con este método realizamos una tinción negativa de las cápsulas rodeando a las bacterias teñidas de rojo y todo ello sobre un fondo negro. Este método fue empleado para visualizar la presencia y ausencia de CA en *E. coli* K92 y el mutante *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA* deficiente en CA.

El método empleado se detalla a continuación:

1- En primer lugar, se tomó una gota del medio de cultivo con las bacterias y la se depositó en un portaobjetos completamente limpio cerca de uno de los extremos del mismo.

2- Una vez seco, se extendió la fucsina (colorante primario) homogéneamente sobre las células y se mantuvo durante 2 minutos. La fucsina es un colorante que tiñe las bacterias de rojo.

3- Transcurrido este tiempo, se lavó con agua y se dejó secar el tiempo necesario.

4- A continuación, se añadió una gota de tinta china que no supere el tamaño de la gota de muestra y se mezclan. Para ello, se tocó la suspensión final con el extremo de otro portaobjetos y se arrastró sobre el primer portaobjetos hasta el extremo libre de muestra, deteniéndose cuando queden aproximadamente unos 2 cm de vidrio sin muestra. De esta manera, se creó una extensión gradualmente más fina conforme se alejaba del punto de partida.

5- A continuación, se colocó un cubreobjetos en la zona central del portaobjetos evitando la formación de burbujas, y se dejó secar a temperatura ambiente.



6- Finalmente, se examinó la muestra mediante un microscopio óptico Nikon Eclipse E600 (Japón).

## **2.3 Técnicas generales de manipulación y análisis del ADN**

### **2.3.1 Aislamiento de ADN total de *E. coli***

#### **2.3.1.1 Aislamiento del ADN a gran escala**

##### a) Método del fenol

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

1- Se inoculó un matraz de 250 ml con 50 ml de LB con una colonia fresca de la cepa correspondiente, y se incubó durante toda la noche a 37°C.

2- Transcurrido este tiempo se recogieron las células mediante centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el precipitado resultante se resuspendió en 20 ml de solución GTE.

3- A continuación se añadieron 2ml de una solución stock de 10 mg/ml de lisozima y se incubó en baño a 37°C durante 30 minutos.

4- Se añadieron 2 ml de SDS 10% para conseguir una concentración final de 1% y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

5- A continuación, se añadieron 300 µl de proteinasa K y 250 µl de ARNasa (ambos procedentes de una solución stock de 10 mg/ml) y se incubó en baño a 37°C al menos durante 30 minutos.

6- Posteriormente, se añadieron 550 µl de NaCl 4 M de modo que la concentración final sea de 0,1 M.

7- Para extraer el ADN se añadió un volumen de fenol lentamente para evitar la rotura mecánica del ADN y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El paso se realizó dos veces.

8- A la fase acuosa obtenida del paso anterior se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico para desproteinizar la muestra (dos veces) y un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico para eliminar los restos de fenol. En todos los casos se conservó la fase acuosa.

9- Finalmente, para precipitar el ADN se añadieron lentamente 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (previamente conservado a -20°C) procurando en todo momento que no se mezcle el etanol y la fase acuosa. Al mezclar suavemente ambas fases aparece un ovillo de ADN que se recogió con una varilla de vidrio y se depositó en un tubo Eppendorf. Para eliminar el exceso de sales se lavó el ADN con etanol frío al 70% y seguidamente se dejó secar al aire. Una vez se hubiera secado el ADN se resuspendió en 2-5 ml de TE y se guardó a -20°C.

---

**Solución GTE:** Tris-HCl 25mM pH 8; glucosa 50mM; EDTA 10mM pH 8

**Fenol neutro:** el fenol para extraer los ácidos nucleicos debe ser equilibrado a pH 7,8 como se detalla a continuación. En primer lugar se funde el fenol a 68°C y se añade hidroxiquinoleína a una concentración final de 0,1%. A continuación, se añade un volumen de Tris-HCl 0,5 M pH 8 y se mezcla durante 15 minutos. Se deja reposar y, cuando las fases se hayan separado, se elimina la mayor cantidad posible de tampón. Se añade un volumen de Tris-HCl 0,1 M pH 8 y se repite el paso anterior. Finalmente, se añade un décimo de volumen de Tris-HCl 0,1 M pH 8 conteniendo 0,2% β-mercaptoetanol y se conserva a 4°C.

**Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico:** mezcla de fenol (equilibrado con Tris-HCl pH 8), cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 25:24:1.

**Cloroformo:alcohol isoamílico (CIA):** mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 24:1.

**Solución TE:** Tris-HCl 10 mM; EDTA 1mM; pH 8

## b) Sistema comercial

Para el aislamiento de ADN genómico de *E. coli* K92 se utilizó el Kit *illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin* de la casa comercial GE Healthcare siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.2.1.2 Aislamiento del ADN a pequeña escala

Este método permite obtener ADN total de manera rápida y en cantidad suficiente para realizar un análisis por PCR (*polymerase chain reaction*).

Una pequeña muestra del crecimiento bacteriano en medio sólido se resuspendió en 100 µl de H<sub>2</sub>O en un tubo Eppendorf y se hirvió durante 10 minutos. A continuación,

se centrifugan los restos celulares a 14000 rpm durante 1 minuto y el sobrenadante se utilizó directamente como ADN molde para ensayos por PCR.

### **2.3.2 Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli***

#### **2.3.2.1 Sistema comercial**

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizó el Kit *Wizard<sup>R</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System* de la casa comercial Promega siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **2.2.2.2 Minipreparaciones por el método de Boiling**

Se siguió el siguiente protocolo (Holmes y Quigley, 1981):

1- Se inoculó una colonia fresca en un tubo estéril con 10 ml de medio LB conteniendo el antibiótico adecuado para el mantenimiento del plásmido en la bacteria, y se incubó a 37°C con agitación de 250 rpm durante un mínimo de 8 horas.

2- Transcurrido este tiempo, se recogieron las células por centrifugación a 10000 rpm durante 2 minutos. El precipitado celular obtenido se resuspendió en 350 µl de STET y se añadieron 10 µl de una solución de lisozima de 10 mg/ml en STET. Se mezcló durante 1 minuto y se hirvió durante 45 segundos. Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico se precipitaron por centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos.

3- A continuación, se eliminó el precipitado obtenido con ayuda de un palillo estéril y el ADN plasmídico se precipitó tras añadir un décimo del volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y un volumen de isopropanol. Se mezcló bien y se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos.

4- La mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos y el precipitado resultante se lavó con etanol al 70%. Posteriormente se dejó secar, se resuspendió en 50 µl de TE y se guardó a -20°C.

---

STET: Sacarosa 8% (p/v); Tritón X-100 0,5%; Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 50 mM

### **2.3.3 Digestión y modificación del ADN**

#### **2.3.3.1 Protocolo general de digestión del ADN con una endonucleasa de restricción**

Las digestiones de fragmentos de ADN con enzimas de restricción se realizan utilizando las soluciones amortiguadoras y las condiciones recomendadas por las diferentes casas comerciales para cada enzima en particular.

1- En primer lugar, se preparó la siguiente mezcla de reacción:

El tampón de digestión (10x) ocupa un décimo del volumen total de la digestión.

“X”  $\mu\text{g}$  de ADN disuelto en  $\text{H}_2\text{O}$  o en tampón TE.

Entre 1-3 unidades de la endonucleasa de restricción por cada  $\mu\text{g}$  de ADN.

Agua milliQ hasta completar el volumen de digestión.

2- Finalmente, se incubó la mezcla de reacción a la temperatura adecuada durante 2-3 horas y el ADN digerido se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa.

#### **2.3.3.2 Ligación de los fragmentos de ADN**

Se utilizó la ADN ligasa del bacteriófago T4 para unir covalentemente los fragmentos de ADN originados por las distintas endonucleasas de restricción. La enzima cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato del ADN, ya sea en un mismo fragmento o entre fragmentos diferentes, y requiere ATP y  $\text{Mg}^{2+}$  como cofactores.

1- Se mezclaron cantidades cercanas a la equimolaridad de ADN del vector (entre 10 y 40 ng) y el ADN del inserto, aunque se ha descrito que la ligación se favorece cuando la relación inserto/vector se triplica.

2- A continuación, se añadió agua milliQ hasta obtener un volumen final de reacción de 10  $\mu\text{l}$  y la mezcla se mantuvo a 65°C durante 15 segundos con el fin de relajar todos los fragmentos de ADN presentes.

3- La mezcla se enfrió en hielo y se añadió 1  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción (10x) para la ligasa y 1  $\mu\text{l}$  (1 unidad) de ADN ligasa del fago T4.

4- Finalmente, se incubó la mezcla de reacción entre 4-16°C durante 12 horas. Las nuevas moléculas generadas durante este proceso serán posteriormente introducidas en la cepa adecuada mediante transformación.

### 2.3.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica permite amplificar entre  $10^5$  y  $10^9$  veces un determinado fragmento de ácidos nucleicos (Mullis *et al.*, 1986) utilizando dos oligonucleótidos (3' y 5') que hibridan en los extremos del fragmento a amplificar y que actúan como cebadores de una actividad polimerasa termoestable.

A continuación se desarrolla el proceso experimental:

1- En primer lugar, se preparó la siguiente mezcla de reacción en un tubo eppendorf:

Tampón (10x)	5 $\mu$ l
Oligonucleótido 1 (5 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
Oligonucleótido 2 (5 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
dNTP's (5 mM)	4 $\mu$ l
ADN molde	5 $\mu$ l
ADN polimerasa	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O milliQ estéril hasta	50 $\mu$ l

2- A continuación, se introdujo el tubo con la reacción en el termociclador programado con las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	Amplificación			Extensión final
	Desnaturalización	Anillamiento	Elongación	
5 minutos 95°C	30 segundos 95°C	30 segundos "x"°C*	"x"*** segundos 72°C	10 minutos 72°C
1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo

\* Se determina la temperatura óptima según la temperatura de fusión de los oligonucleótidos calculada empíricamente.

\*\* El tiempo de extensión varía en función del fragmento del tamaño esperado. Generalmente se utiliza 1 minuto/kilobase.

Para la reacción de PCR se usaron dos tipos de polimerasas termoestables. Se empleó Taq polimerasa (Biotools) obtenida de *Thermus aquaticus* de manera rutinaria y Pfu polimerasa (Novagen) obtenida de *Pyrococcus furiosus* para conseguir productos de PCR de alta fidelidad. En todos los casos se realizó un control negativo de cada reacción de PCR, en el que se sustituye la muestra de ADN por el mismo volumen de H<sub>2</sub>O.

### 2.3.5 Observación de las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa

El protocolo de electroforesis utilizado es básicamente el descrito por Maniatis *et al.* (1982).

1- Preparación del gel. Se utilizó agarosa (Pronadisa) disuelta por calentamiento en solución TAE. La concentración de agarosa en el gel se estableció en función del tamaño del fragmento de ADN que se pretende separar. Además se añadieron 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (BrEt) para visualizar las bandas de ADN mediante un trasiluminador de luz ultravioleta una vez que el desarrollo electroforético se haya completado. Los geles se fotografiaron con el sistema *Kodak Digital Science 1D*.

2- Preparación de la muestra. Se mezcló la muestra de ADN con aproximadamente un décimo del volumen final de tampón de carga concentrado antes de cargarlo en el gel. Los marcadores de tamaño utilizados se describen en el apartado 2.1.3.

3- Desarrollo electroforético. La electroforesis se desarrolló en solución TAE mediante la aplicación de una diferencia de potencial de entre 1 y 5 voltios/cm durante el tiempo adecuado para obtener una correcta resolución de las bandas de ADN.

---

**Solución TAE (50x):** Tris base 242 g; ácido acético glacial 57,1 ml; EDTA 0,5 M pH 8 100 ml; H<sub>2</sub>O destilada hasta 1 l.

**Solución de bromuro de etidio (EtBr):** se prepara una solución de 10 mg/ml en H<sub>2</sub>O y se conserva a 4°C protegida de la luz.

**Tampón de carga (6x):** azul de bromofenol 0,25%; azul de xileno 0,25%; sacarosa 40%. Se conserva a 4°C.

### 2.3.5.1 Extracción de ADN a partir de geles de agarosa

Para la extracción de fragmentos de ADN previamente separados en geles de agarosa se utilizó el kit comercial *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Normalmente estos kits utilizan resinas para purificar el ADN mediante interacción hidrofóbica, permitiendo la extracción de fragmentos de entre 100 pb y 10 kb.

### 2.3.6 Obtención de cepas mutantes mediante delección

Un gran número de herramientas se han descrito para introducir mutaciones en los cromosomas bacterianos (Martínez-Morales *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2000). Uno de los sistemas más convenientes si se quiere evitar resistencia a antibióticos o cicatrices en el cromosoma es el que utiliza vectores suicidas, los cuales permiten la combinación de múltiples mutaciones. Estos sistemas implican un procedimiento que consta de dos pasos, la integración del plásmido mediante recombinación homóloga dentro de la secuencia diana y la posterior escisión a través de un suceso de sobrecruzamiento, lo que resulta finalmente en un intercambio alélico.

Existen dos tipos de plásmidos suicidas: (a) plásmidos sensibles a la temperatura, los cuales solamente se pueden replicar a temperaturas permisivas, y (b) plásmidos que llevan el origen de replicación de R6K, entre los que encontramos el plásmido pCVD442 y sus derivados (Donnenberg y Kaper, 1991), como por ejemplo el plásmido pDS132 utilizado en este trabajo. En este segundo caso, los plásmidos son capaces de replicarse solamente en cepas que produzcan la proteína  $\pi$ , el producto del gen *pir*. La integración del plásmido dentro del cromosoma se selecciona mediante marcadores de resistencia a antibióticos. Por otro lado, la escisión del plásmido integrado mediante intercambio alélico se selecciona con marcadores contra-seleccionables: si el plásmido está completamente integrado en el cromosoma, la célula morirá en presencia de un compuesto contra-selectivo (Reyrat *et al.*, 1998). Existen tres principales marcadores contra-seleccionables. En nuestro caso utilizaremos el sistema sacarosa-sensitivo en el que el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* codifica para la proteína levano-sacarasa que cataliza la hidrólisis de sacarosa originando levanos, los cuales, se acumulan en el periplasma y producen la muerte celular en bacterias Gram negativas. Por tanto, la escisión del plásmido en las células puede ser seleccionada

creciendo las células en medio con concentraciones de sacarosa iguales o mayores al 5% (p/v) (Gay *et al.*, 1983).

Los pasos seguidos para la obtención de mutantes en *E. coli* K92 son detallados a continuación:

1- En primer lugar, se amplificaron por PCR las zonas flanqueantes a ambos lados del fragmento que se desea deletar.

2- A continuación, se clonaron ambos fragmentos por separado en el vector pGEM-T easy® (vector de clonación directa de productos de PCR) y se liberaron mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI*.

3- Los fragmentos con extremos *EcoRI* a ambos lados se ligaron y el producto de la ligación se amplificó por PCR utilizando el par de oligonucleótidos más lejanos en la secuencia del fragmento que queremos deletar.

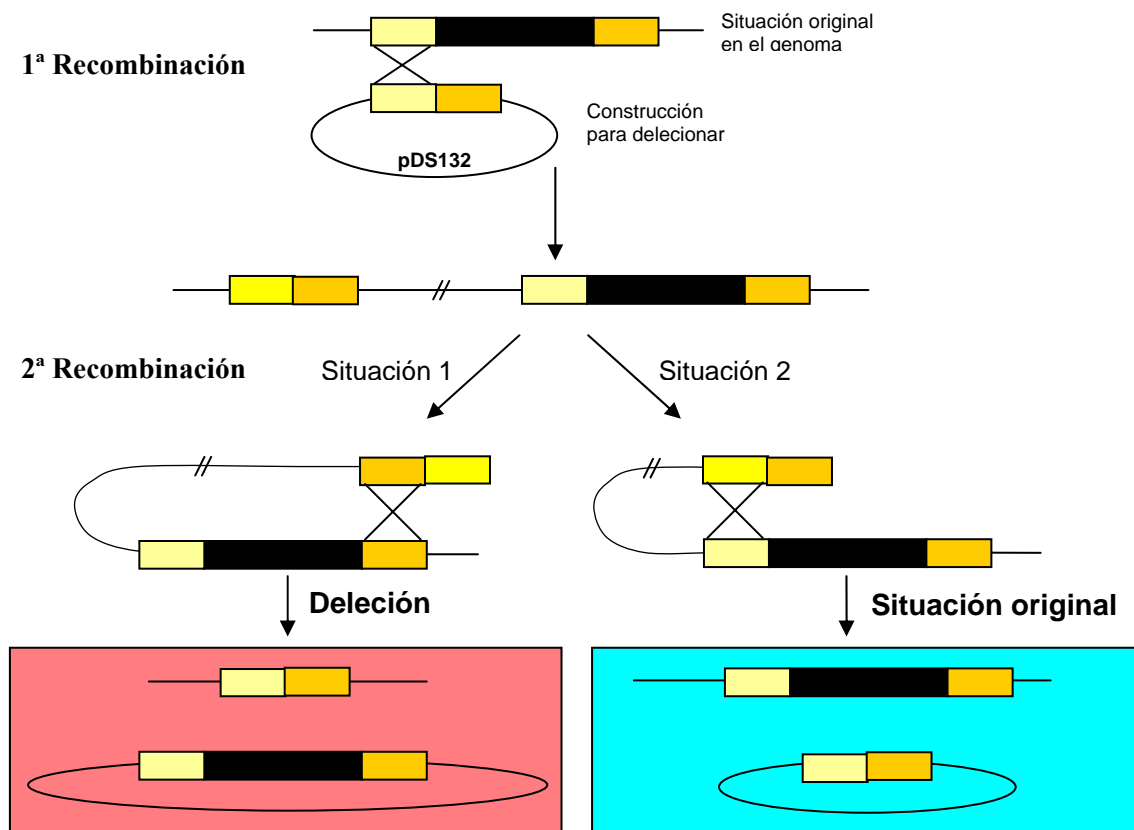
4- El nuevo producto de PCR generado se clonó de nuevo en el plásmido pGEM-T easy®, se liberó mediante digestión con las enzimas de restricción adecuadas y se clonó en el plásmido de delección pDS132.

5- El plásmido pDS132 conteniendo una copia incompleta del gen diana se introdujo en *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir y se transfirió hasta *E. coli* K92 mediante conjugación biparental.

6- Se seleccionaron los transconjugantes resistentes a cloranfenicol (resistencia de la cepa donadora) y rifampicina (resistencia de la cepa receptora) surgidos como consecuencia de la integración del vector en el cromosoma de *E. coli* K92 por recombinación homóloga a través de una de las secuencias flanqueantes (Figura 2.1). Se comprobó por PCR la presencia de la inserción (clones merodiploides) descartando así la posible presencia de clones resistentes a cloranfenicol.

7- A continuación, se sembraron diluciones seriadas de la cepa merodiploide en presencia de rifampicina y de sacarosa al 10% para forzar la segunda recombinación. En este paso fue necesaria la eliminación de las sales del medio para obtener una mayor eficiencia de clones deletados. Esta segunda recombinación puede producirse de dos maneras diferentes en las que, o bien se retorna a la situación inicial (restauración del gen completo) o bien se obtiene el gen diana deletado y la expulsión del plásmido (25% de los casos) (Figura 2.1).





**Figura 2.1** Evento de mutación de un gen mediante deleción de un fragmento interno del mismo. En la primera recombinación se produce la inserción de la construcción para deleción en el genoma de la bacteria. En la segunda recombinación pueden ocurrir dos cosas: si ésta ocurre por el fragmento distinto al implicado en la primera recombinación (fragmento naranja), se producirá la deleción de la región del ADN entre ambos fragmentos como consecuencia de la liberación del plásmido conteniendo la región del genoma delecionada, la cual se perderá por dilución (Situación 1). Sin embargo, si la segunda recombinación ocurre por el mismo fragmento implicado en la primera recombinación (fragmento amarillo), se recupera a la situación original ya que, en este caso, se libera el plásmido con la construcción tal y como se insertó (Situación 2).

8- Para comprobar la expulsión del plásmido pDS132 del genoma de *E. coli* K92, las colonias obtenidas se sembraron de nuevo en LB con cloranfenicol y rifampicina, seleccionando aquellas que son incapaces de crecer en cloranfenicol.

9- Finalmente, se comprobó la deleción del gen en el genoma de *E. coli* K92 mediante PCR.

### 2.3.7 Transformación de *E. coli*

Cuando es necesario introducir ADN exógeno en las bacterias a través de procesos de transformación se requiere un estado de receptividad de la bacteria que facilite el paso de las moléculas de ADN a través de las barreras externas de la célula. Este estado de receptividad se denomina competencia y las células que lo presentan se denominan células competentes.

#### 2.3.7.1 Obtención de células competentes por el método del cloruro de rubidio

Este método fue descrito por Hanahan (1983) y permite una eficiencia de transformación elevada (hasta  $5 \times 10^8$  transformantes por cada  $\mu\text{g}$  de ADN). A continuación se detallan los pasos a seguir:

1- En primer lugar, se sembró una placa de medio LB con la cepa de *E. coli* que queremos hacer competente y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 12 horas.

2- Una colonia fresca aislada del día anterior se utilizó para inocular un matraz con 10 ml de medio  $\phi$ -Broth líquido y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  con agitación hasta que el cultivo alcanzó una  $A_{540\text{nm}}$  de 0,3.

3- A continuación, se inocularon 100 ml de medio  $\phi$ -Broth líquido precalentado con 5 ml del preinóculo anterior y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  con agitación hasta alcanzar una  $A_{540\text{nm}}$  de 0,48, manteniéndose posteriormente a  $4^\circ\text{C}$  durante 20 minutos.

4- Se recogieron las células por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ .

5- A continuación, se resuspendieron las células lentamente en un tercio del volumen inicial de solución Tfb1 previamente enfriada y se mantuvo en hielo durante 20 minutos.

6- Se centrifugó como en el paso 3, se resuspendieron las células en 1/12,5 del volumen inicial de solución Tfb2 previamente enfriada y se mantuvo la suspensión en hielo durante 20 minutos. La suspensión se repartió en alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  que se conservaron a  $-70^\circ\text{C}$  previa congelación en nitrógeno líquido o en un baño de hielo

seco/etanol. Estas células competentes ya estarían preparadas para su transformación mediante choque térmico.

---

**Solución Tfb1:** RbCl 100 mM; MnCl<sub>2</sub> 50 mM; acetato potásico 30 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM y glicerol 15% (v/v). Se ajusta el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M y se esteriliza por filtración a través de un filtro estéril de 0,22 µm de diámetro de poro.

**Solución Tfb2:** MOPS 10 mM pH 7; RbCl 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 75 mM y glicerol 15% (v/v). Se ajusta el pH a 6,8 con NaOH y se esteriliza por filtración a través de un filtro estéril de 0,22 µm de diámetro de poro.

### **2.3.7.1.1 Procedimiento de transformación**

El protocolo para la transformación de células competentes de *E. coli* se basa prácticamente en su totalidad en el descrito por Hanahan (1983). A continuación se detallan los pasos a seguir:

1- Se descongeló lentamente en hielo el vial conteniendo 200 µl de las células competentes y se mezcló suavemente con el ADN (entre 5 y 10 µl), dejándolo reposar en hielo durante 30 minutos.

2- A continuación, se sometió la mezcla a un choque térmico a 37°C durante 2 minutos y se dejó reposar en hielo durante 2 minutos más.

3- Se añadió a la mezcla 1 ml de medio LB para revitalizar las células y se incubó a 37°C y 250 rpm durante 1 hora. Con esto se consigue que las células que incorporen el plásmido expresen la resistencia al antibiótico utilizado como marcador de selección.

4- Finalmente, se sembraron volúmenes de entre 100 y 150 µl en placas de LA suplementado con el antibiótico necesario para la selección de los transformantes. Las placas se mantuvieron a 37°C durante 12 horas o el tiempo necesario hasta observar la aparición de colonias.

### **2.3.7.2 Obtención de células competentes para transformación mediante electroporación**

Los sistemas de electroporación o electrotransformación se basan en un generador que produce impulsos eléctricos de alto voltaje y de alta densidad de

corriente. Estos pulsos se transmiten mediante dos electrodos a una cubeta que contiene la preparación celular, incrementándose la permeabilidad de la pared de las células.

Los métodos descritos para la obtención de células de *E. coli* electrocompetentes y su posterior proceso de electrotransformación fueron descritos por Smith *et al* (1989) cuyos pasos se detallan a continuación.

1- Se sembró en un tubo estéril con 3 ml de LB una colonia de las células requeridas y se incubó a 37°C con agitación toda la noche.

2- Se inocularon 50 ml de LB en un matraz de 250 ml con 2 ml del preinóculo y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar un  $A_{650nm}$  de entre 0,3 y 0,5.

3- A continuación, se recogieron las células por centrifugación a 7000 rpm durante 10 minutos a 4°C. A partir de este momento es necesario trabajar en hielo.

4- El precipitado de células obtenido se resuspendió en 50 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril previamente enfriada y se recogieron de nuevo las células mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

5- Se repitió el paso 4 pero resuspendiendo las células en 25 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril.

6- A continuación, se resuspendieron las células en 1,2 ml de glicerol estéril al 10% previamente enfriado y se transfirió la mezcla a un eppendorf.

7- Se centrifugaron las células a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

8- Finalmente, se resuspendió el precipitado obtenido en 150  $\mu$ l de glicerol estéril al 10% previamente enfriado y la suspensión se repartió en alícuotas de 40  $\mu$ l que se conservaron a -70°C.

#### **2.3.7.2.1 Procedimiento de electrotransformación**

1- Se descongelaron las células a temperatura ambiente y se trasladaron inmediatamente al hielo.

2- A continuación, se mezclaron suavemente 40  $\mu$ l de la suspensión celular con 0,1-1  $\mu$ g de ADN (resuspendido en agua o en tampón de baja fuerza iónica como el TE) y se mantuvo durante 1 minuto en hielo.

3- La mezcla de células y ADN se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Bio-rad) y se aplicó un pulso de 2,5 kV.

4- Inmediatamente, se añadió a la cubeta 1 ml de medio SOC (la rápida adición del medio tras el pulso es importante para incrementar el número de transformantes) y se resuspendieron las células.

5- Se transfirió la suspensión celular a un eppendorf de 1,5 ml y se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación.

6- Finalmente, se repartió la mezcla sobre placas de LA con el antibiótico adecuado y se incubaron a 37°C hasta observar la aparición de colonias.

### **2.3.8 Conjugación entre cepas de *E. coli***

El protocolo utilizado fue el descrito por de Lorenzo y Timmis (1994). En todos los ensayos de conjugación se utilizó como cepa donadora *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir, transformada con las construcciones adecuadas, y *E. coli* K92 como cepa receptora.

1- Se inocularon 10 ml de LB con el antibiótico adecuado con un preinóculo fresco de *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir previamente transformada con la construcción que se quiere conjugar.

2- Simultáneamente, se inocularon 10 ml de LB-Rf con un preinóculo fresco de *E. coli* K92.

3- Ambos tipos de células, donadoras y receptoras, se mantuvieron a 37°C con agitación durante aproximadamente 6 horas y se midió su absorbancia a 600nm.

4- A continuación se mezclaron en un tubo eppendorf las células donadoras y receptoras en proporción 3:1 teniendo en cuenta sus respectivas absorbancias y se centrifugó a 6000 rpm durante 1 minuto.

5- Se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células con 500  $\mu$ l de LB. Se centrifugó nuevamente.

6- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en el volumen residual que queda en el eppendorf.

7- A continuación, se colocó la mezcla de bacterias en un papel de filtro de acetato de celulosa con un diámetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) colocado sobre una placa de medio LB y se dejó secar en la campana de flujo. Una vez seco, se incubó la placa con el filtro a 37°C durante 12-24 horas.

8- Transcurrido este tiempo, se recogieron las células del filtro y se resuspendieron en 1 ml de LB. Finalmente, se realizaron diluciones seriadas con las células resuspendidas y se cultivaron en placas LB con los antibióticos adecuados para la selección de los transconjugantes.

### 2.3.9 Secuenciación de ADN y análisis bioinformático

Para la secuenciación del ADN se utilizó el método enzimático de terminación de cadena o método didesoxi de Sanger *et al.* (1977). Para la reacción de secuenciación se utilizó *ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>®</sup> Terminators* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para separar las moléculas de ADN obtenidas de diferentes tamaños se utilizó un secuenciador *ABI PRISM<sup>®</sup> 3700 DNA Analyzer* (Applied Biosystems).

El análisis de las secuencias obtenidas en este trabajo y las búsquedas bibliográficas se ha realizado mediante los programas informáticos citados a continuación:

Chromas (Technelysium Pty Ltd). Programa para el manejo de cromatogramas.

EMBL. Programa para manejo de secuencias nucleotídicas.

NCBI (National Center for Biotechnology Information, Pubmed) (Rockville Pike, Bethesda, USA). Programa para realizar búsquedas bibliográficas.

Ecocyc (SRI International, Menlo Park, USA). Base de datos sobre el genoma y la maquinaria bioquímica de *E. coli* K-12.

Oligo 4.0. Programa para el diseño y análisis de oligonucleótidos.

## 2.4 Técnicas generales de manipulación y análisis de ARN

### 2.4.1 Aislamiento de ARN total

Para aislar el ARN total de las bacterias, se ha utilizado el kit comercial *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* de GE Healthcare siguiendo las instrucciones que indica el fabricante tal y como se detalla a continuación:

1- El precipitado bacteriano obtenido del cultivo celular objeto de estudio se resuspendió en 100 µl de solución TE conteniendo 0,2 mg/ml de lisozima, se mezcló vigorosamente y se incubó a 37°C durante 10 minutos.

2- A continuación, se lisaron las células mediante la adición de 350 µl de tampón RA1 y 3,5 µl de β-mercaptoetanol y se mezcló vigorosamente. Para reducir la viscosidad y la turbidez de la solución, la muestra se filtró a través de una columna *RNAspin Mini Filter* (suplementada en el *kit*) y se centrifugó a 10000 rpm durante 1 minuto. Se añadieron 350 µl de etanol (70%) para homogeneizar el lisado.

3- Una vez homogenizada, la muestra se aplicó a una columna de purificación de ARN y se centrifugó a 7500 rpm durante 30 segundos. A continuación se añadieron 350 µl de MDB (*Membrane Desalting Buffer*) y se centrifugó a 10000 rpm durante 1 minuto. Este paso elimina las sales contenidas en la muestra y, en consecuencia, la posterior digestión con ADNasa será más efectiva.

4- Para la digestión del ADN, se añadieron 10 µl de ADNasa I y 90 µl de solución de reacción de ADNasa previamente mezclados y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

5- Una vez digerido el ADN, se realizó un primer lavado de la columna con 200 µl de tampón RA2, un segundo lavado con 600 µl de tampón RA3 y un tercer lavado con 250 µl con tampón RA3. Entre los lavados se centrifugó 10000 rpm durante 1 minuto, excepto en el tercero que se centrifugó durante 2 minutos.

6- Finalmente, se añadieron 50 µl de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas y se centrifugó 10000 rpm durante 1 minuto para eluir el ARN. La muestra fue guardada a -20°C.

**Solución TE.** 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8.

**Solución de reacción de ADNasa, RA1, MDB y RA3.** Soluciones comerciales de composición desconocida.

La concentración y pureza del ARN se determinan midiendo en un espectrofotómetro nanodrop ND-1000. La relación entre los valores de absorbancia a 260 y 280 permiten estimar la pureza del ARN, considerándose como puro si la relación  $A_{260}/A_{280}=1,7-2$ . Frecuentemente el ADN de las bacterias puede copurificar con el ARN en el proceso de aislamiento. Cuando esto ocurre, fue necesario tratar la muestra con ADNasa libre de ARNasa, una endonucleasa de *E. coli* que corta ADN tanto de cadena sencilla como de cadena doble para que no interfieran en el posterior análisis. Para ello, se utilizó 1 U de ADNasa I (Invitrogen) por cada microgramo de ARN siguiendo la reacción como se describe a continuación:

Muestra de ARN	1 µg
<i>DNase I Reaction Buffer 10X</i>	1 µl
DNase I (1 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O tratada con DEPC hasta	10 µl

El tubo con la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se añadió 1 µl de EDTA 25 mM para inactivar la ADNasa y se calentó a 65°C durante 10 minutos. Para asegurarse de que no existe contaminación con ADN en las muestras, se amplificaron las muestras mediante PCR convencional. La muestra de ARN está lista para la transcripción reversa cuando los resultados de las amplificaciones sean totalmente negativos.

#### 2.4.2 RT-PCR y Q-PCR

La técnica de la retotranscripción-PCR (RT-PCR) está diseñada para detectar y analizar las moléculas de ARN que tenemos en una muestra a través de un proceso que consta de dos pasos. En primer lugar, la acción de una enzima retrotranscriptasa genera moléculas de ADNc a partir de las moléculas de ARN. Una vez obtenido el ADNc, éste se amplifica mediante PCR convencional utilizando una ADN polimerasa. En este



trabajo, esta técnica se ha empleado para el estudio de la expresión de genes implicados en la biosíntesis y regulación del ácido colánico y del ácido polisialico en *E. coli* K92.

Para la obtención de ADNc a partir de ARN se ha utilizado el kit comercial *ThermoScript™ RT-PCR System* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante como se detalla a continuación.

#### **2.4.2.1 Síntesis de ADNc**

##### **Paso 1. Anillamiento**

1- Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

<i>Random primers</i>	1 $\mu$ l
Mezcla de dNTP's (10mM)	2 $\mu$ l
ARN (10 pg-5 $\mu$ g)	X
DEPC-H <sub>2</sub> O hasta	12 $\mu$ l

2- Se incubó la mezcla en un termociclador a 65°C durante 5 minutos.

##### **Paso 2. Retrotranscripción**

1- Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

<i>cDNA Synthesis Buffer (5X)</i>	4 $\mu$ l
DTT (0,1 M)	1 $\mu$ l
RNase OUT	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	1 $\mu$ l
Retrotranscriptasa (15 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

2- Se incubó la muestra en un termociclador a 25°C 10 minutos, 50°C entre 20-50 minutos y 85°C 5 minutos.

Paso 3. Para la inactivación de la actividad ARNasa H de la retrotranscriptasa, se añadió 1  $\mu$ l de RNase H a cada muestra y se incubó a 37°C durante 20 minutos.

#### **2.4.2.2 Q-PCR**

Para cuantificar la expresión de los genes objeto de estudio se preparó la siguiente mezcla de reacción:

<i>SYBR<sup>R</sup> Green PCR Master Mix</i>	10 $\mu$ l
Oligonucleótido directo (10 $\mu$ l)	0,4 $\mu$ l
Oligonucleótido reverso (10 $\mu$ l)	0,4 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	7,2 $\mu$ l
ADNc diluido	2 $\mu$ l

*SYBR<sup>R</sup> Green PCR Master Mix* fue suministrado por la casa comercial Applied Biosystems al igual que el termociclador modelo *ABI PRISM 7000 Sequence Detection Systems* en el que se llevaron a cabo las reacciones.

El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

Paso 1	Paso 2	Paso 3	
2 minutos 50°C	5 minutos 95°C	15 segundos 95°C	60 segundos 60°C
1 ciclo	1 ciclo	35 ciclos	

Los resultados fueron obtenidos por interpolación en una curva de regresión estándar de valores  $C_T$  (*Cycle Threshold*). Estos valores se obtienen utilizando el software *ABI Prism 7000 SDS Software – Applied Biosystems*).  $C_T$  se define como el ciclo en el que la fluorescencia se determina como estadísticamente significativa sobre la señal de amplificación inespecífica, siendo inversamente proporcional al logaritmo del número de copias inicial.

Los oligonucleótidos empleados para cada gen fueron diseñados mediante el programa Oligo 4.0 con una temperatura de anillamiento en torno a los 60°C y con un tamaño de amplicón de 75-100 bp.

## 2.5 Técnicas para el estudio de proteínas

### 2.5.1 Preparación de extractos crudos

Para la preparación de extractos crudos de *E. coli* K92, los cultivos bacterianos fueron incubados hasta una  $A_{540nm}$  determinada en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 62,5 ml del medio de cultivo apropiado a diferentes temperaturas y 250 rpm. En todos los casos las células se recogieron por centrifugación (véase apartado 2.2.1) y se resuspendieron en 5-10 ml de tampón PBS. Posteriormente, los precipitados celulares resuspendidos fueron lisados mediante sonicación en hielo. Se aplicaron dos pulsos de 1 minuto separados por periodos de 30 segundos. A continuación, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos para eliminar los restos celulares y se guardaron los sobrenadantes a  $-20^{\circ}C$ .

Para la preparación de extractos crudos de *B. burgdorferi*, cultivos de 14 días de esta espiroqueta se centrifugaron a 12500 rpm durante 1 minuto y se realizaron tres lavados con PBS. El pellet obtenido fue resuspendido en 500  $\mu$ l de  $H_2O$  y lisado mediante sonicación. Se aplicaron tres pulsos de 10 segundos. A continuación, el material insoluble se eliminó mediante centrifugación a 14000 rpm durante 1 minuto y los sobrenadantes obtenidos se guardaron a  $-20^{\circ}C$ .

En ambos casos, se cuantificó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (véase apartado 2.5.3).

---

**PBS:** 8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 1,44 g de  $Na_2HPO_4$  y 0,24 g de  $KH_2PO_4$ ; pH 7,4. Se añade agua destilada hasta completar un litro.

### 2.5.2 Expresión heteróloga y purificación de la proteína Wzc en *E. coli*

Para la expresión del gen *wzc* hemos utilizado el sistema pET de Novagen utilizando vectores bajo el control del promotor del bacteriófago T7. El fundamento de este sistema se describe a continuación:

En primer lugar, se introdujo el fragmento de ADN que se quiere expresar (en nuestro caso, el gen *wzc*) en el lugar de clonación del plásmido, el cuál está situado

corriente arriba del promotor del bacteriófago T7. Este promotor es reconocido específicamente por la ARN polimerasa del propio fago, cuyo gen está clonado en el genoma de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) bajo el control del promotor *lacUV5* (inducible por IPTG). De esta manera, cuando se añadió el inductor IPTG al medio de cultivo se indujo la expresión de la ARN polimerasa del fago T7, la cual reconoce su promotor integrado en el vector de expresión induciendo así la expresión del gen.

### 2.5.2.1 Protocolo para la expresión de genes en *E. coli*

El protocolo utilizado se detalla a continuación de acuerdo a las instrucciones del fabricante:

1- Se clonó la secuencia del gen que queremos expresar en el vector de expresión. En nuestro caso, se ha utilizado el vector pET-42, diseñado para altos niveles de expresión de secuencias peptídicas fusionadas con una proteína GST de 220 aminoácidos marcadas con colas de histidinas.

2- A continuación, se transformó en la cepa *E. coli* BL21-44(DE3), se plaqueó la transformación en medio LA con los antibióticos adecuados y se incubaron las placas a 37°C hasta que se observaron las colonias.

3- Se seleccionó una de las colonias obtenidas que se utilizó para inocular un matraz con 50 ml de LB y se mantuvo a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una  $A_{600nm}$  de 0,4-1 (se recomienda 0,6). En este momento, se añadió IPTG a una concentración final de 0,4 mM y se continuó la incubación durante tres horas más.

4- Transcurrido este tiempo, se colocaron los matraces en hielo durante 5 minutos y se centrifugaron las células a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C.

5- Se resuspendió el precipitado celular obtenido en 12,5 ml de Tris-HCl 20 mM pH 8 previamente enfriado y se centrifugó de nuevo como en el paso anterior. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y las células, con la proteína expresada, son guardadas a -70°C.

### 2.5.2.2 Purificación mediante cola de histidina

Una vez que se ha comprobado la expresión de la proteína marcada con colas de histidina (véase apartado anterior), se emplearon columnas comerciales *His SpinTrap*<sup>TM</sup> (GE Healthcare) para la purificación de las proteínas mediante cromatografía de

afinidad en condiciones desnaturalizantes. Estas columnas contienen iones  $\text{Ni}^{2+}$  inmovilizados que interaccionan con las colas de histidina de la proteína sobreexpresada. Se ha seguido el protocolo descrito por el fabricante:

1- Se resuspendió el precipitado celular en 1 ml de solución de lisis (el volumen puede variar dependiendo del nivel de expresión) para la rotura enzimática de las células y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

2- Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos para eliminar los restos celulares y se recogió el sobrenadante.

3- A continuación, se resuspendió la resina contenida en el interior de la columna y se centrifugó a 1000 rpm durante 30 segundos.

4- Una vez preparada la columna, se añadieron 600  $\mu\text{l}$  de solución de unión para equilibrar la columna y se centrifugó como antes.

5- Se añadió la muestra (máximo de 600  $\mu\text{l}$  cada vez) a la columna y se centrifugó nuevamente. Se lavó la columna tres veces con 600  $\mu\text{l}$  de solución de unión.

6- Finalmente, se eluyó la proteína expresada añadiendo 200  $\mu\text{l}$  de solución de elución con diferentes concentraciones de imidazol (de menor a mayor) y se centrifugó como antes. Para comprobar cual es la fracción con la proteína de interés se analizaron los diferentes eluidos recogidos en un gel SDS-PAGE.

---

**Solución de unión.** 20 mM de Tris-HCl; 8 M de urea; 5 mM de imidazol; pH 8; 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol.

**Solución de lisis.** Igual que el tampón de unión pero al que se le añaden sustancia a una concentración final de: lisozima 0,2 mg/ml; ADNasa 20  $\mu\text{g/ml}$ ;  $\text{MgCl}_2$  1 mM; Pefabloc<sup>TM</sup> 1 mM.

**Solución de elución.** Es igual que el tampón de unión pero con distintas concentraciones de imidazol de van desde 50 hasta 500 mM.

### **2.5.3 Cuantificación de proteínas**

La concentración de proteínas de las muestras se determinó mediante el método de Bradford (1976), basado en el cambio del máximo de absorción de 465 a 595 nm tras la unión específica del colorante Azul Brillante Coomasie G-250 a las proteínas.

A 800 µl de la solución problema se le añadieron 200 µl de reactivo de Bradford (*Protein Assay*, Bio-Rad Laboratories), se mezcló bien y se dejó reposar 10 minutos antes de medir la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína se determinó a partir de una recta patrón elaborada previamente con soluciones de concentración conocida de albúmina sérica bovina (BSA).

#### **2.5.4 Electroforesis SDS-PAGE**

Para el desarrollo electroforético de muestras de naturaleza proteica se siguió el método descrito en el apartado 2.2.8.

#### **2.5.5 Tinción de geles SDS-PAGE (tinción con azul de Coomasie)**

Una vez finalizado el desarrollo electroforético, la tinción de las proteínas se realizó con el colorante azul de Coomasie, que es capaz de detectar hasta 0,1 µg de proteína. Para ello, se sumergieron los geles en solución de tinte durante 30 minutos a temperatura ambiente, y a continuación, se retiró esta solución y se añadió solución de destintado hasta eliminar el color del fondo.

---

**Solución de tinte.** Azul brillante de Coomasie R-250 0,25% (P/V); Metanol 45% (v/v); Ácido acético glacial 10% (v/v). El colorante se disuelve primero en metanol antes de añadir el resto de componentes.

**Solución de destintado.** Ácido acético glacial 7% (v/v); Metanol 20% (v/v). Se ajusta el volumen final con agua destilada.

#### **2.5.6 Transferencia a membrana nitrocelulosa de proteínas**

El proceso se realizó siguiendo los mismos pasos descritos en el apartado 2.2.10. La única diferencia es que en este caso las muestras que se transfirieron del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa son de naturaleza proteica.

#### **2.5.7 Detección inmunológica de proteínas inmovilizadas.**

La inmunodetección de proteínas inmovilizadas en la membrana de nitrocelulosa,

bien sea mediante *Dot-blot* o mediante *Western-blot*, se llevó a cabo del mismo modo que el descrito en el apartado 2.2.11.

Cuando se realizó la inmunodetección de proteínas fosforiladas se utilizó el anticuerpo *anti-phosphotyrosine-HRP conjugate* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante como se detalla a continuación:

1- Una vez realizado la transferencia de proteínas a geles de poliacrilamida, se sumergió la membrana de nitrocelulosa en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche.

2- Transcurrido este tiempo, se efectuó un lavado con TTBS para eliminar el exceso de solución de bloqueo y a continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo diluido 1:10000 en TTBS durante 1 hora a temperatura ambiente.

3- Una vez unido el anticuerpo primario, se efectuaron tres lavados de 15 minutos con tampón TTBS a temperatura ambiente.

Para revelar los lugares de reconocimiento del anticuerpo a través de la actividad enzimática de la peroxidasa se utilizó el sistema *ECL Western Blotting Detection System* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante:

4- Se preparó una solución compuesta por el mismo volumen de cada solución de revelado 1 y 2. A continuación secamos el exceso de tampón TTBS de la membrana, añadimos la mezcla de soluciones de detección e incubamos durante 1 minuto a temperatura ambiente sin agitación.

5- A continuación, secó el exceso de solución de detección de la membrana, la envolvemos en papel SaranWrap™ y todo junto lo colocamos en una *cassette*. Tras apagar la luz se colocó cuidadosamente un trozo de película fotográfica (GE Healthcare) encima de la membrana, se cerró el *cassette* y se mantuvo durante un minuto de exposición.

6- Transcurrido este tiempo, recogemos la película y lo sumergimos en solución de revelado durante dos minutos. A continuación, se sumerge la película en agua con ácido acético al 20% y, finalmente, en solución de fijación (Sigma) hasta que la película se vuelva transparente.

**Solución de bloqueo.** TBS con albúmina sérica bovina al 1%.

**TBS (5X).** 2,45 g de Tris; 29,22 g de NaCl; 200 ml de H<sub>2</sub>O; se ajusta a pH 7,5.

**TTBS.** TBS con 0,05% de Tween 20.

**Solución de anticuerpo.** TTBS con 1% de gelatina.

**Soluciones 1 y 2 de detección.** Son soluciones comerciales de composición desconocida.

**Solución de revelado.** 2,2 g de metol; 8,8 g de hidroquinona; 72 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>; 48 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 4 g de KBr; H<sub>2</sub>O hasta 1L. Filtrar la solución y guardar en frasco topáceo.

Cuando se analizaron las posibles diferencias en el reconocimiento de antígenos de *B. burgdorferi* por parte de los sueros de ratones infectados tratados con CA y sin tratar, se realizó la inmunodetección tal y como se indica a continuación:

1- Una vez realizado el desarrollo electroforético de los geles de poliacrilamida conteniendo 100 mg de proteína por carril, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y, a continuación, se cortaron en doce tiras (equivalentes a los doce carriles).

2- De manera individual, las tiras fueron sumergidas en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente.

3- A continuación, se realizaron dos lavados con T-PBS y las tiras se incubaron con una dilución 1/100 de cada suero a temperatura ambiente durante 1 hora.

4- Se realizaron dos lavados con T-PBS, se añadió anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:1000) diluido en solución de bloqueo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora.

5- Se realizaron dos lavados con T-PBS y se añadió TMB (Kierkegaard and Perry Labs) como sustrato de la enzima para el desarrollo del color e inmunodetección.

---

**PBS (10X):** 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4; se añade agua destilada hasta 1 litro.

**T-PBS:** PBS + 0,1% Tween20.

**Solución de bloqueo:** T-PBS + 5% de leche desnatada.

### 2.5.8 Obtención de anticuerpos policlonales

La inmunización de los conejos y la posterior obtención de anticuerpos policlonales frente a la proteína Wzc purificada mediante colas de histidina se llevó a cabo del modo descrito en el apartado 2.2.12.



### **3. Resultados y Discusión**

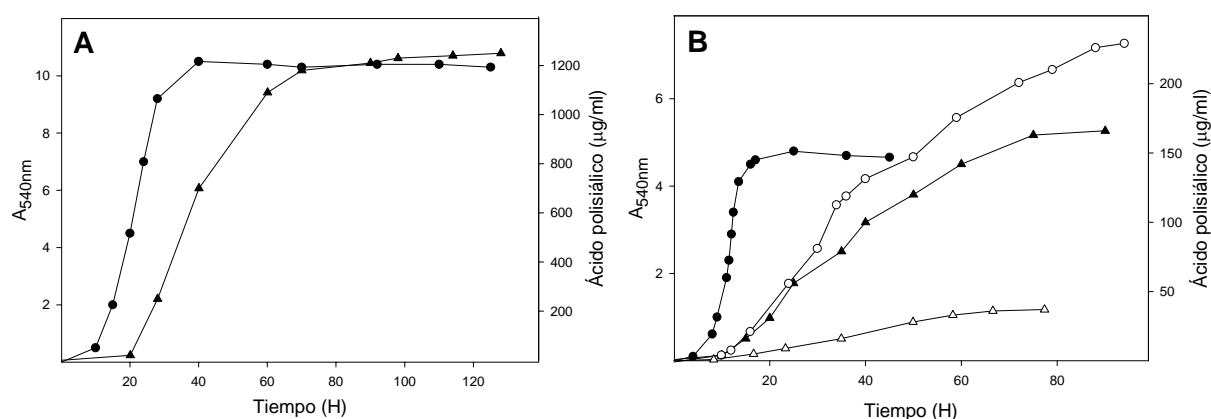
---



### 3.1 Crecimiento y producción de polímeros capsulares en *E. coli* K92

#### 3.1.1 Observaciones fenotípicas derivadas del crecimiento celular

Estudios previos, realizados en nuestro laboratorio (Rodríguez Aparicio *et al.*, 1988b), han revelado que cuando *E. coli* K1 o K92 crece a 37°C en medio líquido libera un polímero capsular formado por restos de N-acetil neuramínico (Neu5Ac) denominado ácido polisiálico (PA). Los valores más altos de producción del polímero se alcanzan cuando se emplean medios mínimos (MM) de cultivo que contienen como única fuente de carbono y nitrógeno xilosa (Xil) y prolina (Pro) para *E. coli* K1 (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1988b) o xilosa y asparragina (Asn) para *E. coli* K92 (Figura 3.1) (González-Clemente *et al.*, 1990).



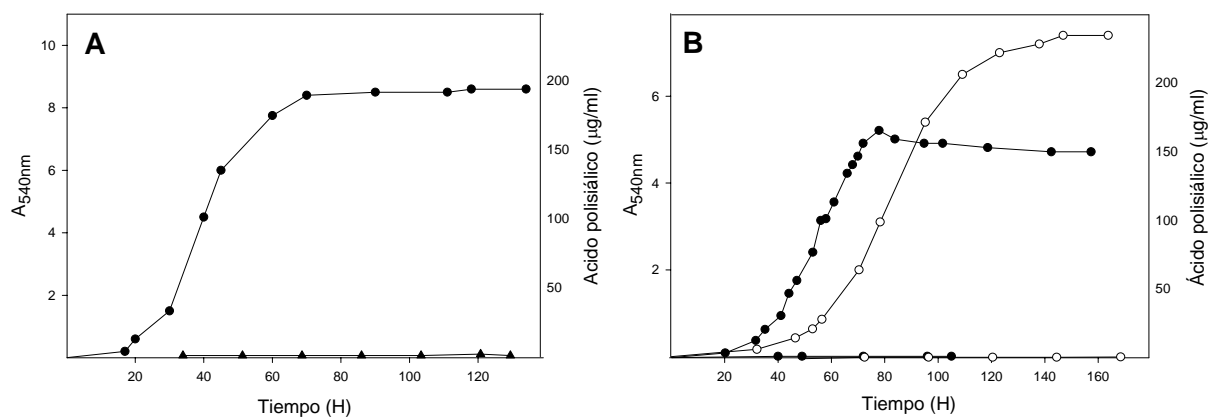
**Figura 3.1** Curvas de crecimiento (círculos) y producción de PA (triángulos) de cultivos de *E. coli* K1 incubados en MM Xil-Pro (A) y de *E. coli* K92 en MM Xil-Asn (negro) y MM Glc-Pro (blanco) (B) a 37°C.

También se ha demostrado que cuando ambas cepas bacterianas crecen a temperaturas por debajo de 20°C no producen ácidos polisiálicos como estructura capsular (Figura 3.2) (González-Clemente *et al.*, 1990). El papel que la temperatura de crecimiento juega sobre el desarrollo de ciertas estructuras capsulares en bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae se conoce desde hace mucho tiempo (Félix *et al.*, 1934; Jude y Nicolle, 1952). Es más, según la clasificación de las cápsulas en *E. coli* (véase apartado 1.3.2.1), las cápsulas de PA sintetizadas por *E. coli* K1 y K92

pertencen al grupo 2 y, en general, se ha descrito que su síntesis se encuentra termorregulada (Whitfield, 1999).

Estudios fisiológicos y bioquímicos realizados en nuestro laboratorio sugieren que la CMP-Neu5Ac sintetasa (NeuA) juega un papel determinante en la termorregulación de las cápsulas de PA en *E. coli* (González-Clemente *et al.*, 1990), una enzima implicada en la biosíntesis de ácidos polisialícos (véase apartado 1.5.2.1). En estos estudios se demuestra que cuando *E. coli* K1 y K92 crecen a 20°C (temperaturas restrictivas), apenas existe actividad enzimática de NeuA sugiriendo que la temperatura controla su biosíntesis y/o actividad regulando la formación del CMP-Neu5Ac necesario para la biosíntesis de ácidos polisialícos.

No obstante, estudios recientes (Corbett y Roberts, 2008) sugieren la posible existencia de un complejo sistema multifactorial responsable de la represión de la biosíntesis de este grupo de cápsulas a temperaturas de crecimiento por debajo de los 20°C (véase apartado 1.6.2).



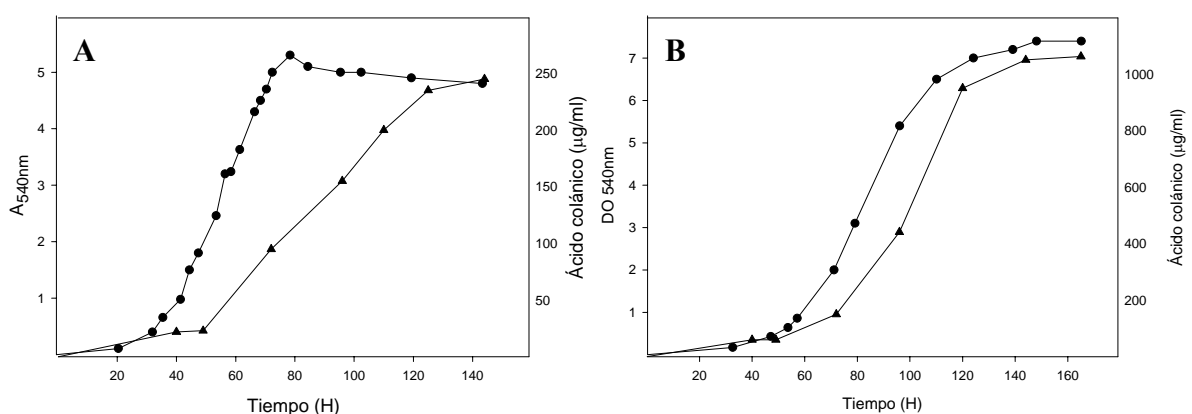
**Figura 3.2** Curvas de crecimiento (círculos) y producción de PA (triángulos) de cultivos de *E. coli* K1 incubados en MM Xil-Pro (A) y de *E. coli* K92 en MM Xil-Asn (negro) y MM Glc-Pro (blanco) (B) a 19°C.

En el desarrollo de estos experimentos de producción en medio líquido se ha observado que, a diferencia de *E. coli* K1, cuando *E. coli* K92 crecía a 19°C la viscosidad del medio de cultivo aumentaba considerablemente a medida que transcurría la fermentación, sobre todo, cuando se utilizaba MM Glc-Pro como medio de crecimiento.

Como hemos descrito anteriormente (véase Introducción), las estructuras capsulares juegan diversos papeles en la bacteria, como por ejemplo, proteger al microorganismo frente a condiciones hostiles (Beveridge y Graham, 1991; Murphy, 2001; Du *et al.*, 2002; Alberty *et al.*, 2004). Ya en el año 1963, Goebel demostró la existencia de un polímero capsular denominado ácido colánico (CA) (véase Figura 1.7) que está formado por restos de glucosa, galactosa, fucosa y ácido glucurónico (Hanna *et al.*, 2003), y que determinadas bacterias sintetizan como elemento protector bajo condiciones estresantes, como por ejemplo estrés osmótico y oxidativo, y pH y temperaturas extremas (Chen *et al.*, 2004).

De este modo, el aumento de viscosidad observado en los cultivos procedentes de células de *E. coli* K92 crecidas a 19°C nos hacía suponer que, en un principio, esta bacteria liberaba algún polímero capsular que desempeñaba un papel de protección frente a bajas temperaturas de crecimiento.

La valoración del caldo de cultivo correspondiente a células de *E. coli* K92 crecidas durante 120 horas a 19°C mediante el método colorimétrico del orcinol (Figura 3.3) reveló la existencia de ácido glucurónico, componente constitutivo y diferenciador del CA (Hanna *et al.*, 2003), lo que hace suponer que cuando *E. coli* K92 crece a bajas temperaturas (temperaturas restrictivas) genera un polímero capsular que contiene ácido glucurónico, posiblemente CA, y que éste puede ser el responsable de la viscosidad observada en los cultivos cuando la bacteria crece a 19°C.



**Figura 3.3** Curvas de crecimiento (círculos) y de producción de CA (triángulos) de cultivos de *E. coli* K92 incubados en MM Xil-Asn (A) y Glc-Pro (B) a 19°C.

### 3.1.2 Identificación del ácido colánico como polímero producido por *E. coli* K92 mediante técnicas de FT-IR, GC-MS y NMR.

Hasta el momento, *E. coli* K92 se caracteriza por producir como polímero capsular PA pero no CA. La posibilidad de que esta bacteria sea capaz de producir ambos polímeros capsulares, PA y CA, implica la necesidad de comprobar fehacientemente que estamos hablando de que el ácido glucurónico detectado en los caldos de cultivo forma parte realmente del CA, y no se trata de un compuesto aislado o de un posible artefacto.

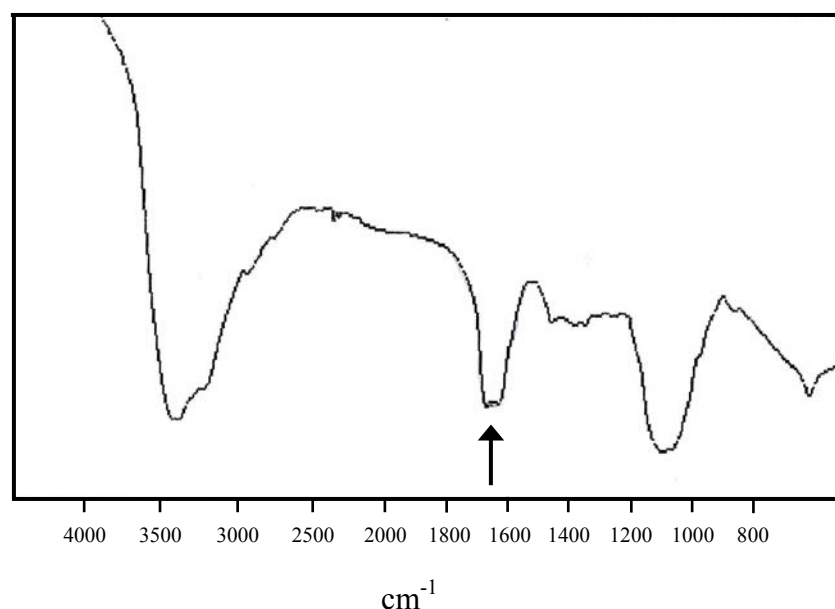
Con objeto de establecer si realmente es CA el polímero generado por *E. coli* K92 cuando crece a temperaturas restrictivas (19°C), se realizó un estudio de identificación y caracterización mediante técnicas de espectroscopia de infrarrojos (FT-IR), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y resonancia magnética nuclear (RMN). Para ello se purificó el polímero capsular a partir de cultivos de *E. coli* K92 a 19°C en MM Glc-Pro (véase apartado 2.2.3). El liófilo resultante fue resuspendido en agua destilada a una concentración final de 100 µg/ml y se cuantificó la composición de ácidos nucleicos, proteínas, azúcares totales, ácidos siálicos y ácidos urónicos y la presencia o ausencia de LPS. Como podemos ver en la Tabla 3.1, el protocolo de purificación del CA eliminó prácticamente la fracción proteica y los ácidos nucleicos presentes en la muestra. Por otra parte, el tratamiento con ácido acético y la posterior diálisis permitieron, como veremos posteriormente, la eliminación total de un elemento con gran capacidad inmunogénica, como es el LPS.

**Tabla 3.1** Contenido en azúcares, proteínas, ácidos nucleicos y LPS del CA antes y después de su purificación.

	CA sin purificar	CA purificado
<b>Proteínas</b>	2,4 %	1 %
<b>Ácidos nucleicos</b>	12,6 %	1,5 %
<b>LPS*</b>	+	-
<b>Ácidos siálicos</b>	0 %	0 %
<b>Ácidos urónicos</b>	23 %	26 %
<b>Azúcares totales</b>	85 %	97,5 %

(\*) La presencia o ausencia de LPS en las muestras se detectó mediante *Dot-Blot*.

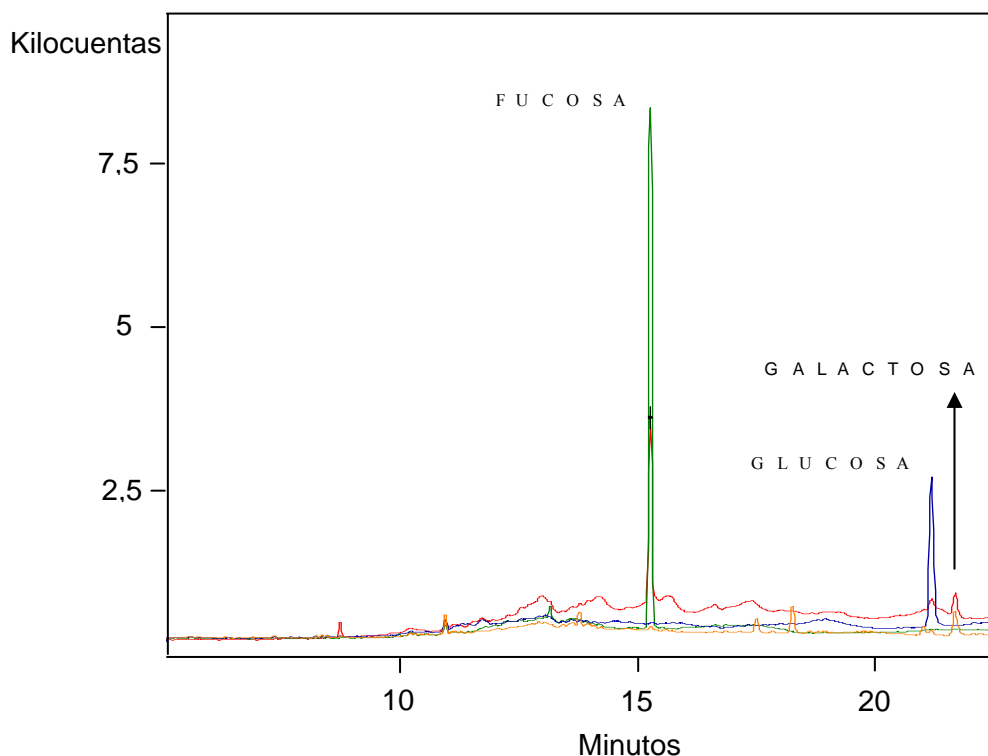
El análisis mediante FT-IR del CA purificado se realizó en un rango de trabajo del infrarrojo medio entre  $4500\text{ cm}^{-1}$  y  $450\text{ cm}^{-1}$ . Como se puede observar en la Figura 3.4, el espectro reveló la existencia de una señal entre los  $1600\text{ cm}^{-1}$  y los  $1800\text{ cm}^{-1}$  que se corresponde con la presencia de un grupo carboxilo ( $\text{C}=\text{O}$ ) en la muestra. Este grupo carboxilo podría atribuirse al que la molécula de ácido glucurónico (uno de los cuatro componentes principales que constituyen el ácido colánico) posee en su grupo ácido, lo que sugiere la presencia de dicha molécula. Este resultado, simplemente, complementa la ya verificada presencia de ácidos urónicos mediante el método colorimétrico del orcinol.



**Figura 3.4** Espectro de infrarrojos del CA purificado y deslipidizado.

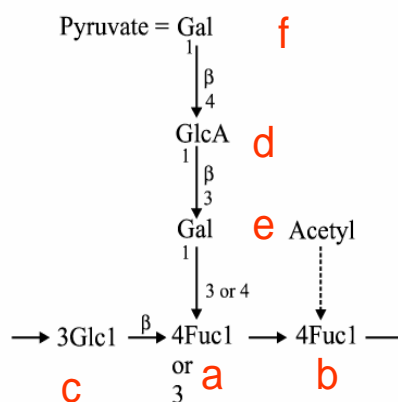
Con objeto de identificar los componentes del polímero capsular sintetizado por *E. coli* K92 a  $19^{\circ}\text{C}$  se utilizó la técnica que combina la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), que nos permite separar e identificar los distintos componentes de una muestra.

Como se muestra en la Figura 3.5, el espectro obtenido mediante el análisis por GC-MS puso de manifiesto la existencia de tres picos que, comparándolos con los espectros obtenidos con los patrones moleculares, se corresponden con glucosa, galactosa y fucosa, tres de los cuatro elementos constitutivos del ácido colánico (Mao *et al.*, 2001).



**Figura 3.5** Análisis mediante espectrometría de GC-MS de una muestra de CA purificado y deslipidizado (línea roja). Los patrones utilizados son fucosa (línea verde), glucosa (línea azul) y galactosa (línea naranja).

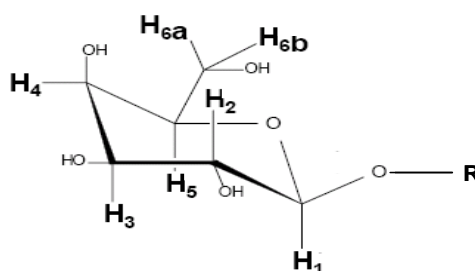
Para establecer la estructura del polímero purificado y corroborar definitivamente que se trataba de CA analizamos la muestra mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la comparamos con la ya descrita por Sutherland (1969) (Figura 3.6).



**Figura 3.6** Estructura química del ácido colónico propuesta por Sutherland en 1969. Las letras en rojo se refieren al nombre utilizado en este texto para referirse a cada residuo de monosacárido.



La estructura del CA descrita anteriormente presenta cierta ambigüedad para algunas uniones glicosídicas. Así, no se especifica si se trata de una unión tipo alfa o beta para los residuos de monosacárido a, b y e. Además, existe ambigüedad en la posición de unión al carbono aglicónico para los residuos c y e, estando implicado en ambos casos el residuo a. Por otra parte, en los resultados que detallamos a continuación hemos utilizado la notación IUPAC para referirnos a los distintos átomos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de las unidades monosacáridicas. Un ejemplo de esta notación se muestra en la Figura 3.7 para el monosacárido galactosa en configuración beta.

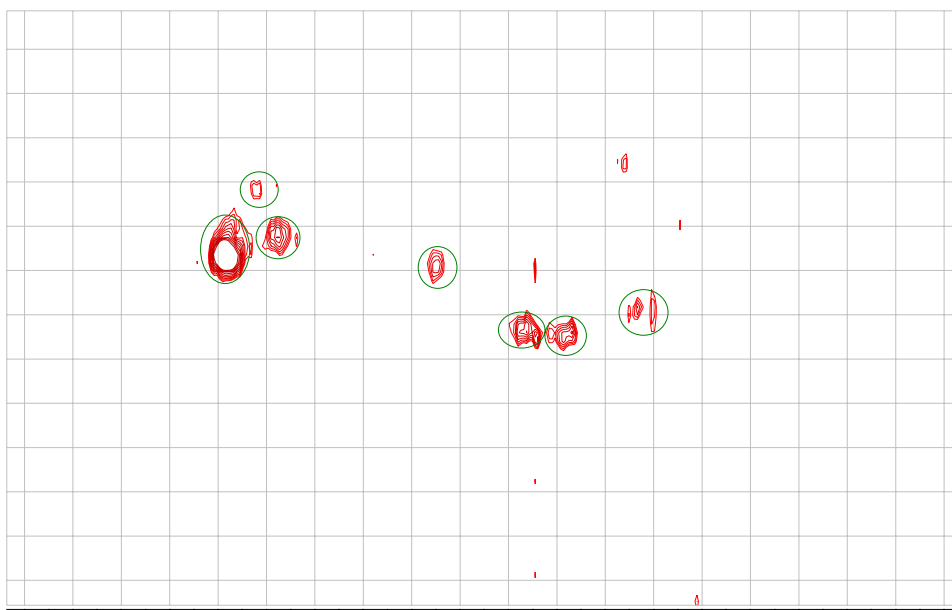


**Figura 3.7** Estructura del monosacárido de galactosa en configuración beta.

Debido a la alta viscosidad del CA en solución, hemos empleado la técnica HR-MAS (*High-Resolution Magic Angle Spinning*), la cual se utiliza habitualmente para mejorar el estudio mediante RMN de muestras viscosas. Esta técnica utiliza una sonda especial que permite la rotación de muestra en el ángulo mágico para eliminar, o al menos reducir considerablemente, los efectos de ensanchamiento de línea producidos por el acoplamiento dipolar y las diferencias de susceptibilidad magnética de la muestra, consiguiéndose espectros con menores anchuras de línea muy similares a los obtenidos convencionalmente para una disolución no viscosa.

Atendiendo a la Figura 3.8, el espectro 2D-HSQC de la muestra presenta 6 señales en la región anomérica, lo cual está en concordancia con las 6 unidades de monosacárido que forman parte de la unidad repetitiva del CA. La comparación entre los desplazamientos químicos de la base de datos de carbohidratos SUGABASE (<http://www.boc.cem.uu.nl/static/sugabase/sugabase.html>) y los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de estas señales anoméricas de HSQC indican claramente que puede haber hasta 3 unidades monosacáridicas en configuración alfa (señales a1, a2, a3 con  $^1\text{H}$  entre 5.2 y 5.5 ppm y  $^{13}\text{C}$  entre 96 y 99 ppm), y hasta 4 en beta (señales b1, b2,

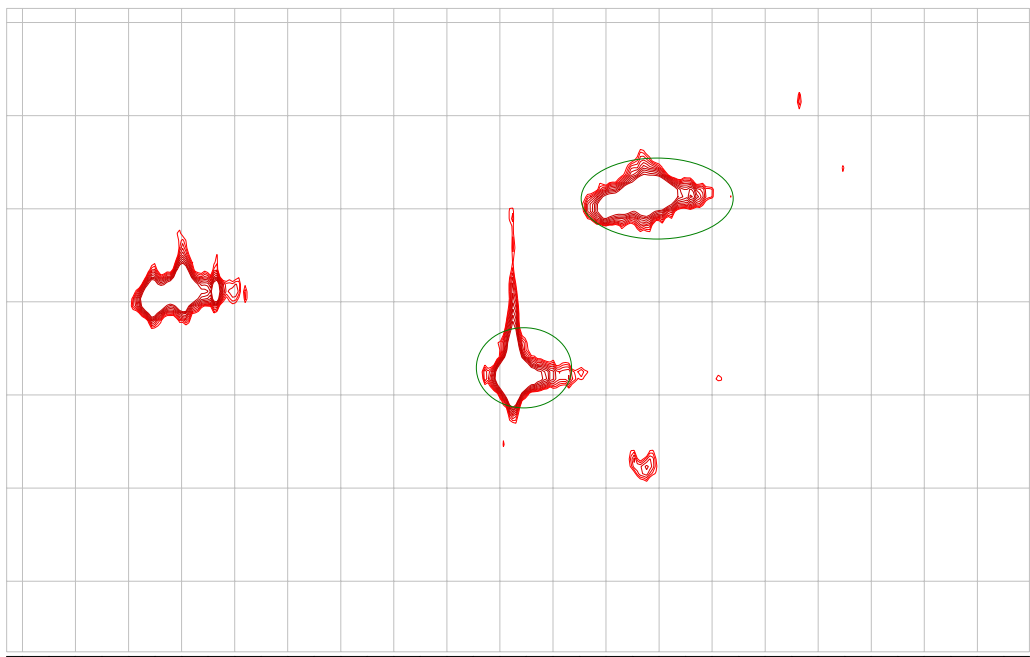
b3 y b4 con  $^1\text{H}$  entre 4.5 y 4.9 ppm y  $^{13}\text{C}$  entre 100 y 103 ppm). El hecho de que aparezcan hasta 7 señales en la zona anomérica del HSQC (una más que las esperables para el CA) y la posibilidad de existan otras señales adicionales de baja intensidad en esta misma zona parece indicar cierta heterogeneidad en el polímero del CA, ya sea de origen natural o por degradación de la muestra. En cualquier caso podemos encontrar con claridad 6 señales intensas a1, a2, a3, b1, b2 y b3 que son compatibles con la estructura del CA, mientras que el resto de señales adicionales son de menor intensidad y por tanto debe tratarse de productos minoritarios en la muestra.



**Figura 3.8** Región anomérica del espectro 2D-HSQC de la muestra de CA. Señales a1, a2 y a3 corresponden a monosacáridos de configuración alfa, señales b1 a b4 son monosacáridos en configuración beta de acuerdo con los desplazamientos químicos observados de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

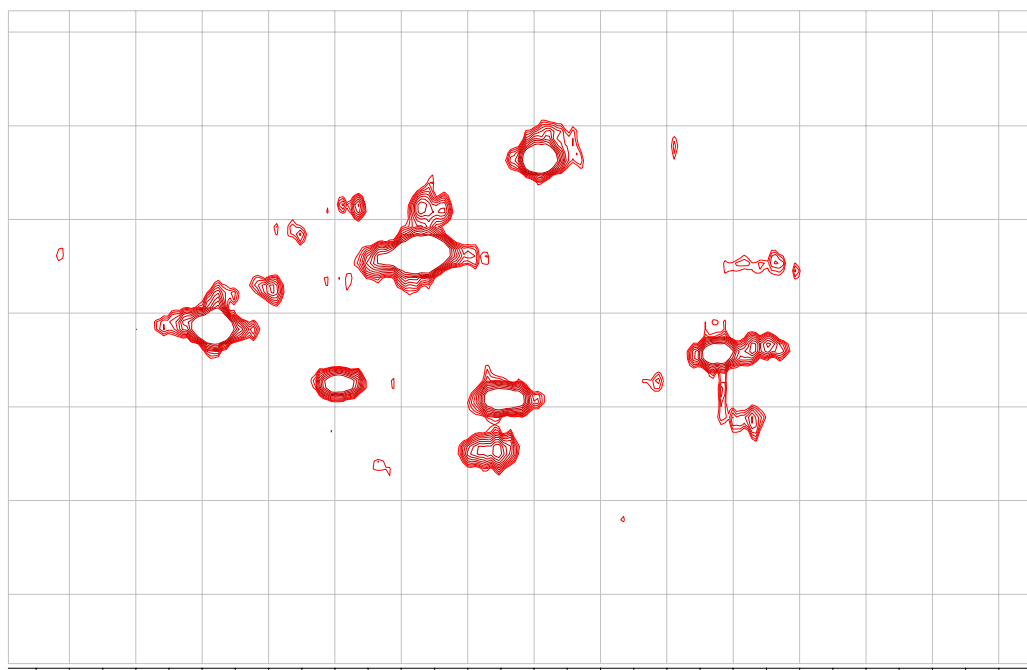
En la estructura del CA mostrada en la Figura 3.6 se pueden encontrar 3 uniones glicosídicas de tipo *beta* entre las parejas de residuos **c-a**, **d-e** y **f-d**, mientras que para las demás uniones glicosídicas, **a-b**, **b-c** y **e-a**, no hay información sobre su configuración. De acuerdo con los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  de las señales anoméricas del HSQC parece claro que estas tres uniones sólo pueden presentarse en configuración *alfa*.

En la región alifática del espectro HSQC (Figura 3.9) aparecen las dos señales esperadas para los grupos metilo (CH<sub>3</sub>) de los residuos de fucosa de la estructura del CA, mientras que la señal restante puede ser del grupo acetilo.

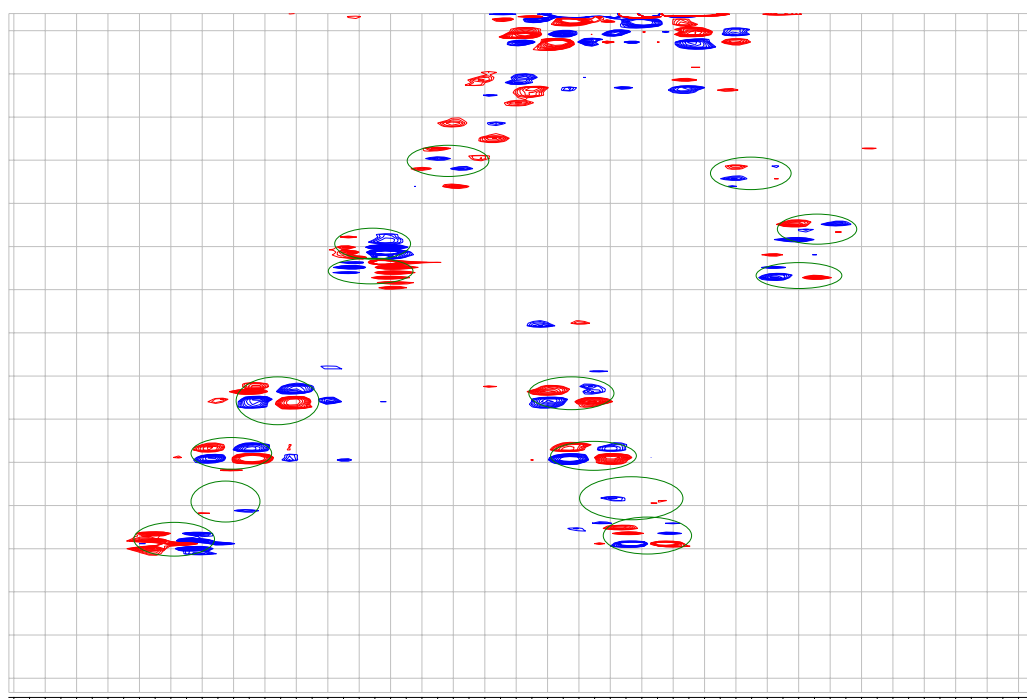


**Figura 3.9** Región alifática del espectro 2D-HSQC de la muestra de CA. Se indican las dos señales que pueden corresponder con los grupos CH<sub>3</sub> de los residuos de fucosa del CA.

El análisis de la región del espectro HSQC correspondiente a los protones del anillo de piranosa de los monosacáridos (protones y carbonos desde H<sub>2</sub>-C<sub>2</sub> a H<sub>6</sub>-C<sub>6</sub>) se muestra en la Figura 3.10. El número de señales observadas es inferior al que cabe esperar para la unidad repetitiva del CA compuesta por 6 monosacáridos. Sin embargo, el hecho de que no aparezcan todas las señales esperables puede deberse a la baja sensibilidad de este experimento unida a la elevada anchura de señal de protón del propio polímero. Hay que tener en cuenta que las señales de protón que relajen más rápidamente (T<sub>2</sub> cortos) pierden más rápidamente su intensidad en el HSQC y por eso es posible que lo que veamos en esta zona del espectro sea sólo la parte de unidades de carbohidrato con mayor movilidad intramolecular o la suma de varias señales que solapen. Por lo demás, también hay que tener en cuenta que todas las señales de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C que pueden observarse en el espectro HSQC de esta muestra pertenecen sin duda alguna a las zonas típicas de los carbohidratos.



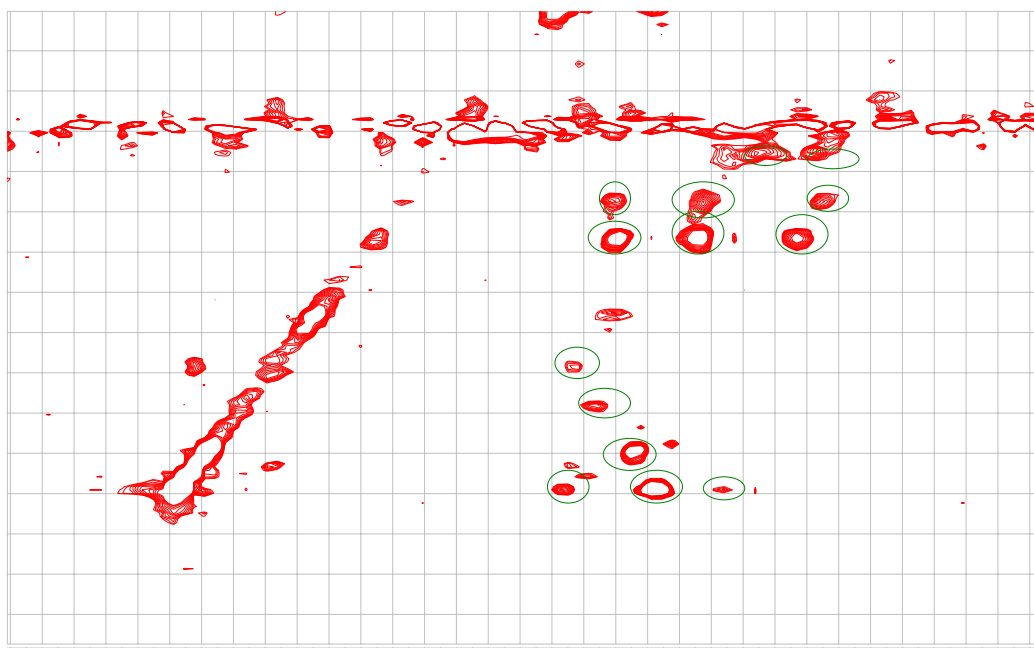
**Figura 3.10** Región de protones del anillo de carbohidrato en el espectro 2D-HSQC de la muestra de CA.



**Figura 3.11** Región anomérica del espectro 2D-DQF-COSY de la muestra de CA. Se indican las correlaciones entre cada protón anomérico (H1) y el protón (H2) de cada unidad de monosacárido.

Para cada señal anomérica encontrada en el espectro HSQC (Figura 3.8), el espectro 2D DQF-COSY (Figura 3.11) permite obtener el desplazamiento químico del protón H-2 de cada unidad de monosacárido.

Para conocer el desplazamiento químico del resto de protones de cada anillo de monosacárido (H3 a H6) se adquirió un espectro 2D TOCSY (Figura 3.12). Los desplazamientos químicos de estos protones se incluyeron en la Tabla 3.2.

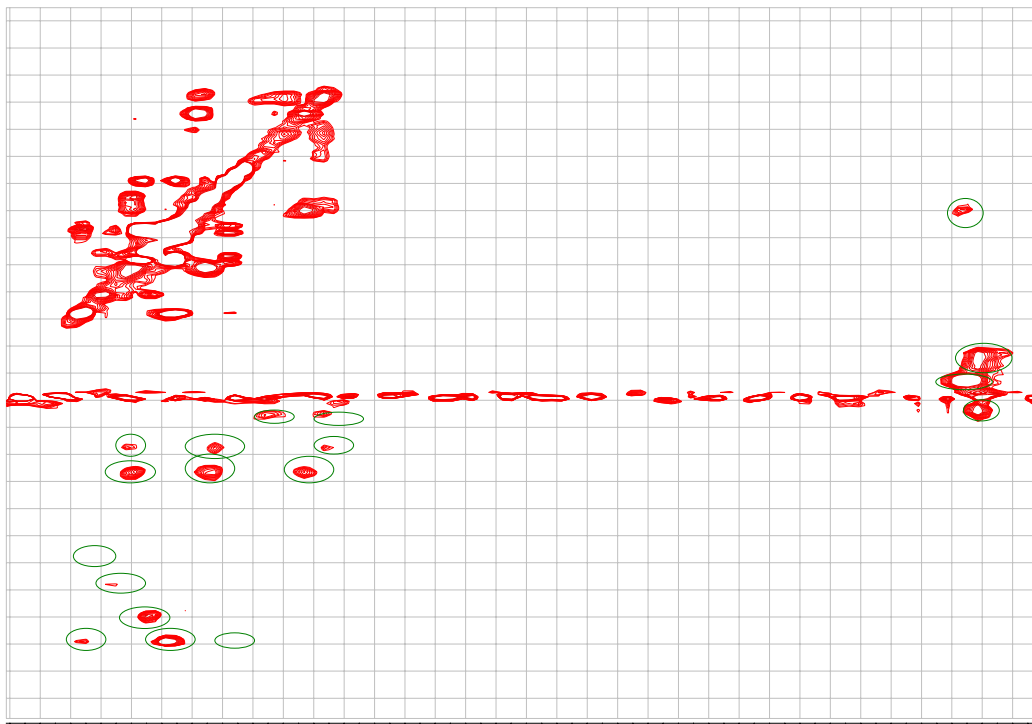


**Figura 3.12** Región anomérica del espectro 2D-TOCSY de la muestra de CA. Se indican las correlaciones entre cada protón anomérico y el protón H2 de cada unidad de monosacárido que se encontraron en 2D-DQF-COSY.

El espectro TOCSY también permitió obtener las correlaciones entre los dos metilos de las fucosas (residuos a y b en Figura 3.6) del CA y algunos protones de su propio anillo de piranosa (Figura 3.13).

Posteriormente, la comparación de los resultados obtenidos con los desplazamientos químicos obtenidos a partir de la base de datos SUGABASE (<http://www.boc.cem.uu.nl/static/sugabase/sugabase.html>) para modelos de disacárido con uniones similares a las encontradas en el ácido colánico permitió una asignación

preliminar del tipo de unidad monosacáridica que corresponde a las señales encontradas en los espectros (Tabla 3.2).

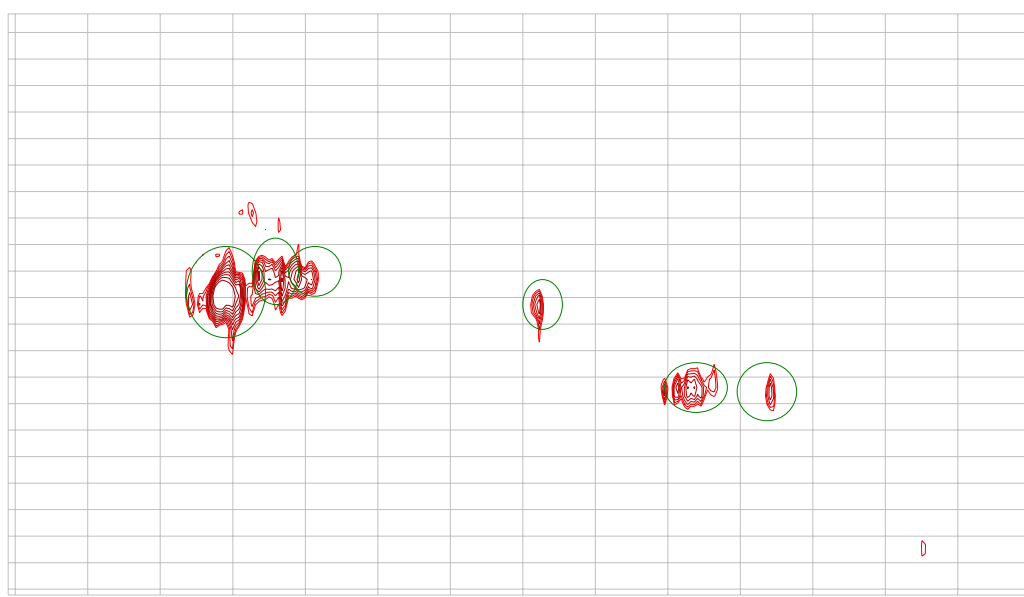


**Figura 3.13** Región del espectro 2D-TOCSY de la muestra de CA. Se señalan las correlaciones con los CH3 de los dos residuos de fucosa.

Los resultados de la Tabla 3.2 muestran que los monosacáridos e y f pueden asignarse con cierta seguridad a monosacáridos del CA, concretamente a las señales a-1 y b-3, respectivamente. Las señales a-2 y a-3 son compatibles con residuos de tipo fucosa en configuración alfa, la unión puede ser tanto  $\text{Fuc}(\alpha 1\text{-}3)$  como  $\text{Fuc}(\alpha 1\text{-}4)$ . Las señales b-1 y b-2 son compatibles con los monosacáridos Glc o GlcA en configuración beta, en la estructura del CA estos residuos sólo pueden tener uniones de tipo  $(\beta 1\text{-}4)$ . La señal b-4 no puede asignarse a ninguno de los monosacáridos del colónico de configuración beta. Esta señal creemos que puede corresponder a un producto de degradación ya que por un lado su señal anomérica tiene baja intensidad en el espectro HSQC de la (Figura 3.8, obtenido con HR-MAS) y, por otro lado, esta señal no apareció en un espectro HSQC obtenido con anterioridad para la misma muestra en una sonda convencional de RMN (sin HR-MAS) (datos no mostrados), mientras que sí que lo hacen el resto de señales anoméricas (Figura 3.14).

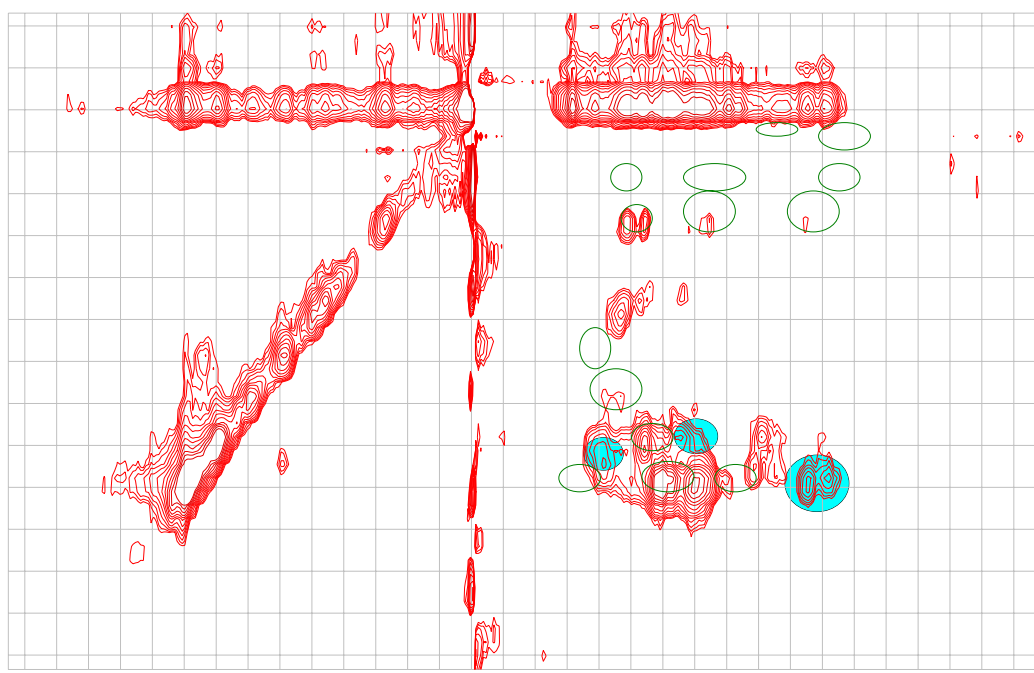
**Tabla 3.2** Asignación preliminar de las señales de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  encontradas mediante HSQC, DQF-COSY y TOCSY en la muestra del CA. La asignación está basada en desplazamientos químicos. Se indican las distintas posibilidades para cada tipo de señal anomérica encontrada con la estructura de la Figura 3.6.

Señales RMN	Asignación Monosacáridos	Residuo Figura 1	H <sub>1</sub> / C1 $\delta(\text{ppm})$	H <sub>2</sub> / C2 $\delta(\text{ppm})$	H <sub>3</sub> a H <sub>6</sub> $\delta(\text{ppm})$
a-1	Gal( $\alpha$ 1->3) Gal( $\alpha$ 1->4)	e e	5.39 / 99.3	3.88 / 70.5	4.16, 3.66
a-2	Fuc( $\alpha$ 1->3) Fuc( $\alpha$ 1->4)	b a	5.27 / 98.1	4.07 / 68.6	
a-3	Fuc( $\alpha$ 1->4) Fuc( $\alpha$ 1->3)	a b	5.32 / 96.3	3.94 / 67.9	
b-1	GlcA( $\beta$ 1->3) Glc( $\beta$ 1->3)	d c	4.75 / 102.4	3.42 / 79.4	4.00, 3.74
b-2	GlcA( $\beta$ 1->3) Glc( $\beta$ 1->3)	d c	4.68 / 102.8	3.35 / 75.5	4.01, 3.73
b-3	Gal( $\beta$ 1->4)	f	4.52 / 101.6	3.53 / 77.5	3.37
b-4	$\beta$	Producto de degradación	5.06 / 99.7	4.13 / 72.5	



**Figura 3.14** Espectro HSQC de la muestra del CA obtenido a 60 °C en una sonda convencional en un espectrómetro de 750 MHz. No aparece la señal anomérica del residuo b-4.

Para poder resolver algunas de las ambigüedades se obtuvo un espectro NOESY a 300 ms (Figura 3.15). En el análisis del espectro NOESY se descartaron las señales de los posibles NOEs intra-residuo (en la misma unidad de monosacárido) que son aquellos previamente detectados en el espectro TOCSY. De todos los picos de cruce del espectro NOESY solamente se detectaron 3 posibles NOEs inter-residuo (entre dos unidades diferentes de monosacárido) y no puede descartarse que alguno o todos ellos se trate en realidad NOEs intraresiduo debido a que no hay suficiente información del desplazamiento químico de todos los protones de cada monosacárido. Los posibles NOEs interresiduo se han señalado en la Figura 3.15. Se trata de los picos de cruce NOE entre a1(protón anomérico)-b1, a2(protón anomérico)-b1 o bien a2(protón anomérico)-b2), y a3(protón anomérico)-b2.



**Figura 3.15** Región anomérica del espectro NOESY obtenido con tiempo de mezcla 300 ms. Se han señalado los picos encontrados en el espectro TOCSY de la Figura 3.12. En azul se señalan tres posibles NOEs inter-residuo.

De acuerdo con la identificación de monosacáridos basada en desplazamiento químico mostrada en la Tabla 3.2, el único NOE interresiduo posible es a3(protón anomérico)-b2. Este NOE tentativamente permite identificar la señal a3 con el residuo b (Figura 3.6) y la señal b2 con el residuo c (Figura 3.6). La presencia de este NOE



interresiduo elimina parte de la ambigüedad en la asignación de los monosacáridos. Estos resultados se muestran en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3** Asignación de las señales de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  encontradas mediante HSQC, DQF-COSY y TOCSY en la muestra del CA. La asignación está basada en desplazamientos químicos y el NOE interresiduo a3(anomérico)-b2. Se indican las distintas posibilidades para cada tipo de señal anomérica encontrada con la estructura de la Figura 1.

Señales RMN	Asignación Monosacáridos	Residuo Figura 1	H <sub>1</sub> / C1 $\delta(\text{ppm})$	H <sub>2</sub> / C2 $\delta(\text{ppm})$	H <sub>3</sub> a H <sub>6</sub> $\delta(\text{ppm})$
a-1	Gal( $\alpha$ 1->3) Gal( $\alpha$ 1->4)	e e	5.39 / 99.3	3.88 / 70.5	4.16, 3.66
a-2	Fuc( $\alpha$ 1->4)	a	5.27 / 98.1	4.07 / 68.6	
a-3	Fuc( $\alpha$ 1->3)	b	5.32 / 96.3	3.94 / 67.9	
b-1	GlcA( $\beta$ 1->3)	d	4.75 / 102.4	3.42 / 79.4	4.00, 3.74
b-2	Glc( $\beta$ 1->3)	c	4.68 / 102.8	3.35 / 75.5	4.01, 3.73
b-3	Gal( $\beta$ 1->4)	f	4.52 / 101.6	3.53 / 77.5	3.37
b-4	$\beta$	Producto de degradación	5.06 / 99.7	4.13 / 72.5	

Los resultados de RMN obtenidos nos permiten proponer una estructura de tipo polisacárido consistente en 6 unidades de monosacárido que es compatible con la estructura del CA. Se han detectado al menos dos residuos de tipo fucosa y la existencia de 3 uniones glicosídicas tipo alfa y otras tantas de tipo beta. La identificación de las señales de los monosacáridos diferentes de fucosa y de las posiciones de unión con el carbono aglicónico se ha basado fuertemente en los desplazamientos químicos que serían esperables para la estructura del CA.

Todos estos resultados nos permiten concluir que *E. coli* K92, una bacteria caracterizada hasta este momento por la formación de PA como estructura capsular (Egan *et al.*, 1977; González-Clemente *et al.*, 1990), es capaz de sintetizar también CA, un polímero capsular que se encuentra ampliamente distribuido entre las Enterobacterias

(Sledjeski y Gottesman, 1996). Aunque anteriormente se ha descrito que las cápsulas del tipo 2 en *E. coli*, como es el caso del ácido polisialico, pueden coexpresarse con el CA (véase Introducción), esta es la primera vez que se describe una cepa de *E. coli* capaz de generar ambos polímeros, PA y CA. Puesto que PA es expresado a temperaturas de crecimiento compatibles con los individuos homeotermos (37°C), sus posibles hospedadores, y que el CA es principalmente sintetizado a temperaturas saprofiticas (20°C), es muy probable que los factores físico-químicos, como la temperatura de crecimiento, ejerzan un papel fundamental en la regulación de la síntesis de ambos polímeros capsulares.

### **3.1.3 Factores físico-químicos que afectan a la producción de polímeros capsulares**

#### **3.1.3.1 Producción de CA en diferentes medios de crecimiento**

Como ya hemos mencionado, en muchos casos, la producción de exopolímeros capsulares bacterianos está influenciada por el medio de cultivo utilizado. Así, la producción de PA se ve notablemente incrementada cuando se emplean medios de cultivo definidos, y concretamente MM Xil-Pro en *E. coli* K1 (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1988b) y MM Xil-Asn en *E. coli* K92 (González-Clemente *et al.*, 1990).

Con objeto de determinar las condiciones nutricionales óptimas para la producción de CA por *E. coli* K92, se desarrollaron cultivos con esta bacteria a 19°C en diferentes medios líquidos tanto químicamente definidos como complejos (véase Materiales y Métodos). En la Tabla 3.4 se muestra la producción de CA alcanzada cuando las bacterias crecieron hasta la fase estacionaria tardía (120 horas aproximadamente). El empleo de medios complejos (LB y TSB) revelaron que no es necesaria una limitación nutricional para que la producción de CA tenga lugar. En estos medios se encontraron niveles intermedios de producción de CA, similares a los obtenidos en medios definidos como MM Fru-Asn o MM Galac-Asn. No obstante, el empleo de medios definidos con glucosa o su derivado glucosamina como fuente de carbono, registró los valores más altos de producción de CA. Cabe destacar la producción obtenida cuando se empleó glucosa y prolina como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente (tanto en valores absolutos de producción como en

producción específica). Este resultado está en concordancia con el fenotipo extremadamente mucoide (como consecuencia de la producción de CA) observado en determinadas cepas de *E. coli* en presencia de glucosa en el medio de cultivo (Junkins y Doyle 1992; Obadia *et al.*, 2007). Por el contrario, el empleo de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno registró los valores más bajos de producción.

**Tabla 3.4** Producción de CA cuando *E. coli* K92 creció en diferentes medios de cultivo a 19°C ( $\pm$  desviación típica)

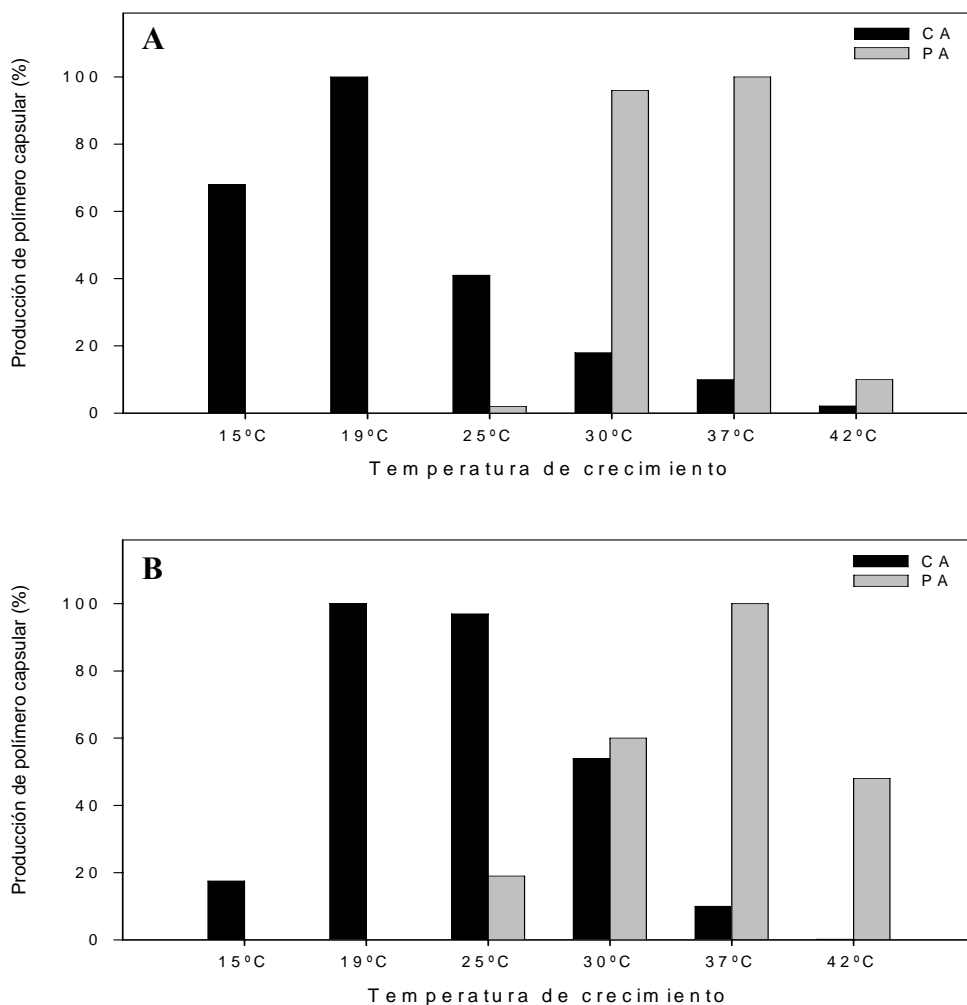
<b>MEDIO</b>	<b>A<sub>540nm</sub> a 120 h de crecimiento</b>	<b>Ácido colánico (µg/ml)</b>	<b>Producción específica <sup>(1)</sup></b>
<b>Glc-Asn</b>	4,48	382±31	82,27
<b>Glc-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	1,52	115±28	75,66
<b>Fru-Asn</b>	4,82	185±12	38,42
<b>GlcNH<sub>2</sub>-Pro</b>	3,95	345±39	87,34
<b>GlcNH<sub>2</sub>-Asn</b>	2,33	280±26	120,20
<b>GlcNH<sub>2</sub>-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	1,15	096±70	83,48
<b>Malt-Asn</b>	4,11	153±11	37,22
<b>Lac-Asn</b>	7,36	325±37	44,15
<b>Galac-Asn</b>	4,46	169±15	37,90
<b>Glc-Pro</b>	7,20	1062±260	147,50
<b>Xil-Asn</b>	5,00	245±41	49,00
<b>Glicerol-Asn</b>	5,75	208±35	36,17
<b>Xil-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,62	025±11	40,32
<b>LB</b>	3,11	180±90	57,88
<b>TSB</b>	3,64	195±14	53,57

<sup>(1)</sup> Producción específica: producción de CA con respecto al crecimiento celular observado a las 120 horas de crecimiento.

Atendiendo a los valores de producción de CA obtenidos se puede concluir que, a pesar de las escasas diferencias observadas en la producción de CA por *E. coli* K92, ésta no parece estar estrictamente regulada por la fuente nutricional utilizada. Es posible que la temperatura de crecimiento sea el factor determinante más importante de la síntesis de este polímero.

### 3.1.3.2 Producción de polímeros capsulares a diferentes temperaturas de crecimiento

Puesto que en *E. coli* K92 la síntesis de PA se encuentra termorregulada (Whitfield, 1999) y que la viscosidad del medio solamente se observó a bajas temperaturas de crecimiento coincidiendo con la producción de CA, nos pareció lógico establecer la influencia que la temperatura de crecimiento podría tener sobre la producción de ambos polímeros capsulares. Para ello, se desarrollaron cultivos de *E. coli* K92 incubados a diferentes temperaturas (entre 15 y 42°C) (Figura 3.16) en los medios de cultivo de máxima producción de CA (MM Glc-Pro) (Tabla 3.4) (A) y PA (MM Xil-Asn) (B) (González-Clemente *et al.*, 1990) durante 120 horas de crecimiento.



**Figura 3.16** Efecto de la temperatura de crecimiento sobre la producción de PA y CA cuando *E. coli* K92 creció en MM Xil-Asn (A) y MM Glc-Pro (B) durante 120 horas de crecimiento. Los valores de CA del 100% corresponden a 245 (A) y 1062  $\mu\text{g/ml}$  (B). Los valores de PA del 100% corresponden a 165 (A) y 36  $\mu\text{g/ml}$  (B).

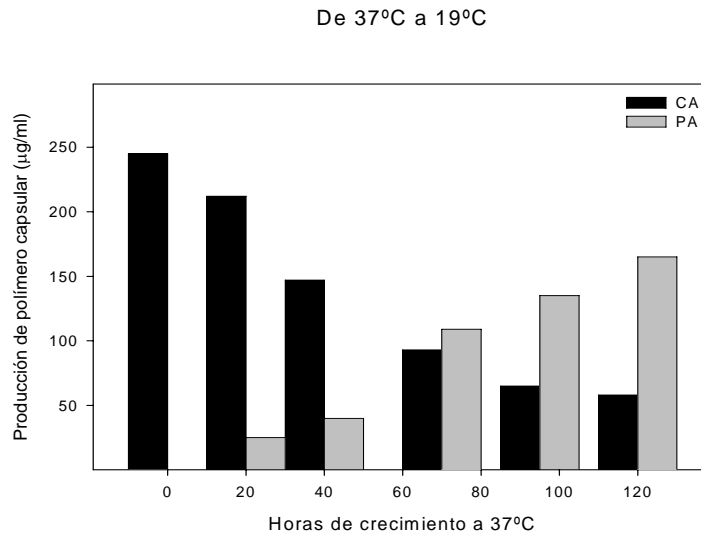
Como se puede observar en la Figura 3.16, el CA es producido por la bacteria a 15°C alcanzándose los mayores valores a 19°C en ambos medios de cultivo. A medida que aumentó la temperatura de crecimiento, la producción de CA disminuyó progresivamente hasta que prácticamente no se observó producción a 42°C. Con respecto a la producción de PA, los mayores valores de producción se observaron a 37°C en ambos medios de cultivo. Sin embargo, como era de esperar no se detectó producción a temperaturas inferiores a 25°C. Estos resultados apoyan la idea de que los mecanismos biosintéticos de ambos polímeros capsulares, en *E. coli* K92, se encuentran estrictamente regulados por la temperatura de crecimiento, de tal forma que este elemento físico puede ser determinante en la regulación selectiva de la producción de ambos polímeros en esta bacteria.

Con objeto de profundizar en el conocimiento de este efecto regulador y determinar si *E. coli* K92 es capaz de adaptarse, a través de la síntesis de ambos tipos de cápsulas, a cambios en la temperatura de crecimiento, se desarrollaron experimentos de crecimiento donde la temperatura se modificó a lo largo de la fermentación. Así, se desarrollaron cultivos de *E. coli* K92 en MM Xil-Asn a 37°C y a diferentes tiempos se transfirieron a 19°C y se incubaron durante 120 horas más. Transcurrido este tiempo se eliminaron las células mediante centrifugación y los caldos de cultivo obtenidos fueron dializados y utilizados para cuantificar las cantidades de PA y CA generadas (Figura 3.17).

Con respecto a la producción de CA y tomando como referencia el tiempo 0 (cuando *E. coli* K92 crece durante 120 horas a 19°C sin previo crecimiento a 37°C), observamos que a medida que aumentamos el tiempo de incubación a 37°C (retrasamos el tiempo de transferencia), la producción de CA disminuyó progresivamente de forma lineal. La producción de CA se vio claramente influenciada por el tiempo de incubación previo de la bacteria a 37°C, de manera que cuanto más tiempo estuvo la bacteria creciendo a 37°C, menos capacidad tuvo posteriormente para producir CA a 19°C (Figura 3.17).

En cuanto a la producción de PA y tomando como referencia el tiempo 120 horas (cuando *E. coli* K92 crece durante 120 horas a 37°C y 120 horas más a 19°C), se observó un comportamiento similar, aunque opuesto. En este caso, la posterior

incubación a 19°C no influyó sobre la producción de PA y ésta solamente dependió del tiempo de incubación previo de la bacteria a 37°C, de manera que cuanto más tiempo permaneció la bacteria creciendo a 37°C, más producción de PA se detectó.

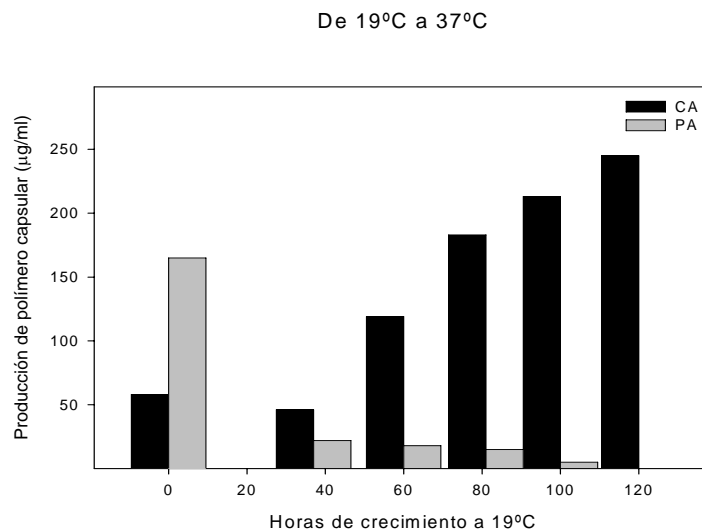


**Figura 3.17** Efecto de la temperatura sobre la producción de polímeros capsulares en cultivos de *E. coli* K92 incubados a 37°C en MM Xil-Asn durante diferentes tiempos y posteriormente transferidos a 19°C e incubados durante 120 horas más. Nota: después del crecimiento celular a 37°C durante diferentes horas, todos los cultivos fueron posteriormente incubados a 19°C durante 120 horas más. Tiempo 0 significa ausencia de crecimiento a 37°C.

De la misma manera que en el experimento anterior, se desarrollaron cultivos de *E. coli* K92 en MM Xil-Asn a 19°C y a diferentes tiempos se transfirieron a 37°C durante 120 horas más. Se observó que, al igual que ocurría en el caso anterior con respecto a la producción de PA, la producción de CA solo parecía depender del tiempo de incubación de la bacteria a 19°C (Figura 3.18). De esta manera, cuanto mayor es éste, más producción de CA se observó. Aunque *E. coli* K92 es capaz de sintetizar pequeñas cantidades de CA a 37°C (Figura 3.16), la bacteria produjo prácticamente la misma cantidad de CA cuando solamente estuvo creciendo durante 120 horas a 19°C que cuando estuvo, además, 120 horas más a 37°C. Esto pudiera ser debido a que después de tantas horas de crecimiento, los nutrientes se encuentran agotados lo que bloquea el crecimiento de las bacterias y, en consecuencia, la producción de polímeros capsulares.

Con respecto a la producción de PA se observó que la incubación previa a 19°C tuvo un efecto mucho más drástico sobre la producción de PA (Figura 3.18), de tal

manera que cuando la bacteria permaneció a 19°C durante más de 40 horas, prácticamente no recuperó la capacidad para producir PA a 37°C.



**Figura 3.18** Efecto de la temperatura sobre la producción de polímeros capsulares en cultivos de *E. coli* K92 incubados a 19°C en MM Xil-Asn durante diferentes tiempos y posteriormente transferidos a 37°C e incubados durante 120 horas más. Nota: después del crecimiento celular a 19°C durante diferentes horas, todos los cultivos fueron posteriormente incubados a 37°C durante 120 horas más. Tiempo 0 significa ausencia de crecimiento a 19°C.

Estos resultados permiten concluir que, a través de la temperatura de crecimiento, *E. coli* K92 es capaz de regular recíprocamente la biosíntesis de PA y CA para adaptarse a las diferentes situaciones ambientales en las que pueda encontrarse. Así, el hecho de que *E. coli* K92 pueda recobrar parcialmente la capacidad para sintetizar CA a 19°C previa incubación a 37°C está en concordancia con el papel que el CA juega en la auto-preservación y adaptación de la bacteria a condiciones medioambientales hostiles (Mao *et al.* 2001; Chen *et al.* 2004; Mao *et al.*, 2006). La potencialidad de sintetizar PA a 37°C está de acuerdo con su capacidad infectiva y la implicación de este polímero capsular en los mecanismos de enmascaramiento, resistencia a la fagocitosis y supervivencia dentro del hospedador (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1992; Roth *et al.*, 1992; Charland *et al.*, 1996). Sin embargo, el hecho de que la bacteria pierda casi por completo la capacidad para sintetizar PA a 37°C previo crecimiento a 19°C durante al menos 40 horas (cuando aún se encuentra en los primeros estadios de crecimiento) (Figura 3.18), nos permite suponer que la regulación de la síntesis de ambos polímeros capsulares (CA y PA) en este microorganismo es diferente.

## 3.2 Caracterización morfológica y significado biológico de las estructuras capsulares de *E. coli* K92

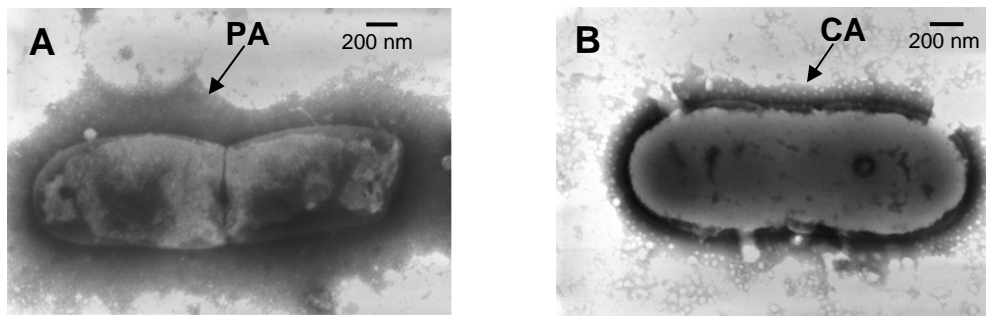
### 3.2.1 Estudio morfológico de las estructuras capsulares sintetizadas por *E. coli* K92

En general, el empleo de medios de cultivo diferentes para el crecimiento de celular provoca variaciones en cuanto al aspecto y características morfológicas de los microorganismos generados. De esta manera, una determinada cepa bacteriana puede llegar a presentar aspectos muy diferentes, simplemente modificando la composición del medio de cultivo o las condiciones físicas utilizadas para el crecimiento. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han revelado que *E. coli* K1 muestra dos tipos morfológicos celulares diferentes, dependiendo de las características físicas del medio de crecimiento empleado (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1988b). El aspecto microscópico que presenta esta cepa cuando crece en medio sólido es irregular y anormalmente grande y con tendencia a agregarse en grupos compactos. Sin embargo, cuando crece en medio líquido, las bacterias aparecen aisladas y con un aspecto más bacilar, típico de la familia Enterobacteriaceae. El efecto de lavado provocado por el medio líquido en agitación provoca la liberación del PA capsular generado y evita su acumulación en el entorno celular, desnudando la pared celular e impidiendo la formación de los agregados celulares que se observan en medio sólido (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1988b).

Como ya se ha descrito y demostrado (véase apartado 3.1), *E. coli* K92 produce dos tipos de polímeros (PA y CA) y en base a diferencias en la temperatura de crecimiento es capaz de regular la producción diferencial de cada uno de ellos. Esta mayor versatilidad, sugiere que, en el caso de la bacteria que nos compete, la génesis y acumulación de cada uno de los polisacáridos capsulares que sintetiza, provoque la formación de microorganismos morfológicamente diferentes, utilizando el mismo medio y variando solamente la temperatura de crecimiento. Con objeto de establecer si la presencia de uno u otro polímero capsular genera la variabilidad fenotípica esperada, mediante microscopía electrónica de transmisión se estudió el aspecto de las células de *E. coli* K92, obtenidas por crecimiento (72 horas) en medio sólido (TSA) a 37°C y 19°C. Como ya se ha demostrado en *E. coli* K1 (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1988b), al crecer



en medio sólido se evita el desprendimiento del polisacárido que rodea a la bacteria pudiendo tener una visión global de la célula con su cápsula y de su contorno. Así, podremos establecer las posibles diferencias en *E. coli* K92 generadas, principalmente, por el tipo de polímero capsular producido.



**Figura 3.19** Microfotografías tomadas de las estructuras capsulares originadas por *E. coli* K92 crecida a 37°C (A) y 19°C (B) en medio TSA durante 72 horas y visualizadas mediante tinción negativa con ácido fosfotúngstico y microscopía electrónica de transmisión. Las flechas indican la presencia de PA y CA. Cabe señalar que no se observó ninguna estructura capsular cuando la bacteria creció en medio líquido con agitación.

Como podemos observar en la Figura 3.19A, la cápsula de PA que envuelve a *E. coli* K92 tiene un aspecto flexible y mucilaginoso y contrasta, en cierta medida, con la apariencia mucho más compacta y rígida de la cápsula de CA que rodea a la bacteria (Figura 3.19B). Estas claras diferencia fenotípicas pueden estar íntimamente relacionadas con las funciones que parecen desempeñar estas estructuras capsulares en las bacterias. Por un lado, el hecho de que determinadas condiciones inicialmente adversas, como la desecación, el *shock* osmótico o las bajas temperaturas de crecimiento, favorezcan la biosíntesis de CA sugiere que el papel biológico de este polímero capsular se encuentre relacionado con un estilo de vida saprofito fuera de cualquier organismo hospedador (Majdalani y Gottesman, 2005), de tal forma que protege frente a esas condiciones hostiles. Aunque no está claro como el CA protege a las células de *E. coli*, es posible que la barrera física creada por el CA alrededor de la bacteria sea suficiente para proteger al microorganismo frente a daños externos (Chen *et al.*, 2004).

Por otro lado, el hecho de que las cápsulas de PA sean principalmente sintetizadas a la temperatura del hospedador humano concuerda con el papel de protección frente a los sistemas de defensa biológicos de este tipo de cápsulas y con su perfecta adaptación a la vida dentro del hospedador. En este caso, no sería necesaria una estructura capsular rígida y compacta como la del CA para que la bacteria se aisle físicamente del medio que la rodea, sino que al contrario, la bacteria necesita mimetizarse en el hospedador y es posible que el aspecto difuso y flexible observado en la cápsula de PA confiera una determinada ventaja en este sentido.

De este modo, cada polímero parece cumplir su posible función en *E. coli* K92 de maneras diferentes a través de un sistema de control perfectamente coordinado por la temperatura de crecimiento. Así, la expresión de CA a bajas temperaturas actuaría como una barrera mecánica en un entorno saprofítico mientras que la síntesis de PA a más altas temperaturas protegería al microorganismo biológicamente frente a las defensas del hospedador cuando se comporta como parásito.

### 3.2.2 Significado biológico del PA y CA en *E. coli* K92

Como ya hemos mencionado anteriormente, parece evidente que la expresión de una cápsula confiere una ventaja selectiva a la bacteria en una gran variedad de medios naturales y, de un modo u otro, aumenta su supervivencia (Beveridge *et al.*, 1988; Cobertt y Roberts, 2008). Como hemos indicado en el apartado anterior, el papel biológico de ambos polímeros capsulares parece ser defensivo aunque sus modos de acción resultan diferentes: uno mecánico (el CA) y otro molecular y fisiológico (el PA). Aunque las funciones de las cápsulas de PA en los microorganismos parecen estar bien establecidas (Vimr y Lichtensteiger, 2002; Vimr *et al.*, 2004; Corbett y Roberts, 2008), hasta el momento no se sabe con certeza cual es el significado biológico que tiene el CA en las células que lo producen y, concretamente, en *E. coli* K92. Ya que esta bacteria es capaz de sintetizar ambos polímeros capsulares, hemos tratado de esclarecer si el CA confiere alguna ventaja selectiva a *E. coli* K92.

En este apartado, hemos tratado de averiguar la capacidad de protección de ambos polímeros capsulares, PA y CA, frente a dos condiciones de crecimiento adversas como son el estrés osmótico y el estrés oxidativo. Además, hemos estudiado la posible implicación de ambos polímeros capsulares en la adhesión de las células a

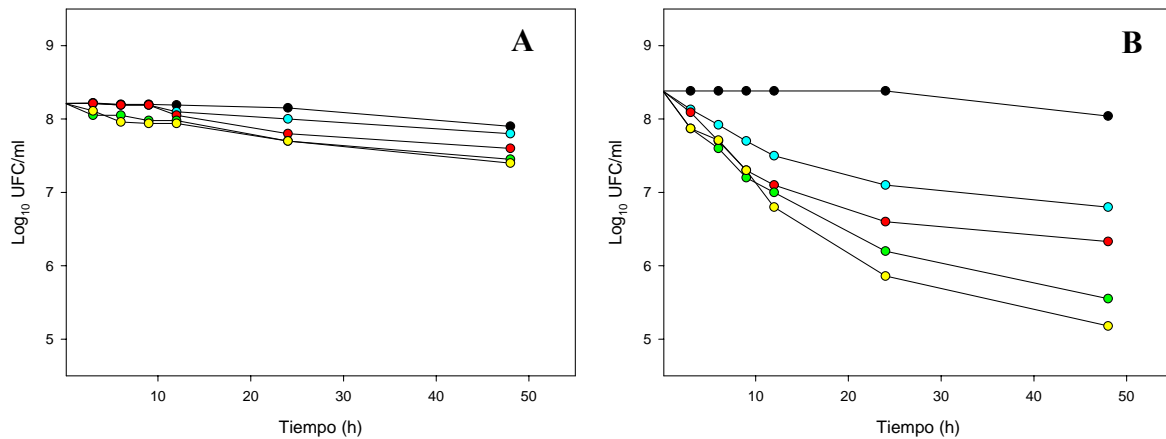
placas de poliestireno utilizadas como sustrato inerte. El potencial papel protector del CA frente a condiciones medioambientales hostiles y el hecho de que una bacteria sea capaz de adherirse a determinadas superficies y/o de formar biofilms supone una gran ventaja en la colonización de nuevos nichos ecológicos. Finalmente, se estudió la capacidad inmunogénica del CA y su posible participación en la modulación de procesos inflamatorios en ratones provocados por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*.

### 3.2.2.1 Resistencia al estrés osmótico y oxidativo del PA y CA

Como hemos indicado anteriormente, entre las posibles ventajas que las cápsulas de CA confieren a las bacterias está la de protección frente al estrés osmótico y oxidativo (Chen *et al.*, 2004). Sin embargo, en este sentido, se desconoce si las cápsulas de PA pueden proteger a la bacteria bajo estas condiciones hostiles.

En primer lugar, estudiamos el posible papel protector del CA y/o PA en *E. coli* K92 frente a condiciones de estrés osmótico. Para ello, se desarrollaron cultivos de *E. coli* K92 en medio LA a 37°C o 19°C durante 24 horas, se recogieron las células y se incubaron a temperatura ambiente en MM con Glc (sin fuente de nitrógeno para evitar el crecimiento celular) en presencia de diferentes concentraciones de NaCl.

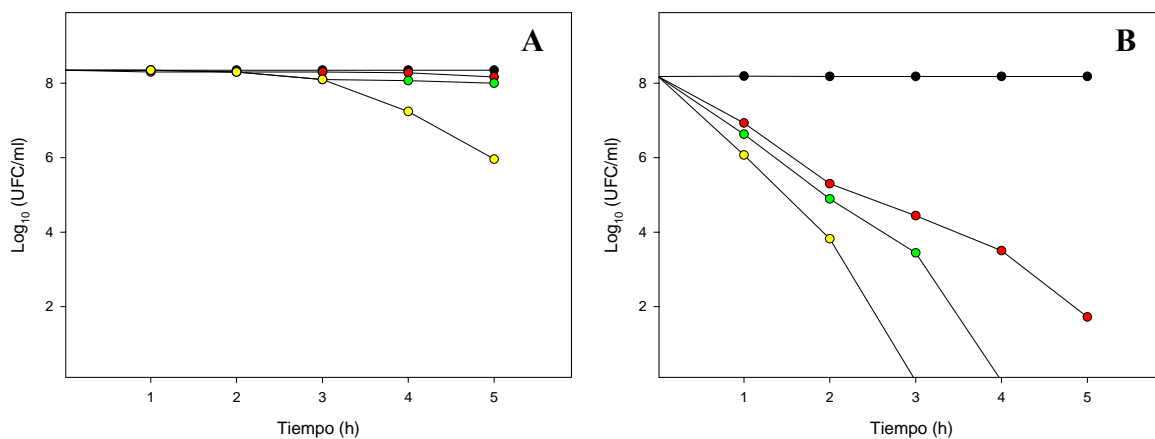
Observando la Figura 3.20, vemos que en ausencia de NaCl, la supervivencia de las células de *E. coli* K92 crecidas tanto a 19°C como a 37°C no fue significativamente influenciada por el medio de cultivo empleado. En el caso de las células crecidas a 37°C (Figura 3.20A), la presencia de concentraciones crecientes de NaCl apenas afectó a la viabilidad de estas células incluso después de 48 horas de incubación. Sin embargo, no ocurrió lo mismo en el caso de las células crecidas a 19°C (Figura 3.20B), en las cuales la presencia de NaCl afectó de manera significativa a la viabilidad de las células. Así, observamos que desde las primeras horas de incubación en presencia de NaCl, el número de células viables procedentes de cultivos de *E. coli* K92 previamente incubados a 19°C disminuyó significativamente, apreciándose un descenso de 1,4 y 3 órdenes de magnitud en presencia de 1 y 2,5 M de NaCl respectivamente tras 48 horas de crecimiento.



**Figura 3.20** Supervivencia de *E. coli* K92 en MM con Glc y sin fuente de nitrógeno conteniendo diferentes concentraciones de NaCl (0 M: negro; 1 M: azul; 1,5 M: rojo; 2 M: verde; 2,5 M: amarillo) a temperatura ambiente. Las células fueron previamente crecidas a 37°C (A) y 19°C (B) en medio LA durante 24 horas.

Del mismo modo que en el caso anterior, estudiamos la capacidad que puedan tener PA y CA para proteger a *E. coli* K92 frente a condiciones de estrés oxidativo. Para ello, las células obtenidas de igual modo que en el caso anterior fueron incubadas a temperatura ambiente en MM con Glc (sin fuente de nitrógeno para evitar el crecimiento celular) en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

En el caso de las células crecidas a 37°C (Figura 3.21A), fue necesaria la utilización de altas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (20 mM) para que se viera afectada la viabilidad de las células a partir de las 4 horas de incubación. Sin embargo, las células crecidas a 19°C fueron mucho más susceptibles a la presencia de este agente oxidante. Como podemos ver en la Figura 3.21B, una concentración de 10 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue suficiente para observar una reducción en torno a un orden de magnitud en la primera hora de incubación. Esta disminución en el número de células viables crecidas a 19°C fue incrementándose proporcionalmente al aumento del tiempo de incubación en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y su concentración, de tal manera que entre las 3 y las 4 horas de incubación con 15 mM y 20 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  respectivamente ya no se encontraron células viables.



**Figura 3.21** Supervivencia de *E. coli* K92 en MM con Glc y sin fuente de nitrógeno conteniendo diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 mM: negro; 10 mM: rojo; 15 mM: verde; 20 mM: amarillo) a temperatura ambiente. Las células fueron previamente crecidas a 37°C (A) y 19°C (B) en medio LA durante 24 horas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos concluir que las células de *E. coli* K92 cultivadas a 19°C fueron mucho más susceptibles que las células previamente cultivadas a 37°C a ambos tratamientos, aunque estas diferencias fueron más acusadas cuando se empleó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente estresantes.

A pesar de lo que se había descrito anteriormente, estos experimentos sugieren que la expresión de cápsulas de PA ha mostrado ser más eficiente que la expresión de cápsulas de CA en la protección de la bacteria frente al estrés causado por los compuestos NaCl y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hasta el momento, no se ha descrito ninguna función de las cápsulas de PA en cuanto a protección de la bacteria fuera del hospedador. Sin embargo, al igual que se ha sugerido para las cápsulas de CA, es posible que el carácter negativo de ambos tipos de cápsula ayude a prevenir daños en la bacteria. De este modo, ambos polímeros serían protectores frente al estrés osmótico y oxidativo por lo que los resultados obtenidos en estos experimentos, mostrarían simplemente las diferencias entre una mayor o menor capacidad protectora. Como veremos más adelante, la obtención y utilización de una cepa mutante de *E. coli* K92 deficiente en CA nos ayudará a aclarar este punto.

### 3.2.2.2 Implicación del PA y CA en la adhesión de *E. coli* K92 a poliestireno

La formación de biofilms confiere una ventaja importante a la bacteria que lo produce a la hora de colonizar nuevos hábitats. Diferentes autores han descrito que existe una relación entre determinadas bacteria capaces de producir CA y su capacidad para formar biofilms, de tal manera que parece que el CA inhibe las primeras fases del desarrollo del biofilm, y sin embargo, favorece la formación de biofilms maduros (Hanna *et al.*, 2003).

Con el fin de estudiar la capacidad que *E. coli* K92 tiene para adherirse a través de la síntesis de ambos polímeros capsulares, se evaluó la unión de células de *E. coli* K92 expresando PA o CA a placas de poliestireno, las cuales fueron utilizadas en este trabajo como modelo de superficie abiótica. Para ello, se desarrollaron cultivos de esta bacteria en medio LA a 37°C y 19°C durante 24 horas. A continuación, se resuspendieron las células en medio LB y se utilizaron para inocular placas de poliestireno de 24 pocillos. El cultivo se mantuvo durante 72 horas a temperatura ambiente para permitir la adhesión y, finalmente, se cuantificó la formación de biofilms tal y como se describe en el apartado 2.2.14.4.

Como podemos observar en la Tabla 3.5, las células de *E. coli* K92 previamente crecidas a 19°C (expresando CA) mostraron unos valores de adhesión significativamente mayores que en el caso de las células previamente crecidas a 37°C (expresando PA), a excepción de cuando se inocularon  $10^9$  células iniciales, en cuyo caso, el efecto fue menor posiblemente por sobresaturación del fondo del pocillo.

**Tabla 3.5** Evaluación de la formación de biofilm en *E. coli* K92 previamente crecida a 37°C o 19°C durante 24 horas en medio LA y posteriormente incubadas en placas de poliestireno de 24 pocillos durante 72 horas. El porcentaje de adherencia está expresado como la relación de la biomasa de células adheridas con respecto a la biomasa total de las células: (porcentaje de adherencia) = (biomasa de células adheridas)/(biomasa total de células) x 100.

	Cantidad de células iniciales			
	$10^9$	$10^8$	$10^7$	$10^6$
37°C	23%	30%	28%	31%
19°C	25%	36%	34%	36%

Estos resultados revelan, por primera vez, que *E. coli* K92 es capaz de formar biofilms en superficies de poliestireno y nos permiten sugerir una mayor implicación del CA con respecto del PA en la adhesión de *E. coli* K92 a las placas de poliestireno. El hecho de que la síntesis de CA esté relacionada con la vida de la bacteria fuera del hospedador permite suponer que este polímero ejerce una ventaja selectiva en esas condiciones. En este caso, la mayor adhesión encontrada en presencia de CA hace suponer que este tipo de cápsulas favorecen de alguna manera la unión a diversos sustratos. Al igual que en el caso anterior, la construcción de un mutante de *E. coli* K92 deficiente en CA nos ha permitido comprender mejor el papel del CA en la adhesión de *E. coli* K92 a diferentes sustratos, cuyos resultados se mostrarán más adelante.

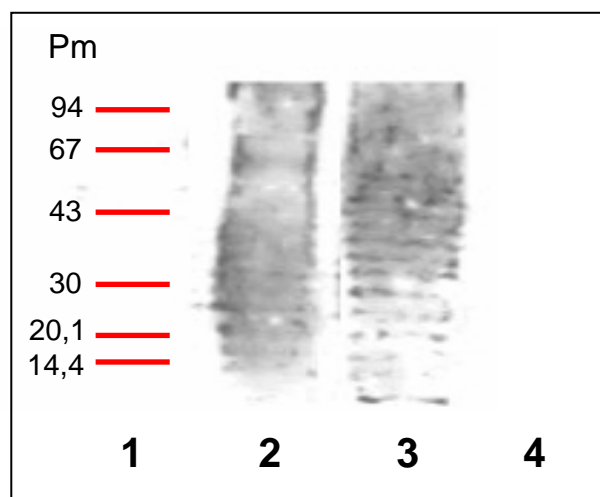
### 3.2.2.3 Análisis inmunogénico del CA

El papel y la importancia que determinados polímeros capsulares juegan en la patogenicidad de varias cepas de *Escherichia coli* ha sido bien establecido. Así, alrededor del 80% de las meningitis neonatales y un buen número de bacteremias e infecciones del tracto urinario son causadas por cepas que contienen PA en su estructura capsular (McCracken *et al.*, 1974; Sarff *et al.*, 1975; Kaijser *et al.*, 1977). Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron el leve pero significativo carácter inmunogénico que presenta el polímero capsular formado por restos de Neu5Ac sintetizado por *E. coli* K1 y *E. coli* K92 cuando crecen a 37°C (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1992). Sin embargo, esta leve capacidad inmunogénica, obtenida con la utilización de adyuvantes que intensifican la respuesta inmune, no es la que fisiológicamente debería tener. La similitud estructural del PA con las cadenas polisialiladas de algunas glicoproteínas implicadas en los procesos de desarrollo y diferenciación celular (N-CAM) provoca un escaso carácter inmunogénico de las cápsulas de PA, lo que les permite evadir los sistemas de defensa del hospedador facilitando la colonización de los mismos (Orskov *et al.*, 1977; Roth *et al.*, 1992).

Aunque determinados autores han señalado cierta capacidad inmunogénica del CA de *E. coli* (Goebel, 1963), decidimos comprobar la capacidad que el CA producido por *E. coli* K92 tiene para estimular los sistemas de defensa en conejos albinos. Una muestra de CA purificado se utilizó para estimular la formación de anticuerpos específicos en conejos (véase Materiales y Métodos). Los sueros obtenidos tras el proceso de inmunización y analizados mediante *Dot-Blot* mostraron un título de 1/5000,

un valor significativamente alto e inesperado. Mediante *Western-Blot* estudiamos el patrón de bandas que este suero presentaba al reaccionar frente a una muestra de CA utilizada como inmunógeno. Como se puede observar en la Figura 3.22, este patrón fue similar al obtenido cuando el suero se incubó con una muestra de LPS obtenido a partir de cultivos de *E. coli* K92 a 19°C. Adicionalmente, cuando a una réplica electroforética del CA parcialmente purificado se le realizó una tinción con plata pudimos observar un patrón de bandas similar al del LPS de la bacteria (datos no mostrados).

Atendiendo a estos resultados, pudimos establecer que el protocolo de purificación inicial no nos permitió eliminar completamente la fracción lipopolisacáridica, una fracción minoritaria pero altamente inmunogénica (Vanlandschoot *et al.*, 2005) frente al cual reacciona el suero inmune que hemos obtenido. Así pues, para llevar a cabo este estudio, fue necesaria la eliminación total del LPS como contaminante del CA. El tratamiento del CA con ácido acético (ver Materiales y Métodos) eliminó completamente el LPS de las muestras del polisacárido purificado. Utilizando el CA tratado con ácido acético, observamos, tanto por *Dot-Blot* como por *Western-Blot*, que el suero hiperinmune obtenido, no reaccionaba con el polímero ni siguiera cuando se utilizó como título del suero hiperinmune 1/100 (Figura 3.22).



**Figura 3.22** Análisis inmunoquímico del CA de *E. coli* K92. 1) Marcadores de bajo peso molecular expresados en kDa. 2) Muestra de CA purificado (1mg/ml). 3) LPS de *E. coli* K92. 4) Muestra de CA (1mg/ml) purificado y deslipidizado. Para las muestras 2, y 3 se utilizó un título de anticuerpo de 1/5000 y para la muestra 4 de 1/100 del suero obtenido frente a la inmunización frente a CA parcialmente purificado.



El hecho de que el CA totalmente purificado (libre de la fracción lipopolisacáridica) no reaccione con el suero obtenido en las condiciones anteriormente descritas, pone de manifiesto que dicho polímero no interviene en la estimulación del sistema inmune del hospedador mostrando una nula capacidad inmunogénica, menor aún que la registrada para el PA (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1993). La simple presencia de una pequeña fracción lipopolisacáridica es suficiente para desencadenar la respuesta inmune y enmascarar la baja o nula capacidad inmunogénica del CA. No obstante y con objeto de asegurar que el LPS no enmascara la posible capacidad inmunogénica del CA, el CA purificado (libre de LPS) se utilizó para la inmunización de conejos. Diferentes diluciones (entre 1:50 y 1:5000) de los sueros obtenidos se analizaron mediante *Dot-Blot* observando, en todos los casos, resultados negativos. Así, podemos concluir que el CA producido por *E. coli* K92 no tiene capacidad para estimular el sistema inmune del hospedador, al menos en los conejos utilizados en este trabajo.

#### **3.2.2.4 Determinación de la capacidad del CA para modular la inflamación debida a infección con *Borrelia burgdorferi*.**

Los mucopolisacáridos son un grupo de polímeros diversos de Pm muy variado, en cuya estructura alternan un aminoazúcar acetilado y un ácido urónico. Los mucopolisacáridos son muy importantes en los animales superiores y forman disoluciones viscosas, como el humor vítreo, el líquido sinovial, determinados cementos intercelulares y tejidos fuertes y elásticos como los cartílagos y los tendones (Primo, 1995).

El ácido hialurónico es un mucopolisacárido lineal de alta viscosidad formado por ácido glucurónico y N-acetil-D-glucosamina responsable de la viscoelasticidad del líquido sinovial. Debido sus las propiedades lubricantes y amortiguadoras, este mucopolisacárido se usa de modo terapéutico para tratar pacientes con osteoartritis, los cuales sufren una disminución de las propiedades viscoelásticas del líquido sinovial por diferentes motivos. La viscosuplementación consiste en la administración de inyecciones intraarticulares de soluciones viscosas de hialuronato o sus derivados con el objeto de restablecer las propiedades reológicas del líquido sinovial alterado en la articulación artrósica, posiblemente, estimulando la síntesis endógena de más hialuronato (Balazs y Delinger, 1993). Aunque su mecanismo de acción parece confuso,

el aumento de la elasticidad y viscosidad del líquido sinovial parecen tener un papel primordial para el tratamiento de la osteoartritis (Vengud *et al.*, 2000; Bagga *et al.*, 2006).

Aprovechando una estancia de corta duración en el laboratorio del Dr. Anguita perteneciente al Departamento de Veterinaria y Ciencias Animales de la Universidad de Massachusetts (Amherst, MA, EEUU), nos pareció interesante analizar la capacidad que el CA podría tener para modular la inflamación debida a la infección por *Borrelia burgdorferi* en ratones de la cepa C3H/HeN. El Dr. Anguita es especialista en el estudio de los procesos de inflamación provocados por la infección de esta espiroqueta por lo que disponíamos del asesoramiento y de las técnicas adecuadas para realizar este estudio. De este modo, grupos de ratones infectados con *B. burgdorferi* fueron tratados con CA purificado (deslipidizado). Después de dos semanas, tiempo en el que se presenta el pico de la enfermedad (caracterizado, entre otros síntomas, por la inflamación de las articulaciones), los ratones fueron analizados atendiendo al desarrollo de la inflamación, la respuesta de anticuerpos frente a *B. burgdorferi*, la producción de citoquinas proinflamatorias y la respuesta mediada por los linfocitos Th1.

Previamente, los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 fueron expuestos al CA con objeto de asegurarnos la ausencia total de LPS en la muestra. La ausencia de estimulación de los macrófagos medida mediante el aumento en la producción de la citoquina TNF $\alpha$  corroboró definitivamente la ausencia de cualquier sustancia con carácter inmunogénico en la muestra de CA.

#### **3.2.2.4.1 Desarrollo de la inflamación**

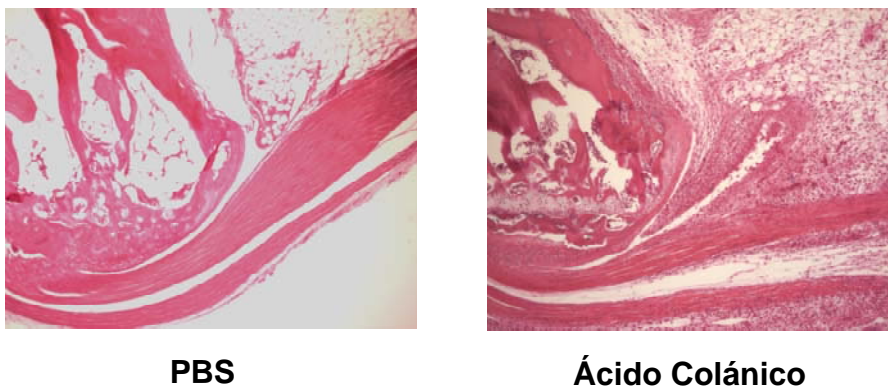
Como primer paso del estudio, se evaluó el grado de inflamación del tobillo (artritis) y del corazón (carditis) para comprobar si el CA originó cambios en la sintomatología típica de esta enfermedad.

Atendiendo a la Tabla 3.6, el tratamiento con CA no afectó a la inflamación del corazón originada por la espiroqueta. Sin embargo, la presencia de CA en los ratones infectados con *B. burgdorferi* produjo un aumento significativo de la inflamación del tobillo.

**Tabla 3.6** Balance del grado de artritis y carditis encontrado en los ratones infectados con *B. burgdorferi* en presencia y ausencia de CA.

Grupo	Ratones infectados (Positivos/Total)	Artritis (Media $\pm$ DE)	Carditis (Media $\pm$ DE)
PBS	9/9	1.6 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.1
CA	9/9	2.4 $\pm$ 0.2*	1.1 $\pm$ 0.1

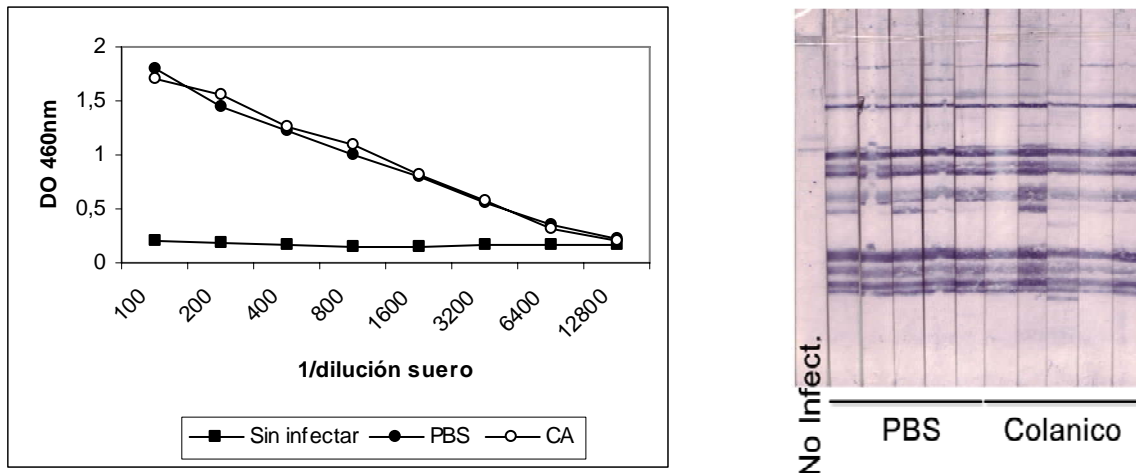
La visualización de las extremidades fijadas con formalina y descalcificadas reveló, en el ratón infectado y tratado con CA, la existencia de una infiltración masiva de neutrófilos con implicación del tendón, hiperplasia y fuerte infiltración en la membrana sinovial y afectación del hueso (Figura 3.23), lo que corresponde a un caso con un grado de inflamación +3.



**Figura 3.23** Cortes histológicos teñidos con hematoxilina/eosina de muestras del hueso calcáneo con el talón de Aquiles y el tejido sinovial de ratones de la cepa C3H/HeN previamente infectados con *B. burgdorferi* sin tratar (izquierda) y tratados con CA (derecha).

#### 3.2.2.4.2 Respuesta de anticuerpos

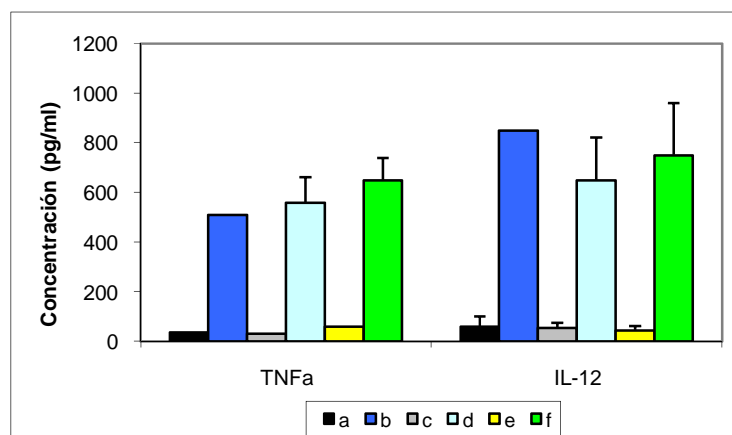
El análisis de la respuesta humoral a antígenos de *B. burgdorferi* se analizó mediante ELISA. La Figura 3.24 (izquierda) muestra que no hubo diferencias en la generación de una respuesta de anticuerpos fuerte en los dos grupos de ratones infectados (tratados o no con CA). Tampoco se observaron diferencias significativas en los antígenos reconocidos por el suero como consecuencia del tratamiento (Figura 3.24 derecha).



**Figura 3.24** Análisis de los sueros de ratones infectados con *B. burgdorferi* tratados y sin tratar con CA mediante ELISA (Izquierda). Patrón de bandas obtenido mediante *Western-Blot* de los antígenos de *B. burgdorferi* reconocidos por ambos sueros (Derecha).

### 3.2.2.4.3 Producción de citoquinas proinflamatorias por células inmunes innatas (TNF e IL-12)

Para analizar la respuesta de las células del sistema inmune innato frente a *B. burgdorferi*, se procedió a la estimulación de esplenocitos de ratones infectados con extracto de *B. burgdorferi*.

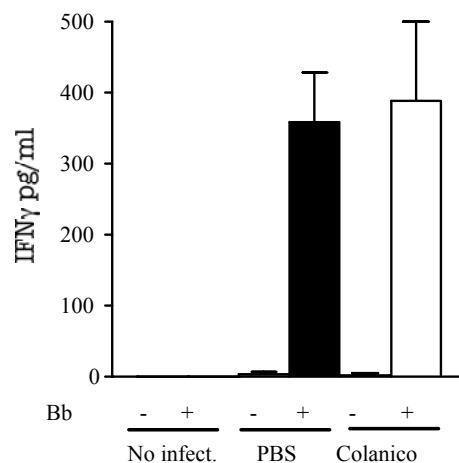


**Figura 3.25** Cuantificación mediante ELISA de la producción de TNF $\alpha$  e IL-12 de los esplenocitos de ratones sin infectar y sin estimular (a); sin infectar y estimulados (b); infectados, tratados con PBS, sin estimular (c) y estimulados (d); infectados, tratados con CA, sin estimular (e) y estimulados (f).

Como vemos en la Figura 3.25, el tratamiento con CA no originó diferencias significativas en la producción de TNF ni IL-12 entre los ratones infectados con *B. burgdorferi* en cualquiera de las condiciones probadas, con lo que podemos concluir que el CA no afectó a la respuesta inmune del ratón, al menos a nivel de estas citoquinas.

#### 3.2.2.4.4 Desarrollo de respuesta Th1 (IFN $\gamma$ )

Para comprobar si el CA estaba influenciando la respuesta inmune de los ratones a otros niveles, analizamos el desarrollo de la respuesta de los linfocitos Th1 a *B. burgdorferi* durante la infección. Para ello, procedimos al análisis de esta citoquina en esplenocitos re-estimulados con antígenos de *B. burgdorferi*. Observando la Figura 3.26, vemos que el CA tampoco produjo diferencias significativas en la producción de IFN $\gamma$  por los linfocitos Th1 de ratón previamente reestimuladas.



**Figura 3.26** Cuantificación mediante ELISA de la producción de IFN $\gamma$  de los esplenocitos de ratones sin infectar con *B. burgdorferi*, infectados y sin tratar e infectados y tratados con CA. En todos los casos se vieron las posibles diferencias de los esplenocitos sin estimular y reestimulados con antígenos de *B. burgdorferi*.

Atendiendo a estos resultados, sugerimos que el CA favorece la migración de las bacterias a la zona del tejido inflamado del tobillo y, en consecuencia, se produce un incremento en el número de neutrófilos. Sin embargo, el CA parece actuar sin afectar al desarrollo de la respuesta inmune ni mediante IL-12, TNF $\alpha$  o IFN $\gamma$ . En el futuro, sería conveniente tratar de profundizar en las causas que provocaron este comportamiento en presencia de CA.

### **3.3 Análisis molecular de la biosíntesis y regulación de los polímeros capsulares producidos por *E. coli* K92**

Las bacterias tienen la capacidad para percibir agudamente y responder específicamente a una gran cantidad de estímulos medioambientales como, por ejemplo, la temperatura del medio (Cotter y Miller, 1998; Mahan *et al.*, 1996). Mecanismos sensores elaborados han evolucionado con el fin de que los microorganismos sean capaces de detectar cambios en el entorno y, de esta forma, regular las actividades celulares para adaptarse rápidamente al entorno cambiante. Esto es particularmente evidente en las cepas de *E. coli* capaces de sintetizar una o más tipos diferentes de cápsula, en las que su expresión dependerá del medio ambiente en el que se encuentre la bacteria. Estas bacterias utilizan las señales medioambientales (químicas y/o físicas) para distinguir entre entornos que puedan servir como hospedadores de los potencialmente hostiles, y subsecuentemente, tendrá lugar la expresión de un tipo determinado de cápsula (White-Ziegler, 2007).

Las condiciones medioambientales que favorecen la síntesis de cápsulas de PA y/o CA han sido bien establecidas y se han relacionado con las posibles funciones que, en cada caso, parecen desempeñar en la bacteria (Chen *et al.*, 2004; Majdalani y Gottesman, 2005; Corbett y Roberts, 2008). Sin embargo, los sistemas de regulación que rigen la expresión de ambos tipos de cápsulas no han sido completamente esclarecidos, aunque sabemos que la temperatura de crecimiento es un factor trascendental que determina la expresión de las cápsulas de CA y PA en *E. coli* (véase apartado 3.1). El hecho de que *E. coli* K92 sea una bacteria capaz de sintetizar ambos polímeros capsulares de una manera dependiente de la temperatura del medio proporciona un modelo idóneo para el estudio de los sistemas de regulación de ambos polímeros capsulares y sus posibles conexiones.

#### **3.3.1 Análisis de la expresión de genes implicados en la biosíntesis y/o regulación de CA y PA.**

La temperatura es una de las muchas señales que las bacterias usan para modular la expresión de genes. Diferentes estudios sobre el genoma bacteriano han proporcionado evidencias de que la temperatura del cuerpo humano juega un papel muy

importante en la regulación de los patrones de expresión de genes que facilita una efectiva colonización del hospedador (Brooks *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004). Por otra parte, las bajas temperaturas de crecimiento influyen sobre la expresión de genes requeridos para la supervivencia en otro tipo de entornos, como los ambientes acuáticos o los que se encuentran a temperatura ambiente (Taylor *et al.*, 2005). En este sentido, el éxito o fracaso de la supervivencia de una bacteria puede depender, en gran medida, de la expresión de un determinado tipo de cápsula.

Debido a que las síntesis de PA y CA en *E. coli* K92 se encuentra regulada por la temperatura de crecimiento, este organismo puede ser un buen modelo para determinar mediante qRT-PCR los posibles cambios en la expresión de los genes implicados en el metabolismo y regulación de ambos polímeros capsulares como consecuencia de la adaptación a diferentes temperaturas de crecimiento: 37°C (temperatura del hospedador humano) y 19°C (temperatura ambiente). Este estudio se desarrolló utilizando las condiciones de crecimiento y el medio de cultivo (MM Xil-Asn) de mayor producción de PA y que, supuestamente maximizarían la expresión del cluster de genes *kps* (responsable de la síntesis y el transporte del polímero capsular) a 37°C. Con objeto de conseguir condiciones similares y evitar las diferencias en la velocidad de crecimiento a diferentes temperaturas (Figura 3.3), las muestras de ARN de cultivos paralelos desarrollados a 37°C y 19°C fueron obtenidas en mitad de la fase exponencial.

Los genes escogidos en este estudio están relacionados con el metabolismo y regulación de ambos polímeros capsulares. Así, hemos estudiado genes de las regiones 1 (*kpsF*), 2 (*neuA*, *neuB*, *neuC*, *neuD*, *neuE* y *neuS*) y 3 (*kpsM*) del operón *kps* implicado en la síntesis y transporte de las cápsulas de PA (Vimr *et al.*, 2004). Además, se incluyeron los genes *nanA*, *nanE* y *nanT* del operón *nan*, implicado en el catabolismo del PA, y el gen *nanR*, encargado de la regulación transcripcional del operón *nan* (Vimr *et al.*, 2004). Con respecto a la biosíntesis del CA, hemos estudiado varios genes del operón *cps*, tales como *wzb*, *wzc*, *wcaA*, *wcaD*, *gmd*, *fcl*, *wcaK*, así como el gen *ugd*, que aunque no se encuentra en dicho operón, está implicado directamente en la síntesis de ácido glucurónico, uno de los constituyentes básicos del CA (Stevenson *et al.*, 1996). Además, se han incluido varios genes del sistema Rcs implicados en la regulación dependiente de temperatura del CA, tales como *rscB*, *rscD* y *rscF*, además del gen *rscA*, que codifica para una proteína reguladora auxiliar de este sistema (Majdalani y

Gottesman, 2005). Finalmente, hemos creído interesante estudiar las posibles diferencias de expresión de algunos genes previsiblemente implicados en la regulación dependiente de temperatura de ambos polímeros capsulares, tales como *h-ns*, *dsrA*, *slyA* y *rfaH* (Corbett y Roberts, 2008).

En la Tabla 3.7 se muestran los resultados obtenidos. Entre los genes que vieron incrementados sus niveles de expresión a 37°C con respecto a 19°C se encuentran todos los genes implicados en metabolismo de PA (operón *kps* y operón *nan*), justificando así la mayor producción de PA observada a 37°C. En este punto es de destacar los altos niveles de expresión observados del gen *nanA*. Aunque este gen forma parte del operón *nan*, implicado en el metabolismo catabólico de los ácidos siálicos, los niveles de expresión alcanzados son más similares a los obtenidos por los genes del operón *kps*. Como han reflejado diversos autores (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1995; Ferrero *et al.*, 1996) y se ha mencionado en la Introducción, es posible que el producto proteico del gen *nanA*, además de participar en el catabolismo de los ácidos siálicos, esté implicado también en la biosíntesis de Neu5Ac para la formación de PA. Además, hemos observado un aumento en la expresión de *nanR*, un represor transcripcional del operón catabólico *nan*. De esta forma, una menor expresión del operón *nan* impediría, en cierta medida, la degradación y utilización de ácidos siálicos por la bacteria, los cuales irían destinados a la sialilación de la superficie celular.

Por otro lado, un total de nueve genes de entre todos los estudiados, mostraron mayores valores de expresión a 19°C (Tabla 3.7). Todos los genes contenidos en el operón *cps* mostraron mayor expresión a 19°C que a 37°C, lo cual está en concordancia con los mayores valores de producción de CA observados en este trabajo cuando *E. coli* K92 crece a 19°C. Además, como cabría esperar, se registró una mayor expresión del gen *ugd* a 19°C. Como ya hemos mencionado, aunque este gen no pertenece al operón *cps*, es responsable de la síntesis de uno de los constituyentes del CA, el ácido glucurónico.

En cuanto a los genes que participan en la regulación de la expresión se observó que, el sistema de regulación Rcs que controla la biosíntesis de CA y, principalmente RcsB, estaba más expresado a 37°C (6 veces). Esto no resulta extraño ya que este sistema de regulación, basado en cascadas de fosforilación-desfosforilación, es capaz de responder a una gran variedad de estímulos ambientales para controlar, de manera



**Tabla 3.7** Diferencias en los niveles de expresión medidos por qPCR de genes implicados en el metabolismo y regulación del CA y PA. Los valores positivos y negativos muestran una mayor expresión a 37°C y 19°C respectivamente.

Función	Gen <sup>a</sup>	Producto <sup>b</sup>	37°C/19°C <sup>c</sup>
Síntesis de los ácidos siálicos	<i>kpsF</i>	Posible regulador biosíntesis ácidos siálicos	+15,6
	<i>neuA</i>	CMP-NeuNAc sintetasa	+84
	<i>neuB</i>	NeuNAc sintasa	+106
	<i>neuC</i>	UDP-GlcNAc epimerasa	+86
	<i>neuD</i>	Aciltransferasa	+188
	<i>neuE</i>	Transporte y polimerización ácidos siálicos	+512
	<i>neuS</i>	Polisialiltransferasa	+596
	<i>kpsM</i>	ABC-Transportador	+293
Catabolismo de los ácidos siálicos	<i>nanA</i>	N-Acetil neuraminato liasa	+141
	<i>nanE</i>	Posible N-Acetil manosamina-6-P epimerasa	+39
	<i>nanT</i>	Posible transportador de ácidos siálicos	+43
Regulación de la síntesis de ácido siálico	<i>nanR</i>	Regulador dual transcripcional	+2,5
Síntesis de ácido colánico	<i>wzb</i>	Tirosina fosfatasa	-2,4
	<i>wzc</i>	Tirosina kinasa	-1,1
	<i>wcaA</i>	Posible ácido colánico glicosil transferasa	-2,0
	<i>wcaD</i>	Ácido colánico polimerasa	-1,4
	<i>gmd</i>	GDP-manosa 4,6-dehidratasa	-3,0
	<i>fcl</i>	GDP-fucosa sintasa	-2,2
	<i>wcaK</i>	Posible ácido colánico piruvil transferasa	-1,4
	<i>ugd</i>	UDP-glucosa-6-dehidrogenasa	-1,3
Regulación de la síntesis de ácido colánico	<i>rcsA</i>	Regulador dual transcripcional	-2,5
	<i>rcsB</i>	Regulador dual transcripcional	+6,0
	<i>rcsC</i>	Sensor	+3,0
	<i>rcsF</i>	Sensor de glucosa y zinc	+1,4
Regulación de la síntesis de polisacáridos termorregulados	<i>h-ns</i>	Regulador dual transcripcional	+3,3
	<i>rfaH</i>	Antiterminador transcripcional	+3,8
	<i>slyA</i>	Activador transcripcional	+2,7
	<i>dsrA</i>	DsrA RNA. Riborregulador de <i>h-ns</i>	+1,2

(<sup>a</sup>) Genes implicados en el metabolismo y regulación de PA y CA. (<sup>b</sup>) Descripción de los productos codificados por los genes. (<sup>c</sup>) Los niveles relativos de expresión de los genes fue calculado mediante la siguiente fórmula:  $\Delta C_T = (C_T \text{ gen } 19^\circ\text{C} - C_T \text{ gen control } 19^\circ\text{C}) - (C_T \text{ gen } 37^\circ\text{C} - C_T \text{ gen control } 37^\circ\text{C})$ , y luego transformado a cambio relativo usando la fórmula  $2^{-\Delta C_T}$ . Como gen control hemos utilizado el gen *housekeeping gapdh*.

global, el aspecto y composición de la superficie celular de *E. coli* en respuesta a cambios en el estilo de vida (Majdalani y Gottesman, 2005; Whitfield, 2006). Además, el hecho de que la temperatura provoque cambios en la expresión de RcsC (Tabla 3.7) nos hace pensar que, este sensor dependiente de temperatura (Majdalani y Gottesman, 2005), pueda tener un papel principal en la cascada de señales que desembocan en la síntesis de CA y/o PA a partir de cambios en la temperatura. Todo lo contrario que ocurre con el sensor RcsF, cuyos niveles de expresión no parecen verse modificados significativamente frente a cambios de temperatura. Sin embargo, vemos que el gen *rcaA*, que proporciona un componente de regulación independiente del sistema Rcs, se encuentra más expresado a 19°C. Debido al papel que juega RcsA en la biosíntesis de CA, este resultado está en concordancia con los mayores niveles de producción de CA obtenidos en *E. coli* K92 a 19°C (Figura 3.16). Así, cuando la bacteria crece a 37°C los niveles de RcsA son muy bajos debido a que rápidamente es degradada por la proteasa Lon. Además, los bajos niveles de RcsA provocan, a su vez, que haya menos expresión de *rcaA*, ya que esta proteína es capaz de estimular su propia expresión. Por el contrario, cuando la bacteria crece a bajas temperaturas (19°C), se produce una fosforilación de RcsB (Whitfield y Roberts, 1999), provocando que RcsB-P se asocie con RcsA y formen un heterodímero que protege a RcsA de su degradación. El aumento en los niveles de RcsA provoca un aumento de su expresión y, en consecuencia, de la biosíntesis de CA como anteriormente hemos visto cuando *E. coli* K92 creció a bajas temperaturas (Figura 3.16).

La regulación dependiente de temperatura de la biosíntesis de CA a través de la proteína RcsA es más compleja de lo que acabamos de describir. Así, además de lo que hemos mencionado, existe una regulación negativa de la transcripción de *rcaA* mediada por H-NS en condiciones normales (37°C) (Sledjeski y Gottesman, 1995). En concordancia con esto y como se muestra en la Tabla 3.7, H-NS se encuentra más expresada a 37°C. No obstante, esto no es completamente representativo ya que esta molécula es un regulador dual de la transcripción que además de estar implicado en la biosíntesis de CA y PA tanto a 37°C como a 19°C (Corbett y Roberts, 2008), realiza otras muchas funciones en las bacterias (Landini y Zehnder, 2002; Giangrossi *et al.*, 2005; Gralla, 2005). Cuando la bacteria crece a bajas temperaturas (19°C), observamos un aumento de la expresión de *rcaA* (Tabla 3.7) debido a un proceso de autorregulación

y la inhibición de la transcripción de *h-ns* mediada por DsrA (una pequeña molécula de ARN) (Sledjeski *et al.*, 1996; Lease *et al.*, 1998) y, en consecuencia, se produce un aumento en los niveles de producción de CA (Figura 3.16). La expresión de *rcsA* a 19°C se ve favorecida por la represión transcripcional que ejerce DsrA sobre la proteína represora de la expresión de *rcsA*, H-NS; sin embargo, no hemos observado un aumento de la expresión de *dsrA* a 19°C. Li *et al.* (2008) han descrito que aunque DsrA tenga un papel dependiente de H-NS en la regulación de determinados operones a bajas temperaturas, esta molécula de ARN también actúa a altas temperaturas de una manera independiente de H-NS. Esto pudiera explicar la poca diferencia de expresión de *dsrA* entre 37°C y 19°C.

Atendiendo a la Tabla 3.7, vemos que cuando *E. coli* K92 creció a altas temperaturas, la expresión del gen *rfaH* se vió incrementada 3,8 veces con respecto su expresión a bajas temperaturas, en oposición a los estudios realizados por Bittner *et al.* (2002), en los cuales los niveles de expresión de *rfaH* no mostraron cambios significativos bajo condiciones de estrés osmótico o bajas temperaturas. Nuestros resultados están en concordancia con la función de esta proteína, la cual constituye un importante antiterminador de la transcripción necesario para la transcripción de las regiones 2 y 3 del operón *kps*, y en general, de operones implicados en la síntesis de cápsulas y LPS en muchos organismos (Majdalani y Gottesman, 2005). Por otra parte, vemos un aumento de la expresión de *slyA* a 37°C. Como hemos descrito en la Introducción, recientes estudios han demostrado que la proteína SlyA es un activador transcripcional necesario para la máxima transcripción del operón *kps* a 37°C y que, posiblemente, la disminución de la expresión de *slyA* a 19°C pueda ser uno de los motivos que contribuyen a la represión de las cápsulas del grupo 2 en *E. coli*.

Esta es la primera vez que se describe la relación directa que tiene la temperatura de crecimiento sobre la producción de PA y CA en *E. coli* K92, y los cambios en la expresión de los genes que participan en la síntesis y regulación de los mismos. Mientras que la temperatura de crecimiento ha sido ampliamente estudiada como un factor que controla la expresión de genes de virulencia, nuestros estudios y otros relacionados (Smoot *et al.*, 2001; Brooks *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004) indican que el genoma completo de la bacteria responde a la temperatura como una señal para adaptar

la expresión de genes que podrían facilitar la colonización de hospedadores mamíferos (White-Ziegler *et al.*, 2007) o la protección frente a determinadas condiciones medioambientales hostiles (Mao *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004).

A pesar de que la expresión de los genes justifican la distinta capacidad de biosíntesis de PA y CA en base a la temperatura de crecimiento, puede resultar significativo que las diferencias de expresión de los genes implicados en la biosíntesis de PA entre ambas temperaturas sean mucho mayores que las encontradas para los genes implicados en la biosíntesis de CA. Este hecho nos lleva a pensar que, posiblemente, la regulación por temperatura de la biosíntesis de ambos polímeros capsulares es diferente en cada caso. Así, parece ser que los mecanismos que regulan la síntesis de PA están implicados principalmente en modificaciones de la expresión de los genes de su biosíntesis. En cambio, el hecho de que la ausencia o presencia de las cápsulas de CA no implique modificaciones importantes en los niveles de expresión de los genes de biosíntesis, sugiere que su síntesis se encuentra principalmente regulada por procesos post-transcripcionales, tales como reacciones de fosforilación-desfosforilación.

En este sentido, Wzc es una tirosina kinasa implicada en la regulación de la expresión de las cápsulas de CA mediante procesos de fosforilación y desfosforilación (Obadia *et al.*, 2007). Así, se cree que la desfosforilación de las tirosinas del extremo C-terminal de Wzc provoca que esta enzima sea capaz de fosforilar a otras proteínas como UGD y otras glicosiltransferasas, que al estar directamente implicadas en la biosíntesis y el transporte del CA (Grangeasse *et al.*, 2003), favorecen la expresión de CA en la superficie celular. No obstante, también debemos resaltar que en otros organismos como *E. coli* K30 (Wugedistch *et al.*, 2001) parece ocurrir lo contrario.

Con objeto de establecer si en *E. coli* K92, interviene un mecanismo de estas características, nos propusimos averiguar si la temperatura de crecimiento podía provocar cambios en el estado de fosforilación de Wzc y, así, facilitar o impedir la biosíntesis de CA.

El análisis de Wzc en los extractos crudos valorados mediante inmunodetección (immunoblot) con anticuerpos policlonales específicos obtenidos frente a la misma (ver Materiales y Métodos), reveló la presencia de cantidades similares de proteína en los extractos obtenidos cuando *E. coli* K92 creció tanto a 37°C como a 19°C (datos no mostrados). Estos resultados están en concordancia con los niveles similares de expresión del gen *wzc* observados en ambas condiciones (Tabla 3.7). Por otra parte, determinamos el estado de fosforilación de la proteína Wzc presente en ambos extractos mediante el empleo de anticuerpos anti-fosfotirosina (ver Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos parecen indicar que Wzc se encuentra en un estado de mayor fosforilación en su extremo C-terminal en los extractos crudos obtenidos a 37°C, y prácticamente no se detectó la fosforilación de Wzc en los extractos obtenidos a 19°C. El hecho de que la ausencia de fosforilación de Wzc a bajas temperaturas coincide con la máxima producción de CA estaría en concordancia con lo descrito por Obadia *et al.* (2007). Además, nos permite sugerir que la temperatura de crecimiento no solamente juega un papel en la regulación, a nivel transcripcional, de la biosíntesis de CA, sino que también, parece estar implicada en procesos post-transcripcionales que modifiquen la actividad de enzimas implicadas en la biosíntesis de CA, como así parece ocurrir con la proteína Wzc.

Finalmente, la obtención de mutantes afectando a genes potencialmente implicados en la regulación dependiente de temperatura de la biosíntesis de CA y/o PA nos ayudará a esclarecer más sobre el complejo sistema multifactorial que rige la expresión de ambos tipos de cápsulas y los mecanismos por los cuales se produce esta regulación.

## 3.4 Obtención y estudio de mutantes relacionados con el metabolismo de los polímeros capsulares producidos por *E. coli* K92

### 3.4.1 Análisis del gen *rcsA* en *E. coli* K92

Como hemos establecido anteriormente, la expresión de los genes *cps* implicados en la síntesis del polímero capsular de CA está gobernada por un complejo sistema de regulación en el que toman parte el sistema Rcs y la proteína reguladora auxiliar RcsA. La proteína RcsB del sistema Rcs actúa como regulador primario y su presencia es suficiente para que la expresión de los genes *cps* tenga lugar. Además, cuando la proteína RcsB está presente, un aumento en los niveles de expresión de RcsA provoca un aumento en la expresión de los genes *cps* y, en consecuencia, de la síntesis de CA (Majdalani y Gottesman, 2005). Así mismo, otros genes implicados en la síntesis de CA pero que se encuentran situados fuera del operón *cps*, como el gen *ugd*, también están regulados por el sistema Rcs (Mousslim y Groisman, 2003).

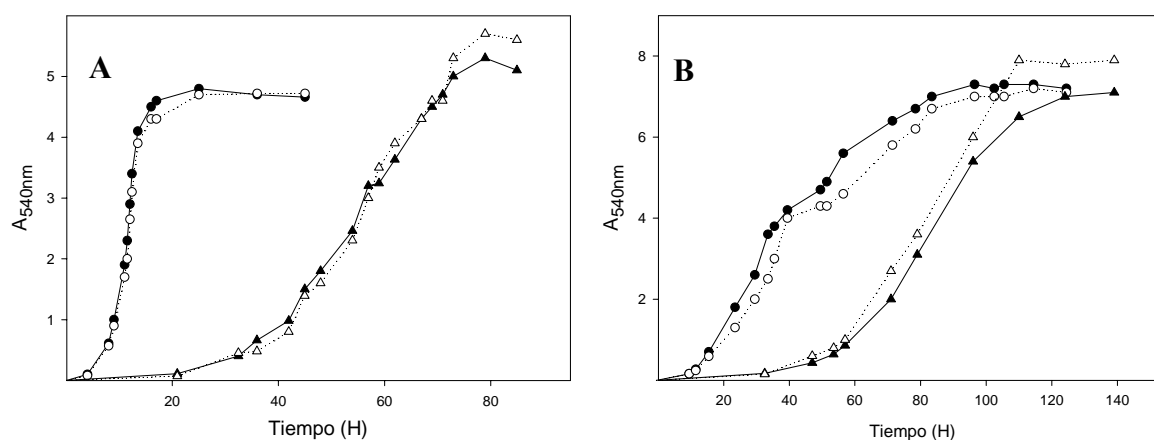
Se ha descrito que estas mismas moléculas, RcsA y RcsB, son capaces de regular la síntesis de cápsulas del grupo 1 en algunas cepas de *E. coli* (Majdalani y Gottesman, 2005). Sin embargo, poco se conoce hasta el momento sobre el sistema de regulación que controla la síntesis de las cápsulas del grupo 2 en *E. coli*, y aunque se ha llegado a sugerir que este tipo de cápsulas no dependen del sistema Rcs ni de la proteína auxiliar RcsA, diferentes experimentos indican una posible regulación negativa de estos reguladores sobre la expresión de las cápsulas del grupo 2 en *E. coli*, entre las que se encuentran las cápsulas de PA (Russo y Singh, 1993).

Con el fin de estudiar la posible implicación de la proteína RcsA sobre la regulación de la expresión de las cápsulas de PA y CA en *E. coli* K92, construimos un mutante por delección del gen *rcsA*, al que denominamos *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA*. Por otra parte, este mutante deficiente en la producción de CA, ha sido usado en diversos experimentos para tratar de establecer las ventajas que le supone a la bacteria la presencia de una cápsula de CA y, así, profundizar en el significado biológico de este polímero en la bacteria.

### 3.4.1.1 Curvas de crecimiento y producción de polímeros capsulares en *E. coli*

#### K92 $\Delta$ *rcaA*

En primer lugar, comprobamos como la mutación de *rcaA* afecta al crecimiento y producción de ambos polímeros capsulares. Para ello, se desarrollaron cultivos de la cepa deficiente en CA en MM Xil-Asn y MM Glc-Pro tanto a 37°C como a 19°C. Como podemos observar en las Figura 3.27, no se apreciaron diferencias significativas de crecimiento entre ambas cepas, silvestre y mutante, en los MM utilizados tanto a 37°C como a 19°C. Sin embargo, como era de esperar, los valores de producción de CA fueron significativamente inferiores a 37°C y, sobre todo, a 19°C, en los medios utilizados (Tabla 3.8). Así, los valores de producción de CA a 19°C disminuyeron en la cepa mutante en torno a un 90% y 97% en MM Xil-Asn y MM Glc-Pro, respectivamente. Parece evidente que la proteína RcsA es un regulador positivo del operón *cps* y, su ausencia, provoca una dramática bajada en los niveles de CA. Esto concuerda con el hecho de que la disponibilidad de RcsA en la bacteria es de suma importancia para incrementar los niveles de expresión de CA, y aunque no es imprescindible, el heterodímero formado por RcsA y RcsB estimula de una manera notable la expresión de los genes *cps* (Majdalani y Gottesman, 2005). En *E. coli* K92 $\Delta$ *rcaA*, la sola presencia de la proteína RcsB en forma de homodímero es suficiente para estimular la expresión de los genes *cps*, sin embargo, es necesaria la presencia de ambas proteínas para alcanzar los valores máximos de expresión de CA, sobre todo a 19°C (Majdalani y Gottesman, 2005).



**Figura 3.27** Curvas de crecimiento de cultivos de *E. coli* K92 (negro) y *E. coli* K92 $\Delta$ *rcaA* (blanco) establecidos en MM Xil-Asn (A) y en MM Glc-Pro (B) a 37°C (círculos) y 19°C (triángulos).

En cuanto a la producción de PA, ninguna de las dos cepas fue capaz de sintetizar PA a 19°C, lo que nos lleva a pensar que el mecanismo que reprime la síntesis de PA a bajas temperaturas es independiente de la proteína RcsA. Sin embargo, cuando la cepa mutante creció a 37°C observamos unos valores significativamente mayores de PA en MM Xil-Asn y, sobre todo, en MM Glc-Pro, donde la cepa mutante llega a alcanzar unos niveles de producción de PA casi tres veces mayores que en la cepa silvestre (Tabla 3.8).

**Tabla 3.8** Valores de producción de PA y CA en *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ rscA en MM Xil-Asn y Glc-Pro a 37°C y 19°C.

		Producción ( $\mu$ g/ml) de CA y PA en MM Glc-Pro		Producción ( $\mu$ g/ml) de CA y PA en MM Xil-Asn	
		CA	PA	CA	PA
37°C	<i>E. coli</i> K92	89 $\pm$ 20	36 $\pm$ 10	58 $\pm$ 14	165 $\pm$ 13
	<i>E. coli</i> K92 $\Delta$ rscA	69 $\pm$ 11	95 $\pm$ 31	49 $\pm$ 6	194 $\pm$ 12
19°C	<i>E. coli</i> K92	1062 $\pm$ 260	0	245 $\pm$ 41	0
	<i>E. coli</i> K92 $\Delta$ rscA	36 $\pm$ 9	0	28 $\pm$ 4	0

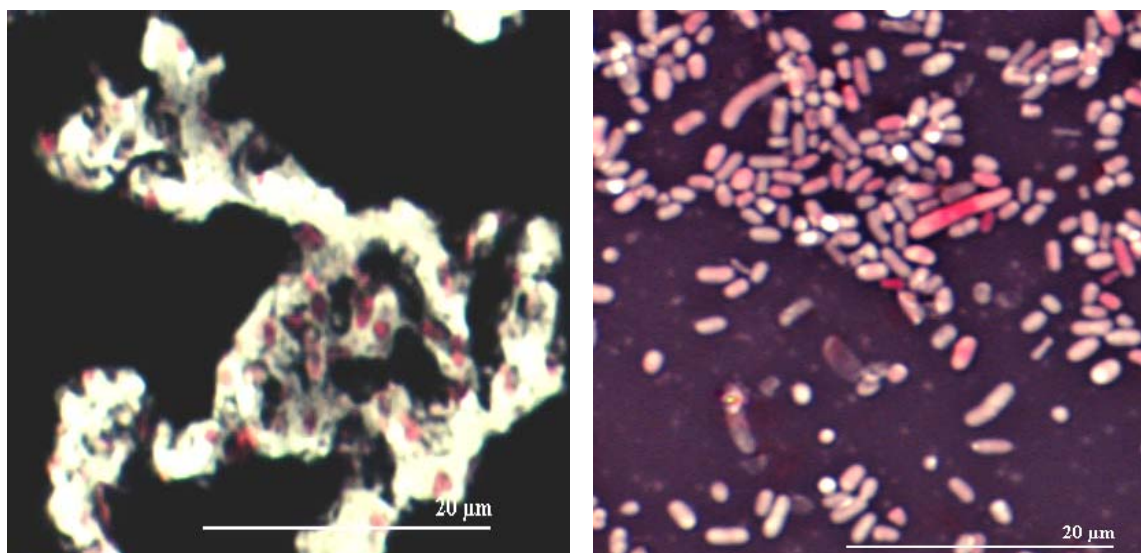
Los valores indican la media de tres experimentos diferentes ( $\pm$  desviación típica).

El hecho de que en *E. coli* K92 $\Delta$ rscA se produzca un aumento en los niveles de expresión de PA a 37°C podría estar relacionado con lo descrito por Russo y Singh (1993), en donde se sugiere que el sistema Rcs podría regular, directa o indirectamente, de forma negativa la síntesis de las cápsulas del tipo 2 en *E. coli*.

#### 3.4.1.2 Caracterización morfológica de *E. coli* K92 $\Delta$ rscA

Como hemos demostrado, la delección del gen *rscA* provoca una drástica disminución de la producción de CA en *E. coli* K92. Esta diferencia de producción entre ambas cepas, silvestre y mutante, se ve amplificada cuando se cultivan ambas cepas en placas de MM Glc-Pro con agar, el cual origina un fenotipo extremadamente mucoide en la cepa silvestre claramente visible a simple vista que contrasta claramente con la cepa mutante deficiente en CA.





**Figura 3.28** Microfotografías realizadas de *E. coli* K92 (izquierda) y *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA* (derecha) crecidas previamente en MM Glc-Pro con agar y visualizadas mediante tinción Burry-tinta china y microscopía óptica.

Con objeto de establecer si estas diferencia fenotípicas entre ambas cepas eran consecuencia de la presencia o ausencia de cápsula, realizamos un tipo de tinción negativa denominada tinción Burry-Tinta china (véase Materiales y Métodos), en la que se combina la tinción negativa para la visualización de estructuras capsulares con la tinción con fucsina para la visualización de las células. Como vemos en la Figura 3.28, en la cepa silvestre podemos observar la presencia de grandes cantidades de material capsular sin teñir, rodeando a las bacterias que se encuentran teñidas de rojo. Sin embargo, en la cepa deficiente en CA, solamente se aprecian células teñidas de rojo carentes de cualquier estructura capsular sin teñir.

#### 3.4.1.3 Análisis de la expresión de genes en *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA*

Como hemos visto en el apartado 3.2.1 y en el 3.4.1.1, parece ser que RcsA además de regular positivamente la expresión de CA tanto a 19°C como a 37°C, también parece estar implicada, de alguna manera, en la represión de PA a 37°C (Tabla 3.8). Mediante la técnica de qRT-PCR tratamos de averiguar qué genes implicados en la biosíntesis de PA y CA se encuentran regulados por la proteína RcsA. Para ello, se desarrollaron cultivos de ambas cepas a 19°C en MM Xil-Asn y obtuvimos muestras de

ARN en mitad de la fase exponencial con el fin de establecer posibles diferencias en los niveles de expresión de los genes estudiados.

Los genes escogidos para este estudio fueron prácticamente los mismos que en el apartado 3.3.1, exceptuando algunos genes (*kpsF*, *neuA*, *neuD* y *neuE*) pertenecientes a unidades de transcripción de los que ya existen candidatos representativos.

Atendiendo a los resultados obtenidos (Tabla 3.9), vimos que los genes relacionados con el metabolismo general de los ácidos siálicos (operones *kps* y *nan*) no registraron cambios significativos en sus niveles de expresión a 19°C, a excepción del gen *nanA*. Aunque hemos observado importantes cambios cuantitativos en la producción de PA, éstos no parecen tener base en cambios transcripcionales, ya que la mutación de *rcaA* no modificó significativamente los niveles de transcripción tanto de los genes biosintéticos como de los reguladores de PA.

Por otra parte, se observó una menor expresión de los genes implicados en la biosíntesis de CA (operón *cps* y *ugd*). Como vimos anteriormente, la proteína reguladora RcsA regula positivamente la expresión de CA y estos resultados están en concordancia con los niveles de producción de CA, donde son mínimos en la cepa mutante (Tabla 3.8). Por otra parte, en la cepa mutante vimos disminuidos los niveles de expresión de los genes del sistema Rcs. Hasta el momento, poco se conoce sobre las diferentes señales que estimulan la expresión de sus genes; sin embargo, al igual que el heterodímero RcsAB favorece la expresión del gen *rcaA*, es posible que de alguna manera RcsA esté favoreciendo la expresión de los genes *rca* a bajas temperaturas. El hecho de que la expresión de *rcaC*, cuya proteína actúa como sensor del sistema Rcs (véase apartado 3.3.1) se vea afectada por la temperatura de crecimiento (Tabla 3.7) y por la proteína RcsA (Tabla 3.9), abre la posibilidad de que ésta sea una de las moléculas implicadas en recibir y transmitir la señal de temperatura (sensor de temperatura) que desencadena la respuesta a nivel génico y que finalmente se traduce en la ausencia o presencia de CA en *E. coli* K92. Es más, es posible que en la regulación de PA por la temperatura de crecimiento también esté implicada esta proteína. Sin embargo, en este mecanismo no parece participar la proteína RcsF, cuyos niveles de expresión no se vieron afectados ni ante cambios de temperatura (Tabla 3.7) ni por la ausencia de RcsA en la cepa mutante (Tabla 3.9).

**Tabla 3.9** Diferencias entre *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA* en los niveles de expresión medidos por qPCR de genes implicados en el metabolismo y regulación del CA y PA. Los valores positivos y negativos muestran una mayor expresión en las cepas *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA* y *E. coli* K92 respectivamente, ambas crecidas a 19°C.

Función	Gen <sup>a</sup>	Producto <sup>b</sup>	<i>E. coli</i> K92 $\Delta$ <i>rcsA</i> / <i>E. coli</i> K92 <sup>c</sup>
Síntesis de los ácidos siálicos	<i>neuB</i>	NeuNAc sintasa	+1,1
	<i>neuC</i>	UDP-GlcNAc epimerasa	+1,1
	<i>neuS</i>	Polisialiltransferasa	+1,1
	<i>kpsM</i>	ABC-Transportador	+1,3
Catabolismo de los ácidos siálicos	<i>nanA</i>	N-Acetil neuraminato liasa	-3,2
	<i>nanE</i>	Posible N-Acetil manosamina-6-P epimerasa	+1,3
	<i>nanT</i>	Posible transportador de ácidos siálicos	+1,7
Síntesis de ácido colánico	<i>wzb</i>	Tirosina fosfatasa	-1,4
	<i>wzc</i>	Tirosina kinasa	-1,7
	<i>wcaA</i>	Posible ácido colánico glicosil transferasa	-2,7
	<i>wcaD</i>	Ácido colánico polimerasa	-6,9
	<i>gmd</i>	GDP-manosa 4,6-dehidratasa	-8,5
	<i>fcl</i>	GDP-fucosa sintasa	-7,3
	<i>wcaK</i>	Posible ácido colánico piruvil transferasa	-6,8
	<i>ugd</i>	UDP-glucosa-6-dehidrogenasa	+1,4
Regulación de la síntesis de ácido colánico	<i>rcsB</i>	Regulador dual transcripcional	-2
	<i>rcsC</i>	Sensor	-2,2
	<i>rcsF</i>	Sensor de glucosa y zinc	-1,7
Regulación de la síntesis de polisacáridos termorregulados	<i>h-ns</i>	Regulador dual transcripcional	+2,6
	<i>rfaH</i>	Antiterminador transcripcional	-1,6
	<i>dsrA</i>	DsrA RNA. Riborregulador de <i>h-ns</i>	-11,6

(<sup>a</sup>) Genes implicados en el metabolismo y regulación de PA y CA. (<sup>b</sup>) Descripción de los productos codificados por los genes. (<sup>c</sup>) Los niveles relativos de expresión de los genes fue calculado mediante la siguiente fórmula:  $\Delta C_T = (C_T \text{ gen mutante} - C_T \text{ gen control mutante}) - (C_T \text{ gen silvestre} - C_T \text{ gen control silvestre})$ , y luego transformado a cambio relativo usando la fórmula  $2^{-\Delta C_T}$ . Como gen control hemos utilizado el gen *housekeeping gapdh*

En cuanto a los genes implicados en la regulación de la síntesis de polisacáridos termorregulados, observamos un aumento significativo en los niveles de expresión de *h-ns* en la cepa mutante a 19°C. No obstante, ya que H-NS es capaz de reprimir la

transcripción de *rcaA*, es posible que este resultado esté relacionado con la unión, a nivel funcional, que existe entre H-NS y RcsA. Futuros estudios deberían ir encaminados en este aspecto ya que la multifuncionalidad de H-NS puede ser clave para entender mejor la regulación por temperatura de ambos polímeros capsulares.

Por otra parte, observamos un descenso importante en la expresión de *dsrA* en la cepa mutante. DsrA es una molécula de ARN que inhibe la expresión de *h-ns* favoreciendo la expresión de RcsA. En este sentido, los datos obtenidos son insuficientes para sugerir una teoría que explique el descenso tan significativo de los niveles de expresión de *dsrA* en *E. coli* K92 $\Delta$ *rcaA* a 19°C. Sin embargo, es posible que la disminución del mecanismo de retroalimentación positiva de RcsA sobre su propia expresión afecte de la misma manera a la expresión de *dsrA*. Futuras investigaciones pueden ir encaminadas en esta dirección. Finalmente, señalar que cuando *E. coli* K92 $\Delta$ *rcaA* creció a 19°C no se observó apenas ningún efecto sobre la transcripción del antiterminador transcripcional RfaH con respecto a la cepa silvestre.

#### **3.4.1.4 Capacidad protectora del CA en *E. coli* K92**

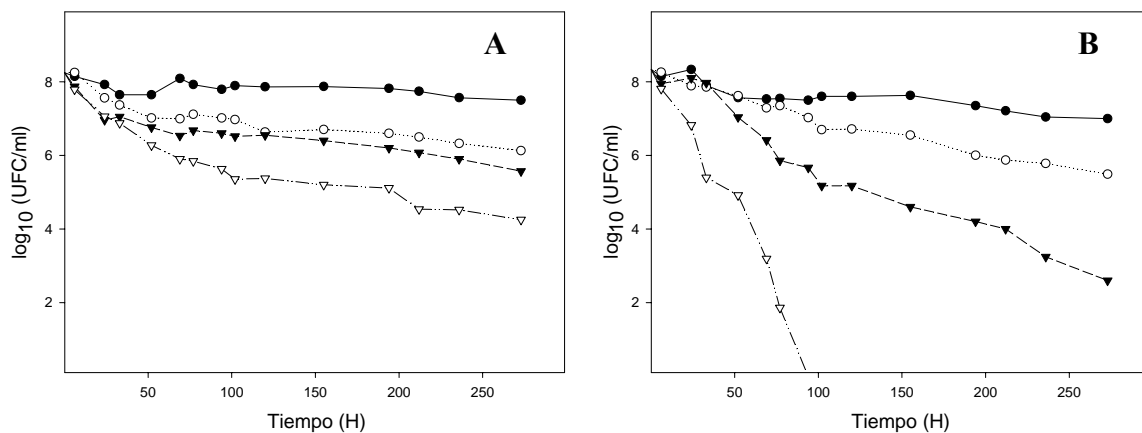
##### **3.4.1.4.1 Resistencia frente a agentes estresantes**

Como hemos descrito anteriormente, entre las muchas funciones que pueden tener las estructuras capsulares en la bacteria está la de protección frente a determinadas condiciones adversas (Mao *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004). Como se ha demostrado en el apartado 3.2.2, tanto el PA como el CA producidos por *E. coli* K92 parecen proteger a la bacteria frente a ambos estrés osmótico y oxidativo. Es más, este efecto protector parece ser mayor cuando el microorganismo crece a 37°C y produce, principalmente PA.

Ya que *E. coli* K92 es una cepa que produce cantidades abundantes del polisacárido mucoso CA cuando crece en MM Glc-Pro con agar durante 48 horas (Figura 3.28 y Tabla 3.4) y que el mutante deficiente en CA, *E. coli* K92 $\Delta$ *rcaA*, apenas lo produce, nos encontramos en condiciones para averiguar el grado de participación del CA en la protección de la bacteria frente a las situaciones hostiles del entorno como es el estrés osmótico y el oxidativo. Para ello se valoró el grado de supervivencia de ambas

cepas, silvestre y mutante, obtenidas por crecimiento en MM Glc-Pro a 19°C durante 48 horas y posteriormente incubadas en MM con Glc (sin fuente de nitrógeno para evitar el crecimiento celular) en presencia de diferentes concentraciones de NaCl y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizados en este trabajo para simular estrés osmótico y oxidativo respectivamente.

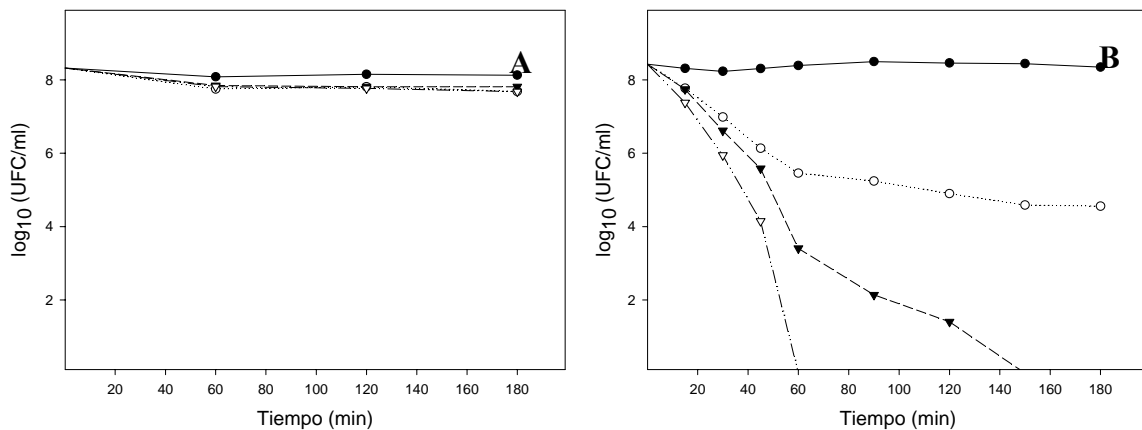
Como podemos observar en las Figura 3.29, en ausencia de agentes estresantes (NaCl o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no se registraron diferencias significativas en la supervivencia de ambas cepas (silvestre y mutante), e incluso en presencia de 0,5 M de NaCl. Sin embargo, concentraciones mayores de NaCl tuvieron un efecto más drástico sobre la viabilidad de la cepa mutante deficiente en CA. Así, una concentración de 1,5 M de NaCl provocó un descenso de 2 ordenes de magnitud en la cepa silvestre después de 275 horas de incubación, mientras que estas mismas condiciones disminuyeron la viabilidad de *E. coli* K92Δ*rcsA* en casi 5 ordenes de magnitud. Mas aún, cuando se añadió al medio una concentración de 2,5 M, desaparecieron todas las células viables de *E. coli* K92Δ*rcsA* en menos de 100 horas, mientras que la viabilidad de la cepa silvestre fue disminuyendo mas lentamente.



**Figura 3.29** Supervivencia de *E. coli* K92 (A) y *E. coli* K92Δ*rcsA* (B) en MM con Glc y sin fuente de nitrógeno conteniendo diferentes concentraciones de NaCl a temperatura ambiente. Las células fueron previamente crecidas a 19°C en MM Glc-Pro durante 48 horas. Las concentraciones de NaCl utilizadas son: 0 M (círculos negros), 0,5 M (círculos blancos), 1,5 M (triángulos negros) y 2,5 M (triángulos blancos).

Con respecto al estrés oxidativo causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en la Figura 3.30 vemos que este agente oxidante apenas tuvo influencia sobre la viabilidad de las células silvestres, incluso después de 180 horas de incubación. Sin embargo, la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el

medio de cultivo provocó un remarcado descenso en la viabilidad de la cepa mutante. De esta manera, una concentración de 2,5 mM de  $H_2O_2$  fue suficiente para disminuir la viabilidad de *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA* en más de 3 ordenes de magnitud. El aumento de la concentración de  $H_2O_2$  a 5 y 10 mM provocó una mortalidad total en la cepa deficiente en CA después de 150 y 60 horas de incubación, respectivamente.



**Figura 3.30** Supervivencia de *E. coli* K92 (A) y *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA* (B) en MM con Glc y sin fuente de nitrógeno conteniendo diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  a temperatura ambiente. Las células fueron previamente crecidas a 19°C en MM Glc-Pro durante 48 horas. Las concentraciones de  $H_2O_2$  utilizadas son: 0 M (círculos negros), 2,5 mM (círculos blancos), 5 mM (triángulos negros) y 10 mM (triángulos blancos).

Atendiendo a los resultados obtenidos, podemos concluir afirmando que el CA protege verdaderamente a *E. coli* K92 tanto del estrés osmótico como oxidativo. Es más, estos resultados unidos a los obtenidos en el apartado 3.2.2, permiten considerar a las cápsulas generadas por *E. coli* K92, CA y PA, como elementos protectores frente a agentes hostiles externos como son la presión osmótica o el entorno oxidante del medio. Este efecto protector es aun más acusado cuando la bacteria se rodea de PA (ver apartado 3.2.2). Así la falta de disponibilidad del agua que afecta a las funciones enzimáticas y el metabolismo celular o la plasmólisis y muerte celular que provoca la deshidratación por la presencia de altas concentraciones de sal (Chen *et al.*, 2004) se ve amortiguada por la envuelta celular que esta bacteria genera alrededor de su superficie en forma de CA o PA. Del mismo modo, podemos decir que la envoltura formada por estas estructuras polisacáridicas protege a *E. coli* K92 frente a los daños que causan las especies reactivas del oxígeno a lípidos, proteínas y ADN (Ercal *et al.*, 2001). Aunque por el momento, no está claro como el CA o el PA asisten a las células de *E. coli* K92

para sobrevivir bajo condiciones de estrés, es posible que la barrera física creada por estos polímeros alrededor de la bacteria junto con la elevada carga negativa que poseen provoquen una significativa resistencia frente a daños externos (Chen *et al.*, 2004).

#### 3.4.1.4.2 Resistencia frente a antibióticos

Algunos autores han descrito que los antibióticos son menos efectivos, de manera general, frente a las bacterias que se encuentran formando parte de los biofilms, de tal manera que a menudo, las concentraciones de antibióticos necesarias para eliminar las bacterias en fase sésil son mucho más altas que cuando esas mismas bacterias se encuentran en fase planctónica. Una de las posibles razones causantes de este comportamiento son los exopolisacáridos que componen los biofilms, los cuales actúan como una barrera que protege las células de la acción de los antibióticos (Prosser *et al.*, 1987; Ishida *et al.*, 1998; Hoiby *et al.*, 2001).

Con el fin de estudiar el posible papel protector del exopolisacárido CA en *E. coli* K92 frente a la acción de determinados antibióticos, se desarrollaron cultivos de *E. coli* K92 y *E. coli* K92  $\Delta$ *rcsA* a 19°C mediante siembra homogénea en placas MM Glc-Pro con agar. Adicionalmente, se colocaron tiras con gradiente de concentración de diferentes antibióticos (Oxoid) sobre las placas para estudiar el efecto de los mismos sobre el crecimiento de ambas cepas.

**Tabla 3.10** Los valores corresponden a la concentración de antibiótico (expresada en µg/ml) por encima de la cual no se observó crecimiento bacteriano. (+) Crecimiento total. (-) Ausencia total de crecimiento.

Antibióticos	<i>E. coli</i> K92	<i>E. coli</i> K92 $\Delta$ <i>rcsA</i>
Penicilina	+	+
Ciprofloxacina	-	-
Eritromicina	2-4	2-4
Cloranfenicol	0,012	0,012
Vancomicina	+	+
Tetraciclina	0,12	0,12
Ampicilina	+	2

Atendiendo a la Tabla 3.10, vemos que no aparecieron diferencias significativas en la susceptibilidad de ambas cepas a los antibióticos probados. Solamente en el caso de la ampicilina, la ausencia de CA en la cepa *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA* provocó un aumento de la susceptibilidad de esta cepa y no se observó crecimiento a concentraciones superiores a 2  $\mu$ g/ml. La cepa silvestre no vio afectada su crecimiento bajo ninguna de las concentraciones de ampicilina probadas.

Aunque se ha descrito que los antibióticos, de manera general, ven dificultado su avance a través de los exopolisacáridos bacterianos, en nuestro caso, parece que el exopolisacárido de CA solamente tiene un efecto protector frente a la ampicilina. Es posible que el CA sintetizado por *E. coli* K92, en estas condiciones no esté formando parte del biofilm y de este modo no proteja a la bacteria.

#### 3.4.1.5 Implicación de RcsA en la formación de biofilms

En los ambientes naturales, la mayoría de las bacterias tiende a asociarse a superficies sólidas formando biofilms. En su desarrollo, las células, inicialmente, se adhieren a la superficie moviéndose a lo largo de la misma para desarrollar microcolonias y, eventualmente, convertirse en una compleja estructura tridimensional (Stoodley *et al.*, 2002). Existen muchas evidencias que sugieren un papel del regulón Rcs y RcsA en las últimas fases del desarrollo de biofilms. En un principio, este regulón no estaría implicado en el ataque inicial al sustrato pero si parece ser muy importante para la formación de la estructura final tridimensional (Hanna *et al.*, 2003), aunque, en otros casos, no parece tener una gran influencia en la adhesión bacteriana (Crawford *et al.*, 2008).

Como hemos descrito, el CA es un viscoso polisacárido capsular y constituye un componente principal de los biofilms de varias cepas en *E. coli* (Prigent-Combaret *et al.*, 2000) permitiendo la formación de biofilms voluminosos (Danese *et al.*, 2000). Con estos datos y puesto que, como se ha descrito, *E. coli* K92 es capaz de producir CA y de adherirse a placas de poliestireno (véase apartado 3.2.2), nos ha parecido interesante estudiar la capacidad que esta cepa bacteriana tiene para formar biofilms y el grado de participación que el polímero capsular tiene en la génesis del mismo. Además, y puesto que disponíamos del mutante defectivo en la formación de CA, *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA*, estudiar la potencialidad de ambas cepas (silvestre y mutante) nos ayudaría a determinar



la participación de la proteína auxiliar reguladora RcsA sobre el control de la formación de biofilms a través de la síntesis de CA. Por todo ello, realizaremos experimentos de adhesión en diferentes condiciones y superficies.

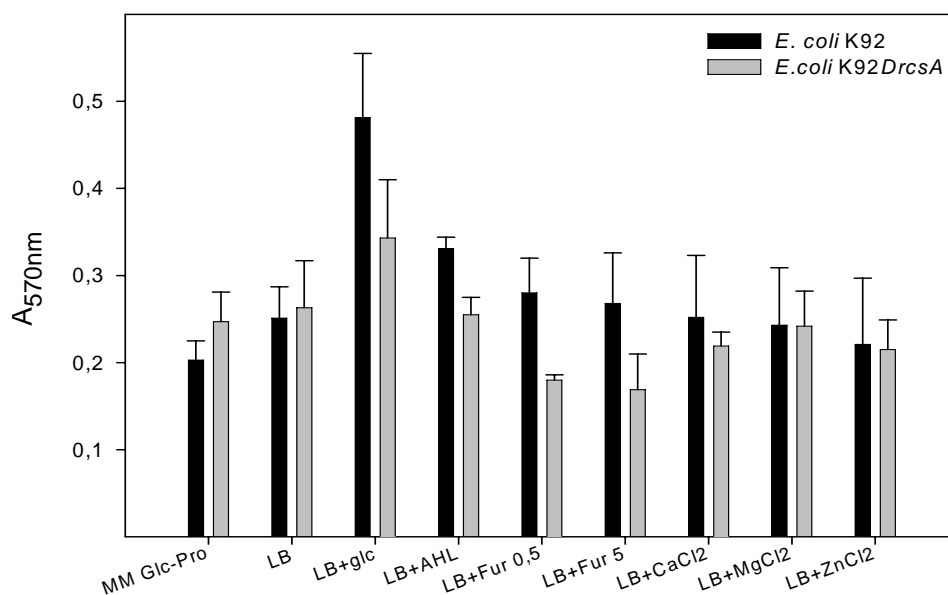
#### 3.4.1.5.1 Adhesión a placas de poliestireno

En primer lugar, realizamos experimentos de adhesión sobre placas de poliestireno con el fin de examinar cómo la presencia o ausencia de CA, generado por crecimiento de las dos cepas en LB o en MM Glc-Pro, puede influir en la formación de biofilms sobre este tipo de superficies. Atendiendo a la Figura 3.31, observamos que ni el medio LB ni el MM Glc-Pro por sí solos provocaron cambios significativos en la adhesión de ambas cepas a esta superficie plástica. Como ya se había puesto de manifiesto (apartado 3.2.2), estos resultados demuestran que *E. coli* K92 también es capaz de adherirse a superficies de poliestireno.

Por otra parte, el empleo de glucosa al 0,5% (p/v) produjo un aumento significativo en la adhesión de ambas cepas, sobre todo en la cepa silvestre, lo que indica que la proteína RcsA puede estar implicada en este proceso de adhesión. Una posibilidad es que la glucosa, como fuente de carbono, estimule de alguna manera la expresión del sistema Rcs y de la proteína auxiliar RcsA, ambos implicados en la estimulación de la formación de biofilms (Ophir y Gutnick, 1995; Sledjeski y Gottesman, 1995; Hagiwara *et al.*, 2003). No obstante, con los datos obtenidos, no podemos asegurar si éste es un proceso dependiente o no de la producción de CA, ya que también es posible que la mutación de *rscA* esté afectando a la expresión de otro tipo de genes. Aunque se desconocen los mecanismos moleculares de acción, en este trabajo (Tabla 3.4) y en otros anteriores (Junkins y Doyle 1992; Hagiwara *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006; Obadia *et al.*, 2007) se ha descrito que el empleo de glucosa en los medios de cultivo favorece la biosíntesis de CA, lo cual nos permite sugerir que posiblemente, la mayor adhesión observada en presencia de glucosa pueda originarse por un proceso dependiente de la biosíntesis de CA, puesto que éste es uno de los principales compuestos de los biofilms de muchas bacterias.

Diferentes estudios han demostrado que en bacterias Gram-negativas, el principal autoinductor (*quorum sensing*) de la formación de biofilms es la acilhomoserina lactona (AHL), de tal manera que cuando en el medio se acumula

suficiente cantidad de este autoinductor, como consecuencia de la agrupación de un número suficiente de células, se altera la expresión de genes específicos modificando el fenotipo de los microorganismos que tienden a agregarse. De acuerdo con los resultados obtenidos en la Figura 3.31, el empleo de AHL aumentó en un 30% la adhesión en *E. coli* K92, probablemente provocando la inducción de genes que favorecen la adhesión bacteriana. Sin embargo, la presencia de AHL no tuvo ningún efecto significativo sobre la adhesión de *E. coli* K92 $\Delta$ *rcaA* a esta superficie. Hasta el momento se desconoce si en la estimulación de la formación de biofilms a través de las moléculas de AHL interviene el sistema Rcs y la proteína RcsA. Sin embargo, al igual que ocurría cuando añadíamos glucosa al medio, es posible que las moléculas de AHL estimulen la expresión del sistema Rcs y de la proteína RcsA, y que ambos, directa o indirectamente (a través de la síntesis de CA), favorezcan la formación de biofilms. De esta manera, la ausencia de efecto de la AHL en el mutante *E. coli* K92 $\Delta$ *rcaA* puede ser debido directamente a la falta de proteína RcsA o, de un modo indirecto, de CA.



**Figura 3.31** Efecto del medio de cultivo sobre la formación de biofilm en *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ *rcaA*. Las células, previamente crecidas a 19°C, fueron incubadas en placas de poliestireno de 96 pocillos durante 72 horas a 19°C en MM Glc-Pro y medio LB suplementado o no con diferentes aditivos. Transcurrido este tiempo, las células fueron teñidas con cristal violeta para cuantificar la formación de biofilm. Los valores indican la media de cinco experimentos diferentes ( $\pm$  desviación típica).

La formación de biofilms puede resultar beneficiosa, por ejemplo, ayudando en los procesos de limpieza del agua. Sin embargo, otros biofilms son extremadamente nocivos. Así, se cree que alrededor del 65% de las enfermedades infecciosas están relacionadas con la formación de biofilms microbianos resistentes a antibióticos o a las defensas inmunes del hospedador (Ymele-Leki y Ross, 2007). En muchas herramientas y dispositivos construidos por el hombre, como las tuberías para el suministro de agua, conductos del aire o catéteres entre otros, los biofilms pueden funcionar como un reservorio bacteriano que continuamente libera microbios patógenos que amenazan la salud humana (Fux *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2006).

En este sentido, muchos estudios han ido encaminados para inhibir la formación de biofilms producidos por muchas bacterias. En bacterias Gram-negativas se han descrito algunos inhibidores como compuestos cíclicos sulfurados (Persson *et al.*, 2005), la furanona de *Delisea pulchra* (Givskov *et al.*, 1996) o el ácido penicílico de hongos (Rasmussen *et al.*, 2005). En el caso de las furanonas, éstas tienen una estructura similar a la de las moléculas de AHL lo que les permite unirse a los mismos receptores, pero en lugar de activarlos como hacen las moléculas de AHL, los bloquean e impiden la formación de biofilms. En el presente estudio, hemos tratado de averiguar la influencia de distintas concentraciones de furanona sobre la inhibición de la formación de biofilms en *E. coli* K92, y comprobar la posible influencia de la proteína RcsA sobre esta inhibición. Como vemos en la Figura 3.31, la presencia de altas concentraciones de furanona (5  $\mu$ M) no modificó de manera significativa la adhesión de *E. coli* K92. Sin embargo, *E. coli* K92 $\Delta$ rscA fue más susceptible a la inhibición con furanona de la formación de biofilm, observándose un significativo descenso en la adhesión en comparación con la cepa silvestre. Al igual que en el caso de las moléculas de AHL, se desconoce si la furanona y sus derivados alteran la formación de biofilm en un proceso mediado directa o indirectamente por la proteína RcsA. Aunque no podemos saber si es la ausencia de ésta proteína o de la barrera física creada por el CA es el causante de éste efecto, lo que sí parece claro es que la acción de uno u otro, o la combinación de ambos, provoca que la bacteria sea más susceptible a la inhibición por este compuesto.

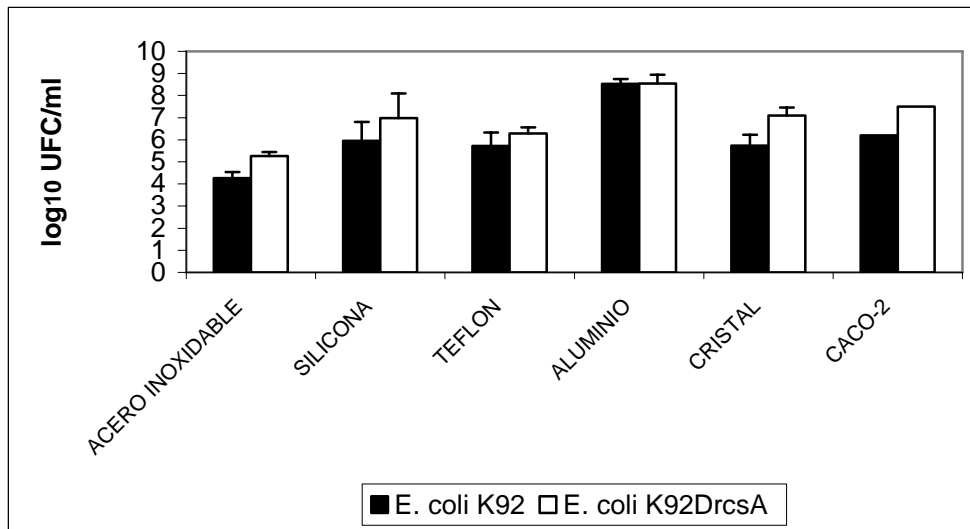
Desde hace tiempo, se ha demostrado que la formación de biofilms puede verse claramente influenciada por determinados elementos medioambientales como, por

ejemplo, la composición del medio de crecimiento (McEldowney y Fletcher, 1986) y, en concreto, la concentración de electrolitos (Fletcher, 1988). En este último caso, las interacciones electrostáticas originadas entre los cationes contribuyen a la cohesión del biofilm a la vez que contribuyen a la integridad y estabilidad de las membranas externas de las bacterias y propiedades de los LPS (Bhosle *et al.*, 1998). Determinados cationes divalentes, como el  $Mg^{2+}$  o el  $Ca^{2+}$ , pueden influenciar directamente la formación de biofilms a través de su efecto sobre las interacciones electrostáticas e indirectamente a través de procesos de de ataque fisiológicos al actuar como cationes celulares importantes y como cofactores enzimáticos (Fletcher, 1988). En este estudio, intentamos averiguar la posible influencia de cationes divalentes como el  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  en forma de sales de cloruro suplementados al medio LB sobre la formación de biofilms de ambas cepas de *E. coli* K92 (silvestre y mutante). Atendiendo a los resultados obtenidos en la Figura 3.31, no apreciamos diferencias significativas en la adhesión de ambas cepas en medio LB con respecto a la presencia de cualquiera de los cationes empleados en este estudio.

#### 3.4.1.5.2 Adhesión a superficies abióticas y bióticas

Dependiendo del lugar donde se encuentren, los biofilms pueden llegar a constituir una fuente continua de microorganismos perjudiciales para la salud humana. Como se ha descrito, *E. coli* K92 es un patógeno oportunista capaz de desencadenar graves procesos infecciosos dependiendo de donde se encuentre (Glode *et al.*, 1977). En este sentido, conocer los soportes tanto bióticos como abióticos donde una bacteria puede desarrollar la formación de biofilms puede ser de gran importancia para establecer el nivel de ubicuidad y la capacidad contaminante e infecciosa de la misma. Al descubrir que *E. coli* K92, conocida hasta ahora, principalmente por su capacidad para sintetizar cápsulas de PA y ser hospedador de organismos homeotermos (ver Introducción), es también capaz de generar CA y formar de biofilms sobre soportes sólidos, rápidamente nos llevó a pensar que esta bacteria puede aparecer y colonizar entornos hasta ahora no esperados. Conocer el entorno donde *E. coli* K92 puede desarrollarse y formar biofilms puede ser de gran importancia para desarrollar mecanismos o sistemas que impidan o controlen su proliferación y potencial patológico. Por este motivo y para estudiar el papel del CA producido por esta bacteria en la formación de biofilms sobre superficies de importancia tecnológica tanto alimentaria

como biomédica o clínica, hemos estudiado la capacidad de adhesión de *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ rcaA sobre diferentes superficies abióticas (acero inoxidable, silicona, teflón, aluminio y cristal) y bióticas (células Caco-2).



**Figura 3.32** Adhesión a diferentes superficies bióticas y abióticas de *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ rcaA previamente crecidas en placas de MM Glc-Pro con agar e incubadas con los diferentes tipos de superficies durante 5 días a temperatura ambiente para permitir la formación del biofilm. Cuando se emplearon células Caco-2, la incubación con ambas cepas bacterianas fue de 1 hora. Estos resultados muestran la media de tres experimentos diferentes.

Atendiendo a los resultados obtenidos (Figura 3.32) vemos que la ausencia de RcsA en la cepa mutante favoreció en algunos casos la adhesión bacteriana, mientras que en otros materiales no tuvo ningún tipo de efecto. En cuanto a las superficies abióticas, observamos un incremento significativo en la adhesión de la cepa deficiente en CA en superficies como el acero inoxidable, la silicona o el cristal. Sin embargo, el empleo de otro tipo de superficies como el teflón o el aluminio no provocó diferencias significativas en la adhesión de ambas cepas. Por otra parte, la cepa mutante fue capaz de adherirse más eficientemente a las células Caco-2, utilizadas en este trabajo como modelo de superficie biótica. Así, mientras que solamente un 0,066% de las células iniciales de *E. coli* K92 fueron capaces de adherirse, se registraron valores de adhesión del 1,35% de las células iniciales en el caso de la cepa mutante deficiente en CA.

Estos resultados nos permiten concluir que el CA no es necesario en los primeros estadios (5 días) de la formación de biofilms de *E. coli* K92 sobre las

diferentes superficies probadas. Es más, a excepción del aluminio, la ausencia de CA en la cepa mutante favoreció la adhesión a todas las superficies probadas.

Aunque el CA ha sido identificado como un componente importante de los biofilms que forman algunas bacterias, existe cierta controversia sobre el auténtico papel que juega el CA para favorecer la formación de biofilms. Nuestros resultados, así como recientes publicaciones (Zhang *et al.*, 2008), muestran como la represión de la producción de CA en *E. coli* y el consecuente descenso del fenotipo mucoso favorecen la formación de biofilm. Por otra parte, se ha establecido que en organismos como *E. coli*, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa*, la matriz extracelular producida en los biofilms bacterianos está compuesta de manera general por diferentes exopolisacáridos (Crawford *et al.*, 2008), sin que el CA sea un elemento exclusivo. Así, se ha demostrado que en el biofilm formado por el serotipo *Typhimurium* de *Salmonella enterica* sobre la superficie de cálculos biliares no interviene el CA que esta bacteria produce, sino que parece ser que son los polisacáridos capsulares del antígeno O del LPS, inducidos por la bilis, los que favorecen la formación del mismo (Crawford *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en este apartado también revelaron que *E. coli* K92 es capaz de adherirse superficies de acero inoxidable, teflón, silicona, aluminio o cristal (Figura 3.32); elementos que comúnmente forman parte de las superficies utilizadas en las cadenas de manipulación y envasado de alimentos y/o en la fabricación de componentes biosanitarios como catéteres, implantes o prótesis quirúrgicas. La capacidad que tiene para sobrevivir sobre diferentes superficies pone de relieve la gran ubicuidad que posee esta bacteria y resalta el potencial patogénico que tiene *E. coli* K92 como posible contaminante de productos alimenticios y de componentes biomédicos o clínicos. Finalmente destacar la capacidad que ha mostrado *E. coli* K92 para adherirse a células Caco-2 (Figura 3.32), un resultado que revela el potencial de esta bacteria para anclarse en la superficie celular del hospedador durante los procesos infectivos y que justifica su carácter de patógeno oportunista (Glode *et al.*, 1977).

### **3.4.2 Análisis del gen *rcsB* en *E. coli* K92**

Como se ha descrito anteriormente (Majdalani y Gottesman, 2005) y comprobamos en el apartado 3.4.1, la proteína RcsA regula positivamente la síntesis de

CA en *E. coli* K92. También hemos demostrado en este trabajo (Tabla 3.8) que la proteína RcsA está regulando de manera negativa la síntesis de cápsulas del grupo 2 en *E. coli*, entre las que se encuentran las cápsulas de PA de *E. coli*. Sin embargo, parece que esta proteína no es la causante, ni directa ni indirectamente, de la represión de la síntesis de este tipo de cápsulas a bajas temperaturas (19°C), sino que un diferente y complejo sistema multifactorial parece estar implicado (Corbett y Roberts, 2008).

Como hemos visto anteriormente con respecto a la biosíntesis de CA, en numerosas ocasiones RcsA actúa como una proteína auxiliar del sistema Rcs, llevando a cabo sus funciones de manera conjunta. Además y ya que RcsA parece estar implicada de alguna manera en la regulación de las cápsulas de PA en *E. coli*, consideramos interesante comprobar si, a través de la proteína RcsB, el sistema Rcs también formaba parte de la regulación de las cápsulas del grupo 2 en *E. coli* como algunos autores ya han sugerido (Russo y Singh, 1993), y además, averiguar el auténtico papel de RcsB en la síntesis de CA en *E. coli* K92.

Para ello, construimos un mutante por delección del gen *rcsB* en *E. coli* K92, al que denominamos *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsB*, y estudiamos cómo la mutación de *rcsB* afecta al crecimiento y producción de ambos polímeros capsulares. Además, utilizaremos este mutante para tratar de averiguar la posible implicación de los genes estudiados en la síntesis y regulación de PA y CA pertenecientes al regulón RcsB.

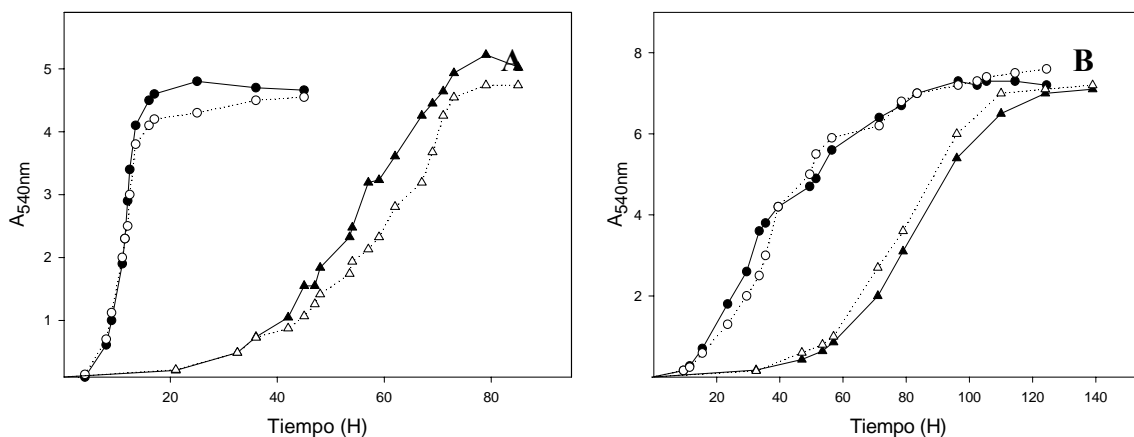
#### **3.4.2.1 Curvas de crecimiento y producción del mutante *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsB***

En primer lugar, se desarrollaron cultivos de este mutante en MM Xil-Asn y MM Glc-Pro para comprobar las posibles diferencias en cuanto a crecimiento y producción de ambos en polímeros capsulares.

En la Figura 3.33 vemos que no se observaron diferencias significativas en cuanto al crecimiento de *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsB* con respecto a la cepa silvestre en ambos MM utilizados tanto a 37°C como a 19°C. Sin embargo y como era de esperar, los valores de producción de CA de la cepa mutante crecida a 19°C se redujeron drásticamente en relación a *E. coli* K92, en ambos MM utilizados. En este caso, la cepa *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsB* redujo entre un 76 % y un 96% la producción de CA. Al igual que se ha observado en el mutante *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA*, estas diferencias fueron mucho menores a 37°C (Tabla 3.11).

Estos resultados nos permiten suponer que aunque las bajas temperaturas de crecimiento estimulen la síntesis de CA de una manera dependiente del sistema Rcs y de la proteína auxiliar RcsA, debe existir otro tipo de moléculas independientes del sistema Rcs que mantengan una pequeña expresión de CA a altas temperaturas.

Como ya se ha mencionado, Majdalani y Gottesman (2005) han descrito que la proteína RcsB regula positivamente la síntesis de CA en *E. coli*. Hasta el momento se ha descrito que la expresión de RcsB es suficiente para la expresión de los genes *cps* aún en ausencia de RcsA y que, en ausencia de RcsB, no se detecta expresión de los genes *cps* independientemente de los niveles de RcsA (Majdalani y Gottesman, 2005). Aunque los resultados obtenidos en nuestros experimentos indican que *E. coli* K92 responde al mismo sistema, las diferencias observadas sugieren que RcsA y RcsB tienen un papel similar de en esta bacteria, ya que la ausencia de cualquiera de ellos genera fenotipos parecidos y, en ningún caso, se anula por completo la expresión de los genes *cps*. Así, creemos que existe la posibilidad de que en ausencia de RcsB en la cepa mutante, RcsA por sí sola sea capaz de expresar los genes *cps* y estimular la síntesis de CA.



**Figura 3.33** Curvas de crecimiento de cultivos de *E. coli* K92 (negro) y *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsB* (blanco) establecidos en MM Xil-Asn (A) y en MM Glc-Pro (B) a 37°C (círculos) y 19°C (triángulos).

Al igual que ocurría con el mutante *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA*, la mutación de *rcsB* tuvo efectos similares sobre la producción de PA. Así, tampoco observamos producción de PA a 19°C en *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsB*, lo que nos lleva a pensar que en el sistema que bloquea



la síntesis de PA a temperaturas restrictivas (por debajo de 20°C), no estaría implicado el sistema Rcs.

**Tabla 3.11** Valores de producción de PA y CA en *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ *rscB* en MM Xil-Asn y Glc-Pro a 37°C y 19°C.

		Producción ( $\mu$ g/ml) de CA y PA en MM Glc-Pro		Producción ( $\mu$ g/ml) de CA y PA en MM Xil-Asn	
		CA	PA	CA	PA
37°C	<i>E. coli</i> K92	89 $\pm$ 20	36 $\pm$ 10	58 $\pm$ 14	165 $\pm$ 13
	<i>E. coli</i> K92 $\Delta$ <i>rscB</i>	81 $\pm$ 12	131 $\pm$ 28	51 $\pm$ 11	216 $\pm$ 17
19°C	<i>E. coli</i> K92	1062 $\pm$ 260	0	245 $\pm$ 41	0
	<i>E. coli</i> K92 $\Delta$ <i>rscB</i>	75 $\pm$ 13	0	57 $\pm$ 5	0

Los valores indican la media de tres experimentos diferentes ( $\pm$  desviación típica).

No obstante, como se muestra en la Tabla 3.11, se observó un aumento en la producción de PA cuando *E. coli* K92 $\Delta$ *rscB* creció a 37°C, de manera similar a la observada en *E. coli* K92 $\Delta$ *rscA*. Así, creemos que tanto RcsA como RcsB podrían estar implicadas, directa o indirectamente, en la regulación negativa de las cápsulas de PA en *E. coli* K92, lo que apoya nuevamente la idea ya sugerida por Russo y Singh (1993) de una posible implicación directa del sistema Rcs en la regulación de la síntesis de las cápsulas del grupo 2 en *E. coli*.

#### 3.4.2.2 Análisis de la expresión de genes en *E. coli* K92 $\Delta$ *rscB*

Como hemos visto en el apartado anterior, parece que la proteína RcsB, además de regular positivamente la síntesis de CA, esta implicada en la represión de PA a 37°C. En este apartado vamos a tratar de averiguar qué genes relacionados con la biosíntesis y regulación de PA y CA se encuentran bajo el regulón RcsB. Para ello, se desarrollaron cultivos de ambas cepas, *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ *rscB*, en MM Xil-Asn y MM Glc-Pro tanto a 37°C como a 19°C, y se obtuvieron muestras de ARN en mitad de la fase exponencial del crecimiento con el fin de establecer posibles diferencias en los niveles

de expresión de los genes estudiados. Los genes escogidos fueron los mismos que los del apartado 3.3.1.

En primer lugar, estudiamos las diferencias de expresión de los genes cuando ambas cepas crecieron a 19°C (Tabla 3.12). Con respecto a los genes implicados en la biosíntesis de los ácidos siálicos (operón *kps*) y a diferencia de lo que observamos en el mutante *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA* a 19°C, vimos un aumento en la expresión de los genes en la cepa mutante *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsB*, evidenciando así una represión transcripcional de la proteína RcsB sobre este grupo de genes a 19°C. De esta manera constatamos a nivel molecular la implicación del sistema Rcs sobre la síntesis de PA *E. coli* K92 al menos cuando crece a 19°C. Sin embargo, no parece que el control de RcsB sobre la expresión del operón *kps* sea el causante de la represión de la síntesis de las cápsulas del tipo 2 en *E. coli* a bajas temperaturas, ya que tampoco observamos producción de PA en *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsB* a 19°C. Con respecto a los genes implicados en el catabolismo de los ácidos siálicos, cabe señalar que la ausencia de RcsB en la cepa mutante apenas influyó en los niveles de expresión del operón *nan* ni de su regulador transcripcional NanR.

Por otra parte, debemos de resaltar el hecho de que todos los genes implicados en la biosíntesis de CA (operón *cps* y *ugd*) disminuyesen su expresión en la cepa mutante (Tabla 3.12). Estos resultados están en concordancia con la regulación positiva que ejerce RcsB sobre la síntesis de CA (Chen *et al.*, 2001). También se observó un gran descenso en la expresión de RcsA en *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsB*. Esto es previsible, ya que en ausencia de RcsB no es posible la formación del heterodímero RcsA-RcsB que protegería a RcsA de su degradación por la proteasa Lon y que, además, el descenso en los niveles de RcsA disminuye la estimulación de su propia expresión (Majdalani y Gottesman, 2005).

Atendiendo a la Tabla 3.12 vemos que la mutación en *rcsB* no afectó a los niveles de expresión de *rcsF* y, sin embargo, provocó un aumento de 2,8 veces en los niveles de expresión de *rcsC*. Aunque todavía se desconocen muchos aspectos sobre el complejo sistema de señalización que afecta al sistema Rcs, lo que si parece claro es que RcsC, un sensor dependiente de temperatura, está implicado en la regulación de CA y, posiblemente de PA, en *E. coli* K92 de una manera dependiente de la temperatura

**Tabla 3.12** Diferencias entre *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ *ArcsB* en los niveles de expresión medidos por qPCR de genes implicados en el metabolismo y regulación del CA y PA. Los valores positivos y negativos muestran una mayor expresión en las cepas *E. coli* K92 $\Delta$ *ArcsB* y *E. coli* K92 respectivamente, ambas crecidas a 19°C.

<b>Función</b>	<b>Gen<sup>a</sup></b>	<b>Producto<sup>b</sup></b>	<b><i>E. coli</i> K92<math>\Delta</math><i>ArcsB</i>/ <i>E. coli</i> K92<sup>c</sup></b>
<b>Síntesis de los ácidos siálicos</b>	<i>kpsF</i>	Posible regulador biosíntesis ácidos siálicos	+1,4
	<i>neuB</i>	NeuNAc sintasa	+5,6
	<i>neuC</i>	UDP-GlcNAc epimerasa	+2,9
	<i>neuD</i>	Aciltransferasa	+3,9
	<i>neuE</i>	Transporte y polimerización ácidos siálicos	+6,4
	<i>neuS</i>	Polisialiltransferasa	+7,7
	<i>kpsM</i>	ABC-Transportador	+2,3
<b>Catabolismo de los ácidos siálicos</b>	<i>nanA</i>	N-Acetil neuraminato liasa	+1,4
	<i>nanE</i>	Posible N-Acetil manosamina-6-P epimerasa	+1,8
	<i>nanT</i>	Posible transportador de ácidos siálicos	+1,7
<b>Regulación de la síntesis de ácido siálico</b>	<i>nanR</i>	Regulador dual transcripcional	+1,9
<b>Síntesis de ácido colánico</b>	<i>wzb</i>	Tirosina fosfatasa	-16,9
	<i>wzc</i>	Tirosina kinasa	-14,7
	<i>wcaA</i>	Posible ácido colánico glicosil transferasa	-17,9
	<i>wcaD</i>	Ácido colánico polimerasa	-23,3
	<i>gmd</i>	GDP-manosa 4,6-dehidratasa	-35,7
	<i>fcl</i>	GDP-fucosa sintasa	-29,7
	<i>wcaK</i>	Posible ácido colánico piruvil transferasa	-9,2
	<i>ugd</i>	UDP-glucosa-6-dehidrogenasa	-2,3
<b>Regulación de la síntesis de ácido colánico</b>	<i>rcaA</i>	Regulador dual transcripcional	-29,5
	<i>rcaC</i>	Sensor	+2,8
	<i>rcaF</i>	Sensor de glucosa y zinc	+1
<b>Regulación de la síntesis de polisacáridos termorregulados</b>	<i>h-ns</i>	Regulador dual transcripcional	+1,5
	<i>rfaH</i>	Antiterminador transcripcional	+2
	<i>dsrA</i>	DsrA RNA. Riborregulador de <i>h-ns</i>	+7,6
	<i>slyA</i>	Activador transcripcional	+1,4

(<sup>a</sup>) Genes implicados en el metabolismo y regulación de PA y CA. (<sup>b</sup>) Descripción de los productos codificados por los genes. (<sup>c</sup>) Los niveles relativos de expresión de los genes fue calculado mediante la siguiente fórmula:  $\Delta C_T = (C_T \text{ gen mutante} - C_T \text{ gen control mutante}) - (C_T \text{ gen silvestre} - C_T \text{ gen control silvestre})$ , y luego transformado a cambio relativo usando la fórmula  $2^{-\Delta C_T}$ . Como gen control hemos utilizado el gen *housekeeping gapdh*.

(véase apartado 3.3.1). Además, nosotros sugerimos que este aumento en los niveles de expresión de *rscC* en la cepa mutante se originen, posiblemente, para tratar de contrarrestar la ausencia de RcsB.

En cuanto a los genes implicados en la regulación de la síntesis de polisacáridos termorregulados, vimos que la expresión de *h-ns*, a diferencia de lo que ocurría en el mutante deficiente en RcsA, no parecía verse afectada en *E. coli* K92 $\Delta$ *rscB* cuando creció a 19°C, y es que hasta el momento no se ha descrito ninguna relación funcional entre H-NS y RcsB, como ocurre con RcsA. Sin embargo, si observamos un aumento considerable en la expresión de *dsrA* en la cepa mutante. Es posible que debido a la ausencia de RcsB (una proteína capaz de estimular la expresión de RcsA) en la cepa mutante, ésta aumente los niveles de *dsrA* para contrarrestar ese efecto, ya que el ARN DsrA es capaz de anular la represión que H-NS ejerce sobre el gen *rscA*.

Por otra parte, también observamos un aumento, aunque menor, en la expresión de *rfaH* en *E. coli* K92 $\Delta$ *rscB*, el cual puede estar relacionado directamente con el aumento de la expresión del operón *kps*, ya que RfaH actúa como un antiterminador transcripcional del promotor PR3 que va desde la región 3 y continua hasta la región 2. Además, esto explicaría que el gen *kpsF*, el primer gen de la región 1 del operón *kps*, no sufriera ningún tipo de modificación en la expresión. De este modo, podemos sugerir que la represión de RcsB sobre la síntesis de PA está posiblemente mediada por RfaH ya que ni H-NS ni SlyA, dos proteínas necesarias para la máxima expresión de PA, se vieron significativamente modificadas. Además, esto concuerda con el hecho de que en *E. coli* K92 $\Delta$ *rscA*, no se vieran modificados los niveles de expresión del operón *kps*, y es que tampoco afectó a los niveles de RfaH (Tabla 3.12).

Con objeto de profundizar más en el mecanismo de regulación de la síntesis de estos polímeros capsulares, se estudió el efecto que la delección de *rscB* provocaba sobre la expresión de los genes implicados en el metabolismo y regulación de PA y CA cuando *E. coli* K92 y el mutante defectivo en *rscB* crecieron a 37°C. En la Tabla 3.13 se muestran las diferencias de expresión de los genes estudiados en ambas cepas.

Al comparar la expresión de los genes del operón *kps* en *E. coli* K92 $\Delta$ *rscB* vimos que los valores fueron ligeramente inferiores cuando este mutante crecía a 37°C.

Aunque hemos visto una represión transcripcional de la proteína RcsB sobre el operón *kps* cuando *E. coli* K92 $\Delta$ *rscB* crecía a 19°C (Tabla 3.12), esta misma circunstancia no parece producirse cuando crece a 37°C, aunque cabe señalar que cuando la cepa mutante creció a 37°C se observaron unos valores claramente superiores de producción de PA. Por otra parte, al igual que ocurrió con el operón *kps*, los genes implicados en el catabolismo de los ácidos siálicos (operón *nan*) mostraron valores más bajos de expresión en *E. coli* K92 $\Delta$ *rscB*, un efecto que fue independiente de la transcripción de *nanR*, cuyos valores de expresión apenas se modificaron (Tabla 3.13).

En cuanto a los genes implicados en la biosíntesis de CA (operón *cps* y *ugd*) observamos que su expresión disminuía a 37°C en la cepa mutante al igual que ocurría a 19°C (Tabla 3.12), evidenciando aún más si cabe el papel de RcsB en la síntesis de CA. El hecho de que las diferencias fueron menos plausibles que a 19°C (Tabla 3.12), nos hace suponer que aunque las bajas temperaturas de crecimiento estimulen la síntesis de CA de una manera dependiente del sistema Rcs y de la proteína auxiliar RcsA, deben existir otro tipo de moléculas, independientes del sistema Rcs, que estimulen la expresión de CA en estas condiciones de crecimiento. Al igual que ocurría a 19°C y como justificamos en su momento, observamos un importante descenso de la expresión de *rscA* en *E. coli* K92 $\Delta$ *rscB*. En cuanto al gen *rscF*, tampoco observamos cambios significativos en sus niveles de expresión a 37°C (Tabla 3.13), por lo que podemos concluir que el sensor RcsF no parece estar implicado en la regulación de la expresión de PA y CA ni a través del sistema Rcs ni de la temperatura. Todo lo contrario que ocurrió con el sensor RcsC, el cual vio disminuida su expresión 3,5 veces cuando la cepa mutante creció a 37°C. Este sensor podría estar implicado en la termorregulación del CA en *E. coli* K92, posiblemente recibiendo estímulos externos -bajas temperaturas- y provocando la fosforilación de RcsB y la consecuente expresión del operón *cps* para la síntesis de CA.

En cuanto a los genes implicados en la termorregulación de la biosíntesis de polisacáridos, vemos que a diferencia de los que ocurría cuando *E. coli* K92 $\Delta$ *rscB* crecía a 19°C, la expresión de *h-ns*, *rfaH* y *slyA* disminuyó significativamente cuando la cepa mutante creció a 37°C. Se ha descrito que estas tres proteínas ayudan a regular positivamente la transcripción del operón *kps* a 37°C (Corbett y Roberts, 2008) y, como

**Tabla 3.13** Diferencias entre *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsB* en los niveles de expresión medidos por qPCR de genes implicados en el metabolismo y regulación del CA y PA. Los valores positivos y negativos muestran una mayor expresión en las cepas *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsB* y *E. coli* K92 respectivamente, ambas crecidas a 37°C.

Función	Gen <sup>a</sup>	Producto <sup>b</sup>	<i>E. coli</i> K92 $\Delta$ <i>rcsB</i> / <i>E. coli</i> K92 <sup>c</sup>
Síntesis de los ácidos siálicos	<i>kpsF</i>	Posible regulador biosíntesis ácidos siálicos	-2,0
	<i>neuB</i>	NeuNAc sintasa	-2,1
	<i>neuC</i>	UDP-GlcNAc epimerasa	-1,8
	<i>neuD</i>	Aciltransferasa	-1,3
	<i>neuE</i>	Transporte y polimerización ácidos siálicos	-2,3
	<i>neuS</i>	Polisialiltransferasa	-1,9
	<i>kpsM</i>	ABC-Transportador	-1,1
Catabolismo de los ácidos siálicos	<i>nanA</i>	N-Acetil neuraminato liasa	-5,3
	<i>nanE</i>	Posible N-Acetil manosamina-6-P epimerasa	-10,6
	<i>nanT</i>	Posible transportador de ácidos siálicos	-5,3
Regulación de la síntesis de ácido siálico	<i>nanR</i>	Regulador dual transcripcional	+1,0
Síntesis de ácido colánico	<i>wzb</i>	Tirosina fosfatasa	-2,1
	<i>wzc</i>	Tirosina kinasa	-2,7
	<i>wcaA</i>	Posible ácido colánico glicosil transferasa	-2,3
	<i>wcaD</i>	Ácido colánico polimerasa	-3,1
	<i>gmd</i>	GDP-manosa 4,6-dehidratasa	-28,8
	<i>fcl</i>	GDP-fucosa sintasa	-21,8
	<i>wcaK</i>	Posible ácido colánico piruvil transferasa	-4,9
<i>ugd</i>	UDP-glucosa-6-dehidrogenasa	-3,3	
Regulación de la síntesis de ácido colánico	<i>rcsA</i>	Regulador dual transcripcional	-128
	<i>rcsC</i>	Sensor	-3,5
	<i>rcsF</i>	Sensor de glucosa y zinc	-1,1
Regulación de la síntesis de polisacáridos termorregulados	<i>h-ns</i>	Regulador dual transcripcional	-2,0
	<i>rfaH</i>	Antiterminador transcripcional	-2,4
	<i>dsrA</i>	DsrA RNA. Riborregulador de <i>h-ns</i>	-1,4
	<i>slyA</i>	Activador transcripcional	-1,8

(<sup>a</sup>) Genes implicados en el metabolismo y regulación de PA y CA. (<sup>b</sup>) Descripción de los productos codificados por los genes. (<sup>c</sup>) Los niveles relativos de expresión de los genes fue calculado mediante la siguiente fórmula:  $\Delta C_T = (C_T \text{ gen mutante} - C_T \text{ gen control mutante}) - (C_T \text{ gen silvestre} - C_T \text{ gen control silvestre})$ , y luego transformado a cambio relativo usando la fórmula  $2^{-\Delta C_T}$ . Como gen control hemos utilizado el gen housekeeping *gapdh*.

vemos en la Tabla 3.13, sus niveles de expresión han disminuido en la cepa mutante a esta temperatura. Este hecho explicaría el descenso de la expresión observado en el operón *kps* el cual, a su vez, estaría contrarrestando el posible efecto represor que anteriormente vimos de RcsB sobre los genes *kps* a 19°C.

En cuanto a los niveles de expresión de *rfaH*, observamos que, en contra de lo anteriormente descrito por Bittner *et al.* (2002), se vieron afectados tanto por la temperatura de crecimiento como por la mutación en RcsB.

Atendiendo a la Tabla 3.13, también observamos que la expresión de *dsrA* no se modificó significativamente. Cabría pensar que, como en *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsA*, un descenso en los niveles de RcsA en la cepa mutante podría provocar un aumento en la expresión de *dsrA* para contrarrestar su efecto. Sin embargo, en este caso vemos que no ocurre así, posiblemente debido a que el ARN DsrA es mucho más estable a bajas temperaturas (Repoila y Gottesman, 2001).

Aunque no podemos saber con certeza cuales son los mecanismos moleculares que, en *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsB*, han propiciado diferentes respuestas en cuanto a la expresión de los genes de regulación de PA y CA a 19°C y 37°C. Con los resultados obtenidos, si estamos en condiciones de asegurar que RcsB forma parte de un sistema multifactorial que, de manera dependiente de la temperatura, rige la biosíntesis no solo de CA, sino también de PA, regulando la transcripción de los operones *cps* y *kps*, posiblemente, a través del antiterminador transcripcional RfaH. Además, podemos concluir que RcsB no es el responsable de la represión de las cápsulas del grupo 2 (cápsulas de PA) en *E. coli* K92, ya que el mutante defectivo en RcsB, *E. coli* K92 $\Delta$ *rcsB*, no fue capaz de sintetizar PA cuando creció a 19°C (Tabla 3.11).

### 3.4.3 Análisis de gen *rfaH* en *E. coli* K92

Como ya hemos indicado anteriormente (véase Introducción) la proteína RfaH constituye un factor muy importante en la biosíntesis de las cápsulas del grupo 2 en *E. coli* a 37°C y, posiblemente, en las cápsulas de CA (Whitfield, 2006). Así, esta proteína se une a la ARN polimerasa formando un complejo menos sensible a las señales de

terminación de la transcripción y, de esta manera, juega un papel esencial favoreciendo la transcripción de largos clusters de genes que codifican para polisacáridos capsulares (Bailey *et al.*, 2000; Artsimovitch y Landick, 2002; Whitfield, 2006).

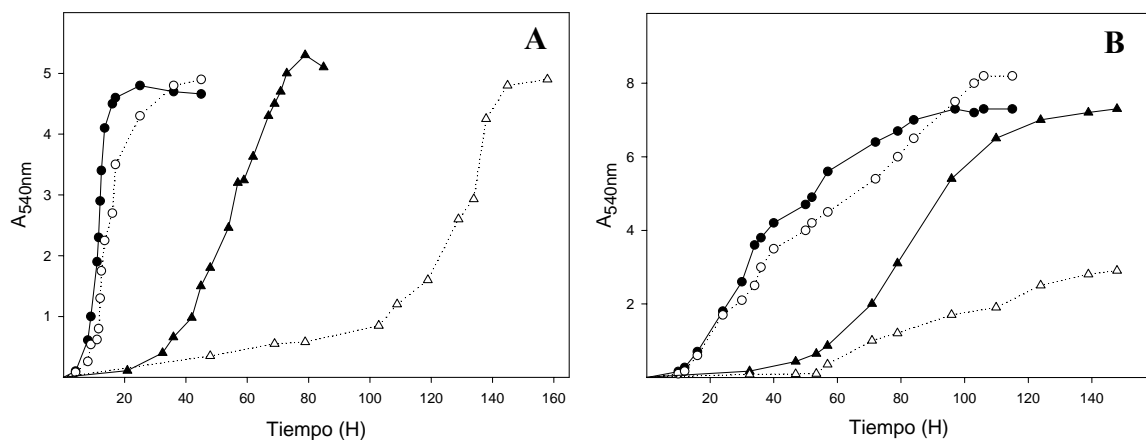
Ya que la expresión de *rfaH* parece estar regulada tanto por la temperatura de crecimiento (véase apartado 3.3.1) como por la proteína RcsB (véase apartado anterior), en este apartado vamos a tratar de abordar la implicación del factor de antiterminación RfaH en el sistema multifactorial que regula la síntesis de ambos polímeros capsulares a 19°C y 37°C. Para ello, al igual que procedimos con los otros mutantes, obtuvimos la cepa mutante *E. coli* K92 $\Delta$ *rfaH* mediante delección del gen *rfaH* en *E. coli* K92 y seguidamente se valoró la producción de CA y PA en distintas condiciones de crecimiento. Además, realizamos un análisis de los genes implicados en la biosíntesis y regulación de ambos polímeros capsulares con el fin de observar la posible influencia del gen *rfaH* sobre la expresión de los mismos.

#### 3.4.3.1 Curvas de crecimiento y producción de CA y PA

Para valorar la posible influencia del gen *rfaH* sobre el crecimiento y la producción de CA y PA en *E. coli* K92 $\Delta$ *rfaH*, se desarrollaron cultivos de esta cepa mutante en MM Glc-Pro y MM Xil-Asn. Como vemos en la Figura 3.34, la mutación de *rfaH* en *E. coli* K92 prácticamente no modificó el crecimiento a 37°C en ninguno de los dos medios utilizados. Sin embargo, la cepa mutante sufrió un considerable retraso en el crecimiento a 19°C en ambos medios de cultivo. Aunque hasta el momento solo se ha relacionado a esta proteína con la biosíntesis de componentes extracelulares, cabe la posibilidad de que también se encuentren implicados otro tipo de genes importantes para el crecimiento bacteriano a bajas temperaturas, como por ejemplo, aquellos implicados en la permeabilidad de la membrana.

Atendiendo a los valores de producción de PA (Tabla 3.14) observamos que, como era de esperar, esta proteína es totalmente imprescindible para la síntesis de este tipo de cápsulas y, en su ausencia, no se detectó producción de PA en *E. coli* K92 $\Delta$ *rfaH* bajo ninguna de las condiciones de crecimiento probadas. Esto está en concordancia con el papel descrito para esta proteína en la transcripción desde el promotor PR3 en la





**Figura 3.34** Curvas de crecimiento de cultivos de *E. coli* K92 (negro) y *E. coli* K92Δ*rfaH* (blanco) establecidos en MM Xil-Asn (A) y en MM Glc-Pro (B) a 37°C (círculos) y 19°C (triángulos).

región 3 del cluster *kps*, de tal manera que su presencia es imprescindible para que la transcripción llegue a la región 2 y se produzca la expresión de los genes necesarios para la biosíntesis de PA.

**Tabla 3.14** Valores de producción de PA y CA en *E. coli* K92 y *E. coli* K92Δ*rfaH* en MM Xil-Asn y Glc-Pro a 37°C y 19°C.

		Producción (μg/ml) de CA y PA en MM Glc-Pro		Producción (μg/ml) de CA y PA en MM Xil-Asn	
		CA	PA	CA	PA
37°C	<i>E. coli</i> K92	89±20	36±10	58±14	165±13
	<i>E. coli</i> K92Δ <i>rfaH</i>	60±8	0	18±2	0
19°C	<i>E. coli</i> K92	1062±260	0	245±41	0
	<i>E. coli</i> K92Δ <i>rfaH</i>	106±11	0	27±8	0

Los valores indican la media de tres experimentos diferentes (± desviación típica).

Por otra parte, la mutación del gen *rfaH* provocó una disminución significativa en la producción de CA en la cepa mutante cuando creció a 37°C y, sobre todo, a 19°C,

donde se registraron valores de producción en torno al 10% de los obtenidos en la cepa silvestre en ambos medios de cultivo. Teniendo en cuenta que el operón *cps* que codifica para los genes biosintéticos del CA tiene un tamaño aproximado de 20 Kb (Stevenson *et al.*, 1996), en cierto modo, este resultado no nos sorprende ya que RfaH favorece la elongación de la transcripción de largos clusters que codifican para polisacáridos extracelulares, como por ejemplo, los genes que codifican para las cápsulas del grupo 1 y 2 en *E. coli*.

Al igual que ocurre con otras proteínas reguladoras de la síntesis de polímeros capsulares (Corbett y Roberts, 2008), estos resultados ponen de manifiesto un papel dual de RfaH sobre la síntesis de PA a 37°C y de CA tanto a 37°C como a 19°C.

#### 3.4.3.2 Análisis de la expresión de genes en *E. coli* K92 $\Delta$ *rfaH*

Como acabamos de ver, la mutación de *rfaH* en *E. coli* K92 provoca una disminución de los niveles de producción de PA, un hecho que previamente se había comprobado en otro tipo de cápsulas del tipo 2 en *E. coli* (Whitfield, 2006). Sin embargo, aunque la capacidad de RfaH para favorecer la transcripción de largos clusters de genes (Bailey *et al.*, 2000; Artsimovitch y Landick, 2002) se había relacionado con el LPS (Pradel y Schnaitman, 1991), los pilis (Beutin y Achtman, 1979) y diferentes estructuras capsulares (Bailey *et al.*, 2000; Whitfield, 2006), nosotros hemos visto un efecto directo sobre el CA, ya que *E. coli* K92 $\Delta$ *rfaH* ve significativamente menguada su capacidad para sintetizar CA en ambos medios utilizados, principalmente cuando la bacteria crece a 19°C.

Ya que RfaH es un antiterminador transcripcional, estudiamos cómo esta proteína podía afectar a la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de PA y CA en *E. coli* K92 y, además, ver el grado de implicación de esta molécula en el sistema multifactorial de regulación dependiente de temperatura que afecta al metabolismo general de ambos polímeros capsulares. Para ello, se desarrollaron cultivos de ambas cepas, *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ *rfaH*, en MM Xil-Asn y MM Glc-Pro tanto a 37°C y 19°C, y obtuvimos muestras de ARN en mitad de la fase exponencial con el fin de establecer posibles diferencias en los niveles de expresión de los genes estudiados. Debido a su importancia en el metabolismo general y en la regulación dependiente de

temperatura de CA y PA, los genes analizados fueron básicamente los mismos que en los apartados anteriores.

En primer lugar, estudiamos las diferencias de expresión de los genes objeto de estudio cuando *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ *rfaH* crecieron a 19°C. Atendiendo a los resultados obtenidos (Tabla 3.15), observamos que la mutación en *rfaH* provocó una disminución de la expresión del operón *kps*, debido a que esta molécula es necesaria para la transcripción de las regiones 2 y 3 del operón (Corbett y Roberts, 2008). Por otra parte, esta mutación apenas afectó al operón catabólico *nan* a excepción del gen *nanA*, el cual está implicado en la ruta anabólica de los ácidos siálicos en *E. coli* K92 (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1995; Ferrero *et al.*, 1996). Sin embargo, se observó una importante disminución en los niveles de expresión de *nanR* en la cepa mutante.

Con respecto a los genes implicados en la biosíntesis de CA, vimos como la mutación de *rfaH* provocó un importante descenso en la expresión de los genes que pertenecen al largo operón *cps*, y en menor medida del gen *ugd*. Este resultado justifica con los valores tan bajos de producción de CA obtenidos cuando *E. coli* K92 $\Delta$ *rfaH* creció a 19°C (véase Tabla 3.14) y, además, corrobora la implicación del factor de antiterminación transcripcional RfaH sobre la transcripción del largo transcrito originado del operón *cps*.

Además, en *E. coli* K92 $\Delta$ *rfaH* observamos un descenso en los niveles de expresión de algunos de los genes del sistema Rcs (*rcsB* y *rcsF*) y de *rcsA*. No sabemos como la acción directa que ejerce RfaH sobre la transcripción de determinados operones puede influir sobre los niveles de expresión del sistema de regulación Rcs. Lo que si parece claro es que, a diferencia de los resultados descritos por Bittner *et al.* (2002), RfaH y el sistema Rcs se encuentran interrelacionados formando parte del sistema multifactorial dependiente de temperatura que rige la expresión de PA y CA en *E. coli* K92.

En cuanto a los genes implicados en la termorregulación de polisacáridos, los resultados obtenidos reflejan que la delección de *rfaH* en *E. coli* K92 solamente afectó a los niveles de expresión de *h-ns* cuando la cepa mutante creció a 19°C. Debido a la complejidad funcional de ambas moléculas en la biosíntesis de PA y CA a 37°C y 19°C, futuros

**Tabla 3.15** Diferencias entre *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ *rfaH* en los niveles de expresión medidos por qPCR de genes implicados en el metabolismo y regulación del CA y PA. Los valores positivos y negativos muestran una mayor expresión en las cepas *E. coli* K92 $\Delta$ *rfaH* y *E. coli* K92 respectivamente, ambas crecidas a 19°C.

Función	Gen <sup>a</sup>	Producto <sup>b</sup>	<i>E. coli</i> K92 $\Delta$ <i>rfaH</i> / <i>E. coli</i> K92 <sup>c</sup>
Síntesis de los ácidos siálicos	<i>kpsF</i>	Posible regulador biosíntesis ácidos siálicos	-1,4
	<i>neuB</i>	NeuNAc sintasa	-2,4
	<i>neuC</i>	UDP-GlcNAc epimerasa	-5,1
	<i>neuD</i>	Aciltransferasa	-4,8
	<i>neuE</i>	Transporte y polimerización ácidos siálicos	-1,7
	<i>neuS</i>	Polisialiltransferasa	-1,0
	<i>kpsM</i>	ABC-Transportador	+1,3
Catabolismo de los ácidos siálicos	<i>nanA</i>	N-Acetil neuraminato liasa	-2,8
	<i>nanE</i>	Posible N-Acetil manosamina-6-P epimerasa	-1,1
	<i>nanT</i>	Posible transportador de ácidos siálicos	-1,3
Regulación de la síntesis de ácido siálico	<i>nanR</i>	Regulador dual transcripcional	-4,0
Síntesis de ácido colánico	<i>wzb</i>	Tirosina fosfatasa	-31,0
	<i>wzc</i>	Tirosina kinasa	-31,1
	<i>wcaA</i>	Posible ácido colánico glicosil transferasa	-25,2
	<i>wcaD</i>	Ácido colánico polimerasa	-39,4
	<i>gmd</i>	GDP-manosa 4,6-dehidratasa	-47,5
	<i>fcl</i>	GDP-fucosa sintasa	-47,1
	<i>wcaK</i>	Posible ácido colánico piruvil transferasa	-21,8
	<i>ugd</i>	UDP-glucosa-6-dehidrogenasa	-10,5
Regulación de la síntesis de ácido colánico	<i>rcaA</i>	Regulador dual transcripcional	-2,1
	<i>rcaB</i>	Regulador dual transcripcional	-2,0
	<i>rcaC</i>	Sensor	+1,0
	<i>rcaF</i>	Sensor de glucosa y zinc	-2,4
Regulación de la síntesis de polisacáridos termorregulados	<i>h-ns</i>	Regulador dual transcripcional	-2,6
	<i>dsrA</i>	DsrA RNA. Riborregulador de <i>h-ns</i>	+1,3
	<i>slyA</i>	Activador transcripcional	+1,3

(<sup>a</sup>) Genes implicados en el metabolismo y regulación de PA y CA. (<sup>b</sup>) Descripción de los productos codificados por los genes. (<sup>c</sup>) Los niveles relativos de expresión de los genes fue calculado mediante la siguiente fórmula:  $\Delta C_T = (C_T \text{ gen mutante} - C_T \text{ gen control mutante}) - (C_T \text{ gen silvestre} - C_T \text{ gen control silvestre})$ , y luego transformado a cambio relativo usando la fórmula  $2^{-\Delta C_T}$ . Como gen control hemos utilizado el gen housekeeping *gapdh*.

estudios pueden ir encaminados a dilucidar este aspecto, ya que, como ya hemos reflejado en este trabajo, ambas moléculas son clave en todo este entramado sistema de regulación.

Por otra parte, también estudiamos el grado de implicación de la proteína RfaH en la regulación de las cápsulas de PA y CA a 37°C. Con respecto a los genes implicados en el metabolismo general del PA, vimos que, al igual que ocurría cuando *E. coli* K92 $\Delta$ rfaH crecía a 19°C, la mutación en RfaH producía una disminución en los niveles de expresión del operón *kps* y del operón *nan* (Tabla 3.16). No obstante, en este caso, la disminución es mucho más drástica, precisamente cuando ambos operones se están expresando más en la cepa silvestre (Tabla 3.7). Como se muestra en la Tabla 3.16, el único gen que no se vio afectado fue *kpsF*, y como explicamos anteriormente, es debido a que el factor de antiterminación RfaH solo afecta a la transcripción de las regiones 2 y 3 del operón *kps* y *kpsF* se encuentra en la región 1 (Corbett y Roberts, 2008).

En cuanto a los genes implicados en la biosíntesis de CA pertenecientes al operón *cps*, vimos que sus niveles de expresión descendieron cuando *E. coli* K92 $\Delta$ rfaH creció a 37°C (Tabla 3.16), como ya ocurrió cuando la bacteria creció a 19°C. Teniendo en cuenta que los valores de producción de CA disminuyeron en *E. coli* K92 $\Delta$ rfaH hasta en un 90% (Tabla 3.14), estos resultados nos permiten concluir que RfaH está implicado directamente en la regulación de la biosíntesis de CA a través de la activación de la expresión del operón *cps*. Por otra parte, a diferencia de lo que ocurrió a 19°C, los niveles de expresión de *ugd* no se vieron alterados en *E. coli* K92 $\Delta$ rfaH a 37°C (Tabla 3.16). Aunque el gen *ugd* se encuentre directamente implicado en la biosíntesis de CA, no pertenece al operón *cps* y su regulación puede ser independiente. Este hecho sugiere que la disminución de la expresión de *ugd* a 19°C sea un efecto combinado de la ausencia de RfaH y la temperatura.

Al igual que ocurrió a 19°C, cuando *E. coli* K92 $\Delta$ rfaH creció a 37°C se observó un descenso en los niveles de expresión de algunos genes del sistema Rcs que controla la biosíntesis de CA. Nuevamente, este hecho nos hace sugiere que RfaH y el sistema Rcs se encuentran interrelacionados formando parte del complejo sistema de regulación de PA y CA dependiente de temperatura.

**Tabla 3.16** Diferencias entre *E. coli* K92 y *E. coli* K92 $\Delta$ *rfaH* en los niveles de expresión medidos por qPCR de genes implicados en el metabolismo y regulación del CA y PA. Los valores positivos y negativos muestran una mayor expresión en las cepas *E. coli* K92 $\Delta$ *rfaH* y *E. coli* K92 respectivamente, ambas crecidas a 37°C.

Función	Gen <sup>a</sup>	Producto <sup>b</sup>	<i>E. coli</i> K92 $\Delta$ <i>rfaH</i> / <i>E. coli</i> K92 <sup>c</sup>
Síntesis de los ácidos siálicos	<i>kpsF</i>	Posible regulador biosíntesis ácidos siálicos	+1,0
	<i>neuB</i>	NeuNAc sintasa	-80,2
	<i>neuC</i>	UDP-GlcNAc epimerasa	-71,3
	<i>neuD</i>	Aciltransferasa	-16,0
	<i>neuE</i>	Transporte y polimerización ácidos siálicos	-305,5
	<i>neuS</i>	Polisialiltransferasa	-271,0
	<i>kpsM</i>	ABC-Transportador	-10,0
Catabolismo de los ácidos siálicos	<i>nanA</i>	N-Acetil neuraminato liasa	-113,8
	<i>nanE</i>	Posible N-Acetil manosamina-6-P epimerasa	-105,6
	<i>nanT</i>	Posible transportador de ácidos siálicos	-171,0
Regulación de la síntesis de ácido siálico	<i>nanR</i>	Regulador dual transcripcional	+1,7
Síntesis de ácido colánico	<i>wzb</i>	Tirosina fosfatasa	-3,1
	<i>wzc</i>	Tirosina kinasa	-3,6
	<i>wcaA</i>	Posible ácido colánico glicosil transferasa	-1,6
	<i>wcaD</i>	Ácido colánico polimerasa	-2,8
	<i>gmd</i>	GDP-manosa 4,6-dehidratasa	-3,8
	<i>fcl</i>	GDP-fucosa sintasa	-6,1
	<i>wcaK</i>	Posible ácido colánico piruvil transferasa	-1,8
	<i>ugd</i>	UDP-glucosa-6-dehidrogenasa	+1,4
Regulación de la síntesis de ácido colánico	<i>rcaA</i>	Regulador dual transcripcional	-2,1
	<i>rcaB</i>	Regulador dual transcripcional	+1,0
	<i>rcaC</i>	Sensor	-4,5
	<i>rcaF</i>	Sensor de glucosa y zinc	+1,5
Regulación de la síntesis de polisacáridos termorregulados	<i>h-ns</i>	Regulador dual transcripcional	+1,0
	<i>dsrA</i>	DsrA RNA. Riborregulador de <i>h-ns</i>	+1,5
	<i>slyA</i>	Activador transcripcional	+1,5

(<sup>a</sup>) Genes implicados en el metabolismo y regulación de PA y CA. (<sup>b</sup>) Descripción de los productos codificados por los genes. (<sup>c</sup>) Los niveles relativos de expresión de los genes fue calculado mediante la siguiente fórmula:  $\Delta C_T = (C_T \text{ gen mutante} - C_T \text{ gen control mutante}) - (C_T \text{ gen silvestre} - C_T \text{ gen control silvestre})$ , y luego transformado a cambio relativo usando la fórmula  $2^{-\Delta C_T}$ . Como gen control hemos utilizado el gen housekeeping *gapdh*.

En cuanto a los genes implicados en la regulación de la biosíntesis de polisacáridos termorregulados, observamos que ninguno de ellos se vio afectado cuando la cepa mutante creció a 37°C.

Hasta el momento se conoce muy poco sobre las señales que estimulan la expresión de *rfaH*, un antiterminador transcripcional de clusters largos (Bailey *et al.*, 2000; Artsimovitch y Landick, 2002; Whitfield, 2006) y su participación en la regulación de la expresión de estructuras capsulares de naturaleza glucídica. A pesar de que Bittner *et al.* (2002) han descrito que los niveles de expresión de *rfaH* no se ven alterados bajo condiciones que promueven la síntesis de exopolisacáridos a través de la inducción del sistema Rcs, tales como el *shock* osmótico o las bajas temperaturas, este trabajo nos ha permitido revelar la participación de *rfaH* en la regulación dependiente de la temperatura de crecimiento de la síntesis de CA y PA en *E. coli* K92. Así, las bajas temperaturas de crecimiento afectan negativamente a los niveles de expresión del gen *rfaH* (Tabla 3.7) y la proteína RfaH estimula la biosíntesis de la cápsulas de PA al favorecer la transcripción del operón *kps* (Tablas 3.15 y 3.16), como anteriormente se había descrito (Corbett y Roberts, 2008). Además, existe una relación directa entre el antiterminador transcripcional RfaH y la biosíntesis de cápsulas de PA y de CA. Ya que, aunque RfaH se había relacionado con la transcripción, en general, de largos clusters de genes implicados en la biosíntesis de estructuras polisacáridicas (Bailey *et al.*, 2000; Artsimovitch y Landick, 2002; Whitfield, 2006), esta es la primera vez que se establece que esta proteína controla los niveles de transcripción de los operones *kps* y *cps* y, por lo tanto, la biosíntesis de PA y CA en *E. coli* K92. Finalmente, resaltar que la mutación de *rfaH* provoca una disminución de los niveles de transcripción de los operones *cps* y *kps*. Aunque no se saben cuales son las moléculas implicadas en esta respuesta, establecemos que este mecanismo está fuertemente influenciado por la temperatura.

Por lo tanto, la implicación de *rfaH* y la participación del sistema Rcs y la proteína auxiliar RcsA en la termorregulación de CA y PA en *E. coli* K92 queda palpablemente demostrada con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Aunque ninguna de ellas ejerce un efecto total, sí participan en el proceso de regulación por temperatura. Estos hechos concuerdan con la propuesta formulada por Corbett y Roberts (2008) donde se contempla la existencia de un complejo sistema multifactorial como responsable de la

termorregulación ejercida sobre la expresión de las cápsulas del tipo 2 que coexpresan con CA. Nuestros resultados permiten sugerir que los tres genes estudiados (*rcsA*, *rcsB* y *rfaH*) forman parte del complejo termorregulador. La obtención de nuevos mutantes relacionados con genes que potencialmente intervienen en la termorregulación de estos polímeros permitirá esclarecer nuevos elementos de este entramado sistema de regulación y nos revelará el mecanismo exacto por el que una simple señal física –la temperatura de crecimiento– es capaz de modificar el fenotipo superficial de una bacteria para adaptarse a las nuevas condiciones del entorno.

*E. coli* representa de muchas formas el modelo de trabajo ideal, con una larga historia como organismo de laboratorio y, sin duda, como una fuente clásica de proteínas (enzimas) y, más recientemente, un microorganismo básico en la obtención y manipulación de polisacáridos de interés industrial y tecnológico. La producción de quito-oligosacáridos O-acetilados y sulfatados (Samain *et al.*, 1999), la producción a gran escala de oligosacáridos de la leche de humanos (Priem *et al.*, 2002) y su posterior glucuronidación (Yavuz *et al.*, 2008), son algunos de estos ejemplos. Nosotros creemos que la ingeniería de polisacáridos representa un área potencialmente por explotar, especialmente si consideramos que algunos polisacáridos de importancia biomédica, como por ejemplo la heparina, son todavía extraídos de fuentes animales (Corbett y Roberts, 2008). Aunque, como tal, hoy por hoy, no existe una clara necesidad para buscar una ruta biotecnológica alternativa segura, el conocimiento molecular de los mecanismos que intervienen en los procesos de biosíntesis y regulación de exopolisacáridos bacterianos y su eficiente expresión heteróloga en *E. coli* será la que nos ofrecerá el camino hacia la gran diversidad. A largo plazo, la meta final será explotar las rutas de transporte de las cápsulas en *E. coli* para conseguir la exportación de los nuevos polisacáridos heterólogos, y así, facilitar su rápida purificación.



## **4. Conclusiones**

---



1. *E. coli* K92 es una bacteria que, además de producir ácido polisiálico, es capaz de expresar una cápsula de ácido colánico en su superficie celular, la cual, como hemos comprobado, le confiere a la bacteria una barrera de protección frente a los daños causados por el estrés osmótico y oxidativo y resistencia frente a ampicilina.

2. La expresión de ambos polímeros capsulares, ácido colánico y ácido polisiálico, en la superficie de *E. coli* K92 está regulada directamente por la temperatura de crecimiento. Además, los mayores valores de producción de ácido polisiálico observados cuando *E. coli* K92 crece a 37°C se corresponden con los mayores valores de expresión de los genes implicados en el metabolismo general (operones *kps* y *nan*) de este polímero capsular. Del mismo modo, el aumento en la expresión del operón *cps* y de los genes *ugd* y *rcsA* a 19°C está en concordancia con los mayores valores de producción de ácido colánico observados a esta temperatura.

3- Las proteínas reguladoras RcsA y RcsB son capaces de estimular la expresión del operón *cps* y, en consecuencia, de favorecer la síntesis de ácido colánico cuando *E. coli* K92 crece tanto a 37°C como a 19°C. Además, estas proteínas no resultan ser totalmente imprescindibles para la expresión de este operón ya que, en ningún caso, la mutación de cualquiera de ellas anuló por completo la expresión del operón *cps*. Por otra parte, RcsA y RcsB no parecen ser las responsables de la represión de las cápsulas del tipo 2 (cápsulas de ácido polisiálico) en *E. coli* K92 cuando crece a bajas temperaturas, ya que en ninguno de los dos casos, la mutación del gen permitió que la bacteria sintetizara ácido polisiálico a bajas temperaturas.

4. Los resultados obtenidos muestran claros indicios de que las proteínas RcsA y RcsB regulan negativamente la expresión de las cápsulas de ácido polisiálico en *E. coli* K92, ya que se observó un aumento en la producción de este polímero capsular cuando las cepas mutantes *E. coli* K92 $\Delta$ *rscA* o *E. coli* K92 $\Delta$ *rscB* crecieron a 37°C. Además, hemos demostrado que RcsB afecta negativamente a la expresión de las regiones 2 y 3 del operón *kps* a bajas temperaturas.

**5. El factor de antiterminación transcripcional, RfaH, no solamente es capaz de prolongar la transcripción del operón *kps* y favorecer la biosíntesis de PA, sino que además, permite la expresión de los genes del operón *cps*, y en consecuencia, de la biosíntesis de las cápsulas de ácido colánico en *E. coli* K92. Por otra parte, nuestros resultados indican que, posiblemente, RfaH participa en la regulación negativa de RcsB sobre las cápsulas de ácido polisiálico. Las proteínas RcsB y RfaH se encuentran funcionalmente interconectadas formando parte de un complejo sistema de regulación dependiente de la temperatura que rige la biosíntesis de la cápsulas del ácido colánico y, en general, de las cápsulas del grupo 2 (cápsulas de ácido polisiálico) en *E. coli*.**

## **5. Anexos**

---



## ANEXO 1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Tabla 1. Expresión heteróloga de la proteína Wzc en *E. coli*

Experimento	Nombre	Gen	Secuencia de nucleótidos (5'-3')
Clonación de Wzc fusionado a GST	WzcD-42	<i>wzc</i>	GTACACATGAATTCAACGGTCTGCCC ( <i>EcoRI</i> )
	WzcR-42	<i>wzc</i>	GGTTGTTCTGCAGGCTTATGAGCTGG ( <i>PstI</i> )

Tabla 2. Obtención de mutantes en *E. coli* K92 mediante delección

Experimento	Nombre	Gen	Secuencia de nucleótidos (5'-3')
Delección del gen <i>rcsA</i>	DRcsA 1	<i>rcsA</i>	CGACTAGGTTTAACCGGGTATCTG
	DRcsA 2	<i>rcsA</i>	GTTGATTAATGATGAGCTTGATACGC
	DRcsA 3	<i>rcsA</i>	CGACGTTATCATTGAGCCGAAC
	DRcsA 4	<i>rcsA</i>	CATTAGTCACATTATCCGTCAGTCG
Delección del gen <i>rcsB</i>	DRcsB 1	<i>rcsB</i>	TGAACGTAATTATTGCCGATGACC
	DRcsB 2	<i>rcsB</i>	GGAAATGGCGCTTGATGTACTTG
	DRcsB 3	<i>rcsB</i>	CAGTGCTGGTGGTTACGGTGAC
	DRcsB 4	<i>rcsB</i>	CTTTATCTGCCGGACTTAAGGTCAC
Delección del gen <i>rfaH</i>	DrfaH 1	<i>rfaH</i>	CTCACGCCAAAGCCATCATCC
	DrfaH	<i>rfaH</i>	GAAAGACATTGTCGATCCGGC
	DrfaH	<i>rfaH</i>	CAGGGTGATCATCGGTGCCAG
	DrfaH	<i>rfaH</i>	CGTCAAGAAGTCGCGTAAATCG

Tabla 3. Análisis de la expresión mediante qPCR

Papel del gen	Nombre	Gen	Secuencia de nucleótidos (5'-3')
<b>Housekeeping</b>	qGapdh D	<i>gapdh</i>	AAGTTGGTGTGACGTTGTTCGC
	qGapdh R		AGCGCCTTTAACGAACATCG
<b>Implicados en la biosíntesis del colánico</b>	qWzb D	<i>wzb</i>	GAGCTGAAAGTGGAGTCCG
	qWzb R		GACCTTCCAGAGACAGTTGATG
	qWzc D	<i>wzc</i>	CAACAAAACTACACCCTGAG
	qWzc R		GCCTTCTTTTTTCAGCATC
	qWcaA D	<i>wcaA</i>	CACCGGGATTGATGACGATGAC
	qWcaA R		GGCGTGTGTGACCAGTTGCTG
	qWcaD D	<i>wcaD</i>	GCGCACGACAGCACTTTATTTTC
	qWcaD D		CATAGCATCTGTTTTAGGCGTTTTG
	qGmd D	<i>gmd</i>	CTCGTTTCTATCAGGCTTCCACC
	qGmd R		GTAGTTAACGGTGATCCAGTAGGCG
	qFcl D	<i>fcl</i>	GAGAGCAACATCATTACGCCG
	qFcl R		CAGTTTCGGGTAGATGCAGGACG
	qWcaK D	<i>wcaK</i>	GAAACGCAGCAATATCACCACC
	qWcaK R		GTGTTGAACGGCATAGCTGGC
	qUgd D	<i>ugd</i>	GTACTTTAACGAACTGGATAGC
	qUgd R		GACAATAACCACCATAACCAAAC
<b>Reguladores de la biosíntesis del ácido colánico</b>	qRcsA D	<i>rcaA</i>	CGTATCAAGCTCATCATTAAATC
	qRcsA R		GCCATAAAAACGATAAATAACG
	qRcsB D	<i>rcaB</i>	GTACATCAAGCGCCATTTCC
	qRcsB R		CAATACCGCACTAAGAATCGC
	qRcsC D	<i>rcaC</i>	CCAGAAAGTAAAATTAAGGGCGATC
	qRcsC R		GAATACACGATGCTTAGCGATGAG
	qRcsF D	<i>rcaF</i>	CAGAAGAATTAGTCGGCAAAC
	qRcsF R		GCGGAGAGTCCTGATTAGAG



<b>Implicados en la biosíntesis del ácido polisiálico</b>	qNeuA D	<i>neuA</i>	CACTCGCTGTTTGATTATTGG
	qNeuA R		CAAACCTCTCCGAAATTAACAATC
	qNeuB D	<i>neuB</i>	CAATAGAACCTGATGAACTGAAAC
	qNeuB R		CATCTAAATTTAAACTGACTGC
	qNeuC D	<i>neuC</i>	GAGGTTCCATCTTTAAAAGTTG
	qNeuC R		CATCTATTACACTGGCTCCAC
	qNeuD D	<i>neuD</i>	GTACTTAATGGTGATGTTTCTGTTGG
	qNeuD R		CCGACCCAGAACCAATAATACTC
	qNeuE D	<i>neuE</i>	GACGCCAATAAAGAGGATAGAATATGC
	qNeuE R		CAAATCGAAGCGTTCAATGTATTCC
	qNeuS D	<i>neuS</i>	GCATCATCTTCTTTGGTATACGCAC
	qNeuS R		CGCAGCGTATTAATCCCTTTTTG
	qKpsF D	<i>kpsF</i>	GTTTGTGTGACTGTGGCATTATTTC
	qKpsF R		GGCGAACAGAGGTAATTAGATATGG
	qKpsM D	<i>kpsM</i>	GCACTGCTTGAGACACTGATTTACG
	qKpsM R		GAAAGAATGATTAACAACTCCAGGAG
	qNanA D	<i>nanA</i>	CCTGATCTTGTGCTCTATAACG
	qNanA R		GCCCATGATGTTGTAGGTAC
	qNanE D	<i>nanE</i>	CTATATTGAAGATGTTGATGCGC
	qNanE R		CGTCAATGGCGATAATGTC
qNanT D	<i>nanT</i>	GTGAACATCGCATTGCCAATATC	
qNanT R		GAAGCAGAACCACAGCGCAGTAG	
<b>Fosfogluconato deshidrogenasa</b>	qPgl D	<i>pgl</i>	GGCAGTTTGTCTTTGTAGGTTC
	qPgl R		GTTGTCCGGTGAGATATTGGC
<b>Regulador de la biosíntesis del ácido polisiálico</b>	qNanR D	<i>nanR</i>	GTTAAAACGCAAAGGTCTGGTG
	qNanR R		GTTGATTTCCAGTGCTTTTGCC

<b>Reguladores de la biosíntesis de polisacáridos termorregulados</b>	qH-ns D	<i>h-ns</i>	CTCGTAAACTGCAGCAATATC
	qH-ns R		CTTTGGTGCCAGATTTAACG
	qDsrA D	<i>dsrA</i>	CACATCAGATTTCTGGTGTAAC
	qDsrA D		TCGGGATGAACTTGCTTAAG
	qRfaH D	<i>rfaH</i>	GCGGTTATTCATCAGCTATCGG
	qRfaH R		CGCGCCTTCGGTAATAATCAC
	qSlyA D	<i>slyA</i>	GACCATCGCCTGAAACCGC
	qSlyA R		GCGACTGGTCTGGAGGTAAGT

## **6. Bibliografía**

---



- Adlam, C., Knights, J.M., Mugridge A., Lindon J.C., Williams J.M., Beesley J.E.** (1986) Purification, characterization and immunological properties of the serotype-specific capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* serotype A7 organisms. *J Gen Microbiol* **132**: 1079-1087.
- Archibald, A.R.** (1989) Structure and assembly of the cell wall in *Bacillus subtilis*. *Biochem Soc Trans* **13**: 990-992.
- Artsimovitch, I., Landick, R.** (2000) Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7090-7095.
- Bagga, H., Burkhardt, D., Sambrook, P., March, L.** (2006) Longterm effects of intraarticular hyaluronan on synovial fluid in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* **33**:946-950
- Bailey, M.J., Hughes, C., Koronakis, V.** (1997) RfaH and the ops element, components of a novel system controlling bacterial transcription elongation. *Mol Microbiol* **26**: 845-851.
- Bailey, M.J., Hughes, C., Koronakis, V.** (2000) In vitro recruitment of the RfaH regulatory protein into a specialised transcription complex, directed by the nucleic acid ops element. *Mol Gen Genet* **262**: 1052-1059.
- Balazs, E.A., Dellinger, J.L.** (1993) Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* **39**:3-9.
- Barry, G.T.** (1959) Detection of sialic acid in various *E. coli* strains and others species of bacteria. *Nature* **183**: 117-118.
- Barry, G.T., Goebel, W.F.** (1957) Colominic acid, a substance of bacterial origin related to sialic acid. *Nature* **179**: 206.
- Beis, K., Collins, R.F., Ford, R.C., Kamis, A.B., Whitfield, C., Naismith J.H.** (2004) Three-dimensional structure of Wza, the protein required for translocation of group 1 capsular polysaccharide across the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**: 28227-28232.

- Beutin, L., Achtman, M.** (1979) Two *Escherichia coli* chromosomal cistrons, *sfrA* and *sfrB*, which are needed for expression of F factor *tra* functions. *J Bacteriol* **139**: 730-737.
- Beveridge, T.J.** (1988) The bacterial surface: general considerations towards design and function. *Can J Microbiol* **34**: 363-372.
- Beveridge, T.J., Graham, L.L.** (1991) Surface layers of bacteria. *Microbiol Rev* **55**: 684-705.
- Bhattacharjee, A.K., Jennings, H.J., Kenny, C.P., Martin, A., Smith, I.C.** (1975) Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance. *J Biol Chem* **250**: 1926-1932.
- Bhosle, N., Suci, P.A., Baty, A.M., Weiner, R.M., Geesey, G.G.** (1998) Influence of Divalent Cations and pH on Adsorption of a Bacterial Polysaccharide Adhesin. *J Colloid Interface Sci* **205**: 89-96.
- Bittner, M., Saldias, S., Estévez, C., Zaldívar, M., Marolda, C.L., Valvano, M.A., Contreras, I.** (2002) O-antigen expression in *Salmonella enterica* serovar *Typhi* is regulated by nitrogen availability through RpoN-mediated transcriptional control of the *rfaH* gene. *Microbiology* **148**: 3789-3799.
- Boulnois, G.J., Jann, K.** (1989) Bacterial polysaccharides capsule synthesis, export and evolution of structural diversity. *Mol Microbiol* **3**: 1819-1823.
- Bradford, M.** (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brooks, C.S., Hefty, P.S., Jolliff, S.E., Akins, D.R.** (2003) Global analysis of *Borrelia burgdorferi* genes regulated by mammalian host-specific signals. *Infect Immun* **71**: 3371-3383.
- Burns, S.M., Hull S.I.** (1998) Comparison of loss of serum resistance by defined lipopolysaccharide mutants and an acapsular mutant of uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5. *Infect Immun* **66**: 4244-4253.

- Burns, S.M., Hull S.I** (1999) Loss of resistance to ingestion and phagocytic killing by O(-) and K(-) mutants of a uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5 strain. *Infect Immun* **67**: 3757-3762.
- Cescutti, P., Bigio, M., Guarnieri, V.** (1996) Determination of the size and degree of acetyl substitution of oligosaccharides from *Neisseria meningitidis* group A by ionspray mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* **224**: 444-450.
- Charland, N., Kobisch, M., Martineau-Doizé, B., Jacques, M., Gottschalk, M.** (1996) Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* **14**: 195-203.
- Chen, J., Lee, S.M., Mao, Y.** (2004) Protective effect of exopolysaccharide colanic acid of *Escherichia coli* O157:H7 to osmotic and oxidative stress. *Int J Food Microbiol* **93**: 281-286.
- Chen, M.H., Takeda, S., Yamada, H., Ishii, Y., Yamashino, T., Mizuno, T.** (2001) Characterization of the RcsC-->YojN-->RcsB phosphorelay signaling pathway involved in capsular synthesis in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 2364-2367.
- Collins, R.F., Beis, K., Dong, C., Botting, C.H., McDonnell, C., Ford, R.C., Clarke, B.R., Whitfield, C., Naismith, J.H.** (2007) The 3D structure of a periplasm-spanning platform required for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2390-2395.
- Corbett, D., Roberts, I.S.** (2008) Capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol* **65**: 1-26.
- Corfield, A.P., Schauer, R.** (1982) Occurrence of sialic acid. En: Sialic Acids. Chemistry, Metabolism and Function, pp. 5-50. Ed: Schauer, R. Springer-Verlag, New York.
- Cotter, P.A., Miller, J.F.** (1998) In vivo and ex vivo regulation of bacterial virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol* **1**: 17-26.
- Crawford, R.W., Gibson, D.L., Kay, W.W., Gunn, J.S.** (2008) Identification of a bile-induced exopolysaccharide required for *Salmonella* biofilm formation on gallstone surfaces. *Infect Immun* **76**: 5341-5349.

- Danese, P.N., Pratt, L.A., Kolter, R.** (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* **182**: 3593-3596.
- Davidson, A.L., Chen, J.** (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* **73**: 241-268.
- de Lorenzo, V., Timmis, K.N.** (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**: 386-405.
- Dong, C., Beis, K., Nesper, J., Brunkan-Lamontagne, A.L., Clarke, B.R., Whitfield, C., Naismith, J.H.** (2006) Wza the translocon for *E. coli* capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein. *Nature* **444**: 226-229.
- Donnenberg, M.S., Kaper, J.B.** (1991) Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* **59**: 4310-4317.
- Du, Y., Rosqvist, R., Forsberg, A.** (2002) Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect Immun* **70**: 1453-1460.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.A., Rebers, P.A., Smith, F.** (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* **28**: 350-356.
- Egan, W., Liu, T., Dorow, D., Cohen, J.S., Robbins, J.D., Gotschlich, E.C., Robbins, J.B.** (1977) Structural studies on the sialic acid polysaccharide antigen in *E. coli* strain Bos-12. *Biochemistry* **16**: 3687-3692.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N.** (2001) Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* **1**: 529-539.
- Félix, A., Bhatnagar, S.S., Pitt, R.M.** (1934) Observation on the properties of the VI antigen of *B. Typhosus*. *Br J Ex Pathol* **15**: 346-354.
- Ferrero, M.A., Luengo, J.M., Reglero, A.** (1991) H.p.l.c. of oligo (sialic acids). Application to the determination of the minimal chain length serving as exogenous acceptor in the enzymic synthesis of colominic acid. *Biochem J* **280**: 575-579.



- Ferrero, M.A., Reglero, A., Fernández-López, M., Ordás, R., Rodríguez-Aparicio, L.B.** (1996) N-acetyl-D-neuraminic acid lyase generates the sialic acid for colominic acid biosynthesis in *Escherichia coli* K1. *Biochem J* **317**: 157-165.
- Ferrieres, L., Clarke, D.J.** (2003) The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Mol Microbiol* **50**: 1665-1682.
- Fletcher, M.** (1988) Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *J Bacteriol* **170**: 2027-2030.
- Freitas, F., Alves, V.D., Pais, J., Costa, N., Oliveira, C., Mafra, L., Hilliou, L., Oliveira, R., Reis, M.A.** (2009) Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresour Technol* **100**: 859-865.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., Stoodley, P.** (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* **13**: 34-40.
- Gamian, A., Jones, C., Lipiński, T., Korzeniowska-Kowal, A., Ravenscroft, N.** (2000) Structure of the sialic acid-containing O-specific polysaccharide from *Salmonella enterica* serovar *Toucra* O48 lipopolysaccharide. *Eur J Biochem* **267**: 3160-3167.
- Garegg, P.J., Lindberg, B., Onn, T., Sutherland, I.W.** (1971) Comparative structural studies on the M-antigen from *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Aerobacter cloacae*. *Acta Chem Scand* **25**: 2103-2108.
- Gay, P., Lecoq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E., Hoch, J.A.** (1983) Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **153**: 1424–1431.
- Giangrossi, M., Zattoni, S., Tramonti, A., De Biase, D., Falconi, M.** (2005) Antagonistic role of H-NS and GadX in the regulation of the glutamate decarboxylase-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 21498-21505.
- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S.** (1996) Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol* **178**: 6618-6622.

- Glauert, A.M., Lewis, P.R.** (1998) Biological Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy. Clare Hall and Physiological Laboratory, University of Cambridge, UK.
- Glode, M.P., Sutton, A., Robbins, J.B., McCracken, G.H., Gotschlich, E.C., Kaijser, B., Hanson, L.A.** (1977) Neonatal meningitis due of *Escherichia coli* K1. *J Infect Dis* **136** Suppl: S93-97.
- Glynn, A.A.** (1972) Microbial Pathogenicity in Man and Animals. p 75. Cambridge Univ Press, London and New York.
- Goebel, W.F.** (1963) Colanic Acid. *Proc. Natl. Acad. Sci* **49**: 464-471.
- González-Clemente, C., Luengo, J.M., Rodríguez-Aparicio, L.B., Ferrero, M.A., Reglero, A.** (1990) High production of polysialic acid [Neu5Ac alpha(2-8)-Neu5Ac alpha(2-9)]<sub>n</sub> by *Escherichia coli* K92 grown in a chemically defined medium. Regulation of temperature. *Biol Chem Hoppe Seyler* **371**: 1101-1106.
- González-Clemente, C., Luengo, J.M., Rodríguez-Aparicio, L.B., Reglero, A.** (1989) Regulation of colominic acid biosynthesis by temperature: role of cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase. *FEBS Lett* **250**: 429-432.
- Gotschlich, E.C., Fraser, B.A., Nishimura, O., Robbins, J.B., Liu, T.Y.** (1981) Lipid on capsular polysaccharides of gram-negative bacteria. *J Biol Chem* **256**: 8915-8921.
- Gottesman, S., Stout, V.** (1991) Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol* **5**: 1599-1606.
- Graham, L.L., Harris, R., Villiger, W., Beveridge, T.J.** (1991) Freeze-substitution of gram-negative eubacteria: general cell morphology and envelope profiles. *J Bacteriol* **173**: 1623-1633.
- Gralla, J.D.** (2005) *Escherichia coli* ribosomal RNA transcription: regulatory roles for ppGpp, NTPs, architectural proteins and a polymerase-binding protein. *Mol Microbiol* **55**: 973-977.
- Grangeasse, C., Obadia, B., Mijakovic, I., Deutscher, J., Cozzone, A.J., Doublet, P.** (2003) Autophosphorylation of the *Escherichia coli* protein kinase Wzc regulates tyrosine phosphorylation of Ugd, a UDP-glucose dehydrogenase. *J Biol Chem* **278**: 39323-39329.

- Hagiwara, D., Sugiura, M., Oshima, T., Mori, H., Aiba, H., Yamashino, T., Mizuno, T.** (2003) Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 5735-5746.
- Han, Y., Zhou, D., Pang, X., Song, Y., Zhang, L., Bao, J., Tong, Z., Wang, J., Guo, Z., Zhai, J., Du, Z., Wang, X., Zhang, X., Wang, J., Huang, P., Yang, R.** (2004) Microarray analysis of temperature-induced transcriptome of *Yersinia pestis*. *Microbiol Immunol* **48**: 791-805.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hanahan, D.** (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. En: DNA cloning. A practical approach, Vol. 1, pp. 109-135. Ed: Glover, D.M.. IRL Press, Oxford.
- Hancock, R.E.W.** (1991) Bacterial outer membranes: envolving concepts. *ASM news* **57**: 175-182.
- Hanna, A., Berg, M., Stout, V., Razatos, A.** (2003) Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4474-4481.
- Harder, W., Dijkhuizen, L.** (1983) Physiological responses to nutrient limitation. *Annu Rev Microbiol* **37**: 1-23.
- Herget, S., Toukach, P.V., Ranzinger, R., Hull, W.E., Knirel, Y.A., von der Lieth, C.W.** (2008) Statistical analysis of the Bacterial Carbohydrate Structure Data Base (BCSDB): characteristics and diversity of bacterial carbohydrates in comparison with mammalian glycans. *BMC Struct Biol* **8**: 35.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. Timmis, K.N.** (1990) Transposon vector containing non-antibiotic selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign DNA in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**: 6557-6567.
- Hobbs, M., Reeves, P.R.** (1994) The JUMPstart sequence: a 39 bp element common to several polysaccharide gene clusters. *Mol Microbiol* **12**: 855-856.
- Hoiby, N., Krogh Johansen, H., Moser, C., Song, Z., Ciofu, O., Kharazmi, A.** (2001) *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect* **3**: 23-35.

- Holmes, D.S., Quigley, M.** (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**: 193-197.
- Huang, Y.H., Ferrieres, L., Clarke, D.J.** (2006) The role of the Rcs phosphorelay in Enterobacteriaceae. *Res Microbiol* **157**: 206-212.
- ICMSF** (1981) Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológico, Vol. I. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Ishida, H., Ishida, Y., Kurosaka, Y., Otani, T., Sato, K., Kobayashi, H.** (1998) In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1641-1645.
- Itoh, Y., Wang, X., Hinnebusch, B.J., Preston, J.F. 3rd, Romeo, T.** (2005) Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J Bacteriol* **187**: 382-387.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J.** (2003) Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. Masson, S.A.
- Jann, B., Jann, K.** (1990) Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol* **150**: 19-42.
- Jann, B., Jann, K.** (1997) Capsules of *Escherichia coli*. En: *Escherichia Coli: Mechanisms of Virulence*, pp. 113-143. Ed: Sussman, M. Cambridge: Cambridge University Press.
- Jann, B., Jann, K., Schmidt, G., Orskov, I., Orskov, F.** (1970) Immunochemical studies of polysaccharide surface antigens of *Escherichia coli* 0100:K?(B):H2. *Eur J Biochem* **15**: 29-39.
- Jann, K., Jann, B.** (1992) Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. *Can J Microbiol* **38**: 705-710.
- Jude, A., Nicolle, P.** (1952) Different thermal conditions in the production of Vi antigen by various Enterobacteriaceae. *C R Hebd Seances Acad Sci* **234**: 2028-2030.
- Junkins, A.D., Doyle, M.P.** (1992) Demonstration of exopolysaccharide production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **25**: 9-17.
- Kaijser, B., Ahlstedt, S.** (1977) Protective capacity of antibodies against *Escherichia coli* and K antigens. *Infect Immun* **17**: 286-289.

- Kaijser, B., Hanson, L.A., Jodal, V., Linden-Johnson, G., Robbins, J.B.** (1977) Frequency of *Escherichia coli* K antigens in urinary tract infection in children. *Lancet* **1**: 663-666.
- Kaijser, B., Jodal, U.** (1984) *Escherichia coli* K5 antigen in relation to various infections and in healthy individuals. *J Clin Microbiol* **19**: 264-266.
- Keenleyside, W.J., Jayaratne, P., MacLachlan, P.R., Whitfield, C.** (1992) The *rcaA* gene of *Escherichia coli* O9:K30:H12 is involved in the expression of the serotype-specific group I K (capsular) antigen. *J Bacteriol* **174**: 8-16.
- Kelm, S., Schauer, R.** (1997) Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol* **175**: 137-240.
- Kim, H., Ryu, J.H., Beuchat, L.R.** (2006) Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5846-5856.
- Kim, K.J., Elliott, S.J., Di Cello, F., Stins, M.F., Kim, K.S.** (2003) The K1 capsule modulates trafficking of *E. coli*-containing vacuoles and enhances intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol* **5**: 245-252.
- King, M.R., Steenbergen, S.M., Vimr, E.R.** (2007) Going for baroque at the *Escherichia coli* K1 cell surface. *Trends Microbiol* **15**: 196-202.
- Kong, J., Lee, H., Hong, J., Kang, Y., Kim, Chang, M., Bae, S.** (1998) Utilization of a cell-bound polysaccharide produced by marine bacterium *Zooglea* sp.: New biomaterial for metal adsorption and enzyme immobilization. *J Mar Biotechnol* **6**: 99-103.
- Kumar, A.S., Mody, K., Jha, B.** (2007) Bacterial exopolysaccharides--a perception. *J Basic Microbiol* **47**: 103-117.
- Kuo, J.S., Doelling, V.W., Graveline, J.F., McCoy, D.W.** (1985) Evidence for covalent attachment of phospholipid to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Bacteriol* **163**: 769-773.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Landini, P., Zehnder, A.J.** (2002) The global regulatory *hns* gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. *J Bacteriol* **184**: 1522-1529.
- Lease, R.A., Cusick, M.E., Belfort, M.** (1998) Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12456-12461.
- Lee, S.M., Chen, J.** (2004) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in set yogurt as influenced by the production of an exopolysaccharide, colanic acid. *J Food Prot* **67**: 252-255.
- Li, H., Granat, A., Stewart, V., Gillespie, J.R.** (2008) RpoS, H-NS, and DsrA influence EHEC hemolysin operon (*ehxCABD*) transcription in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *FEMS Microbiol Lett* **285**: 257-262.
- Lifely, M.R., Lindon, J.C., Williams, J.M., Moreno, C.** (1985) Structural and conformational features of the *Escherichia coli* K92 capsular polysaccharide. *Carbohydr Res* **143**: 191-205.
- Lin, C.C., Casida, L.E.** (1984) Gelrite as a gelling agent in media for the growth of thermophilic microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **47**: 427-429.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., Laufs, R.** (1996) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* **178**: 175-183.
- Madigan, T.M., Martinko, J.M., Parker, J.** (1998) Brock Biology of Microorganisms. Pearson Prentice Hall.
- Mahan, M.J., Slauch, J.M., Mekalanos, J.J.** (1996) Environmental regulation of virulence gene expression in *Escherichia*, *Salmonella*, and *Shigella* spp. En: *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, pp. 2803-2816. Eds: Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H.E. ASM Press, Washington, DC.

- Majdalani, N., Gottesman, S.** (2005) The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol* **59**: 379-405.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.** (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Mao, Y, Doyle, M.P., Chen, J.** (2001) Insertion mutagenesis of *wca* reduces acid and heat tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **183**: 3811-3815.
- Mao, Y., Doyle, M.P., Chen J.** (2006) Role of colanic acid exopolysaccharide in the survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastrointestinal fluids. *Lett Appl Microbiol* **42**: 642-647.
- Martínez-Morales, F., Borges, A.C., Martínez, A, Shanmugam, K.T., Ingram, L.O.** (1999) Chromosomal integration of heterologous DNA in *Escherichia coli* with precise removal of markers and replicons used during construction. *J Bacteriol* **181**: 7143-7148.
- Masson, L., Holbein, B.E.** (1983) Physiology of sialic acid capsular polysaccharide synthesis in serogroup B of *N. meningitides*. *J Bacteriol* **154**: 728-736.
- Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., Flemming, H.C.** (1999) The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int J Biol Macromol* **26**: 3-16.
- McCraiken, G.H., Globe, M.P., Sarff, L.D., Mize, S.G., Schiffer, M.S., Robbins, J.B., Gotschlich, E.C., Orskov, I., Orskov, F.** (1974) Relationship between *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharides antigen and clinical outcome in neonatal meningitis. *Lancet* **2**: 246-250.
- McEldowney, S., Fletcher, M.** (1986) Variability of the Influence of Physicochemical Factors Affecting Bacterial Adhesion to Polystyrene Substrata. *Appl Environ Microbiol* **52**: 460-465.
- McGowen, M.M., Vionnet, J., Vann, W.F.** (2001) Elongation of alternating alpha 2,8/2,9 polysialic acid by the *Escherichia coli* K92 polysialyltransferase. *Glycobiology* **11**: 613-620.
- McGuire, E.J., Binkley, S.B.** (1964) The Structure and Chemistry of Colominic Acid. *Biochemistry* **3**: 247-251.

- Mejbaum, W.** (1939) Über die bestimmung kleiner pentosemengen, insbesoudere in derivaten der adenyssäure. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **258**: 117.
- Merritt, K., Gaid, A., Anderson, J.M.** (1998) Detection of bacterial adherence on biomedical polymers. *J Biomed Mater Res* **39**: 415-422.
- Mesnage, S., Tosi-Couture, E., Gounon, P., Mock, M., Fouet, A.** (1998) The capsule and S-layer: two independent and yet compatible macromolecular structures in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **180**: 52-58.
- Miller, J.H.** (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Mousslim, C., Groisman E.A.** (2003) Control of the *Salmonella* *ugd* gene by three two-component regulatory systems. *Mol Microbiol* **47**: 335-344.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**: 263-273.
- Murphy, C.L., Sambanis A.** (2001) Effect of oxygen tension and alginate encapsulation on restoration of the differentiated phenotype of passaged chondrocytes. *Tissue Eng* **7**: 791-803.
- Murphy, K.C., Campellone, K.G., Poteete, A.R.** (2000) PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene* **246**: 321-230.
- Nesper, J., Hill, C.M., Paiment, A., Harauz, G., Beis, K., Naismith, J.H., Whitfield, C.** (2003) Translocation of group 1 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* serotype K30. Structural and functional analysis of the outer membrane lipoprotein Wza. *J Biol Chem* **278**: 49763-49772.
- Nieto, J.M., Bailey, M.J., Hughes, C., Koronakis, V.** (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.
- Norrande, J., Kempe, T., Messing, J.** (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**: 101-106.



- Obadia, B., Lacour, S., Doublet, P., Baubichon-Cortay, H., Cozzone, A.J., Grangeasse, C.** (2007) Influence of tyrosine-kinase Wzc activity on colanic acid production in *Escherichia coli* K12 cells. *J Mol Biol* **367**: 42-53.
- Okutani, K.** (1992) Antiviral activities of sulfated derivatives of a fucosamine-containing polysaccharide of marine bacterial origin. *Nippon Suisan Gakk* **58**: 927-930.
- Ophir, T., Gutnick, D.L.** (1994) A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl Environ Microbiol* **60**: 740–745.
- O'Riordan, K., Lee, J.C.** (2004) *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* **17**: 218-234.
- Orskov, I., Orskov, F., Jann, B., Jann, K.** (1977) Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* **41**: 667-710.
- Ortiz, A.I., Reglero, A., Rodríguez-Aparicio, L.B., Luengo, J.M.** (1989) In vitro synthesis of colominic acid by membrane-bound sialyltransferase of *Escherichia coli* K-235. Kinetic properties of this enzyme and inhibition by CMP and other cytidine nucleotides. *Eur J Biochem* **178**: 741-749.
- Pangburn, M.K.** (2000) Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement. *Immunopharmacology* **49**: 149-157.
- Peleg, A., Shifrin, Y., Ilan, O., Nadler-Yona, C., Nov, S., Koby, S., Baruch, K., Altuvia, S., Elgrably-Weiss, M., Abe, C.M., Knutton, S., Saper, M.A., Rosenshine, I.** (2005) Identification of an *Escherichia coli* operon required for formation of the O-antigen capsule. *J Bacteriol* **187**: 5259-5266.
- Persson, K., Safholm, A.C., Andersson, R.G., Ahlner, J.** (2005) Glyceryl trinitrate-induced angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition in healthy volunteers is dependent on ACE genotype. *Can J Physiol Pharmacol* **83**: 1117-1122.
- Pfennig, P.L., Flower A.M.** (2001) BipA is required for growth of *Escherichia coli* K12 at low temperature. *Mol Genet Genomics* **266**: 313-317.
- Philippe, N., Alcaraz, J.P., Coursange, E., Geiselmann, J., Schneider, D.** (2004) Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria. *Plasmid* **51**: 246-255.

- Pradel, E., Schnaitman, C.A.** (1991) Effect of *rfaH* (*sfrB*) and temperature on expression of *rfa* genes of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **173**: 6428-6431.
- Priem, B., Gilbert, M., Wakarchuk, W.W., Heyraud, A., Samain, E.** (2002) A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria. *Glycobiology* **12**: 235-240.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T.T., Vidal, O., Lejeune, P., Dorel, C.** (2000) Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* **2**: 450-464.
- Primo, E.** (1995) Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria. Ed: Reverté S.A.
- Prosser, B.L., Taylor, D., Dix, B.A., Cleeland, R.** (1987) Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* **31**: 1502-1506.
- Raetz, C.R.H.** (1990): Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* **59**: 129-170.
- Rahn, A., Beis, K., Naismith, J.H., Whitfield, C.** (2003) A novel outer membrane protein, Wzi, is involved in surface assembly of the *Escherichia coli* K30 group 1 capsule. *J Bacteriol* **185**: 5882-5890.
- Rasmussen, T.B., Skindersoe, M.E., Bjarnsholt, T., Phipps, R.K., Christensen, K.B., Jensen, P.O., Andersen, J.B., Koch, B., Larsen, T.O., Hentzer, M., Eberl, L., Hoiby, N., Givskov, M.** (2005) Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology* **151**: 1325-1340.
- Reid, A.N., Whitfield, C.** (2005) Functional analysis of conserved gene products involved in assembly of *Escherichia coli* capsules and exopolysaccharides: evidence for molecular recognition between Wza and Wzc for colanic acid biosynthesis. *J Bacteriol* **187**: 5470-5481.
- Repoila, F., Gottesman, S.** (2001) Signal transduction cascade for regulation of RpoS: temperature regulation of DsrA. *J Bacteriol* **183**: 4012-4023.
- Reyrat, J.M., Pelicic, V., Gicquel, B., Rappuoli, R.** (1998) Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect Immun* **66**: 4011-4017.
- Rick, P.D., Hubbard, G.L., Kitaoka, M., Nagaki, H., Kinoshita, T., Dowd, S., Simplaceanu, V., Ho, C.** (1998) Characterization of the lipid-carrier involved in the

synthesis of enterobacterial common antigen (ECA) and identification of a novel phosphoglyceride in a mutant of *Salmonella typhimurium* defective in ECA synthesis. *Glycobiology* **8**: 557-567.

**Rick, P.D.** (1987) Lipopolysaccharide biosynthesis. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology, pp. 648-662. Ed: Neidhart F.C. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

**Robbins, J.B.** (1980) Future vaccine development. *Prog Clin Biol Res* **47**: 3-19.

**Robbins, J.B., McCracken, G.H. Jr., Gotschlich, E.C., Orskov, F., Orskov, I., Hanson, L.A.** (1974) *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide associated with neonatal meningitis. *N Engl J Med* **290**: 1216-1220.

**Roberts, I.S.** (1996) The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**: 285-315.

**Roberts, I.S.** (2000) Transcriptional organisation and regulation of *E. coli* group 2 capsule expression. *Adv Exp Med Biol* **485**: 95-101.

**Rodríguez-Aparicio, L.B., Ferrero, M.A., Reglero, A.** (1995) N-acetyl-D-neuraminic acid synthesis in *Escherichia coli* K1 occurs through condensation of N-acetyl-D-mannosamine and pyruvate. *Biochem J* **308**: 501-505.

**Rodríguez-Aparicio, L.B., Luengo, J.M., Ferrero, M.A., Reglero, A.** (1993) Comparative analysis of the antibodies against capsular polysaccharides of *Escherichia coli* K-92 and K-235: an immunochemical method for the identification of polysialic acids. *Int J Biochem* **25**: 427-432.

**Rodríguez-Aparicio, L.B., Luengo, J.M., González-Clemente, C., Reglero, A.** (1992) Purification and characterization of the nuclear cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase from rat liver. *J Biol Chem* **267**: 9257-9263.

**Rodríguez-Aparicio, L.B., Reglero, A., Luengo, J.M.** (1987) Uptake of N-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli* K-235. Biochemical characterization of the transport system. *Biochem J* **246**: 287-294.

**Rodríguez-Aparicio, L.B., Reglero, A., Ortiz, A.I., Luengo, J.M.** (1988a) A protein-sialyl polymer complex involved in colominic acid biosynthesis. Effect of tunicamycin. *Biochem J* **251**: 589-596.

- Rodríguez-Aparicio, L.B., Reglero, A., Ortiz, A.I., Luengo, J.M.** (1988b) Effect of physical and chemical conditions on the production of colominic acid by *E. coli* in a defined medium. *Appl Microbiol Biotechnol* **27**: 474-483.
- Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C., Gutnick, D.L.** (1979) Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl Environ Microbiol* **37**: 402-408.
- Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R., Gehring, W.J.** (1992) Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science* **256**: 673-675.
- Russo, T.A., Singh, G.** (1993) An extraintestinal, pathogenic isolate of *Escherichia coli* (O4/K54/H5) can produce a group 1 capsule which is divergently regulated from its constitutively produced group 2, K54 capsular polysaccharide. *J Bacteriol* **175**: 7617-7623.
- Rutishauser, U., Landmesser, L.** (1996) Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci* **19**: 422-427.
- Samain, E., Chazalet, V., Geremia, R.A.** (1999) Production of O-acetylated and sulfated chitooligosaccharides by recombinant *Escherichia coli* strains harboring different combinations of nod genes. *J Biotechnol* **72**: 33-47.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Sarff, L.D., McCracken, G.H., Schiffer, M.S., Glode, M.P., Robbins, J.B., Orskov, I., Orskov, F.** (1975) Epidemiology of *Escherichia coli* K1 in healthy and diseased newborns. *Lancet* **1**: 1090-1104.
- Sarvamangala, J.N., Venkatesh, A., Shivananda, P.G.** (1983) Flavobacterial meningitis in an infant. *Indian J Pediatr* **50**: 93-95.
- Sasaki, G.L., Gorin, P.A., Souza, L.M., Czelusniak, P.A., Iacomini, M.** (2005) Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. *Carbohydr Res* **340**: 731-739.
- Sato, C., Fukuoka, H., Ohta, K., Matsuda, T., Koshino, R., Kobayashi, K., Troy, F.A. 2nd, Kitajima, K.** (2000) Frequent occurrence of pre-existing alpha 2-->8-linked disialic and oligosialic acids with chain lengths up to 7 Sia residues in mammalian brain

glycoproteins. Prevalence revealed by highly sensitive chemical methods and anti-di-, oligo-, and poly-Sia antibodies specific for defined chain lengths. *J Biol Chem* **275**: 15422-15431.

**Schauer, R.** (1997) First Australasian Conference on the Chemistry and Biochemistry of Sialic Acid-recognizing Proteins, Victorian College of Pharmacy, Monash University, Melbourne, Australia, 30 September-4 October, 1996. *Glycoconj J* **14**: 543-544.

**Schmidt, M.A., Jann, K.** (1983) Structure of the 2-keto-3-deoxy-D-manno-octonic-acid-containing capsular polysaccharide (K12 antigen) of the urinary-tract-infective *Escherichia coli* O4:K12:H. *Eur J Biochem* **131**: 509-517.

**Schwarzmann S., Boring, J.R.** (1971) Antiphagocytic Effect of Slime from a Mucoïd Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **3**: 762-767.

**Silver, R.P., Prior, K., Nsahlai, C., Wright, L.F.** (2001) ABC transporters and the export of capsular polysaccharides from gram-negative bacteria. *Res Microbiol* **152**: 357-364.

**Singh, R., Paul, D., Jain, R.K.** (2006) Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol* **14**: 389-397.

**Sledjeski, D., Gottesman, S.** (1995) A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced *rcaA* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2003-2007.

**Sledjeski, D.D., Gottesman, S.** (1996) Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **178**: 1204-1206.

**Smith, A.W., Iglewski, B.H.** (1989) Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res* **17**: 10509.

**Smoot, L.M., Smoot, J.C., Graham, M.R., Somerville, G.A., Sturdevant, D.E., Migliaccio, C.A., Sylva, G.L., Musser, J.M.** (2001) Global differential gene expression in response to growth temperature alteration in group A *Streptococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10416-10421.

**Steenbergen, S.M., Vimr, E.R.** (2003) Functional relationships of the sialyltransferases involved in expression of the polysialic acid capsules of *Escherichia coli* K1 and K92 and *Neisseria meningitidis* groups B or C. *J Biol Chem* **278**: 15349-15359.

- Steenbergen, S.M., Wrona, T.J., Vimr, E.R.** (1992) Functional analysis of the sialyltransferase complexes in *Escherichia coli* K1 and K92. *J Bacteriol* **174**: 1099-1108.
- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M., Reeves, P.R.** (1996) Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J Bacteriol* **178**: 4885-4893.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W.** (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**: 187-209.
- Sung, B.H., Lee, C.H., Yu, B.J., Lee, J.H., Lee, J.Y., Kim, M.S., Blattner, F.R., Kim, S.C.** (2006) Development of a biofilm production-deficient *Escherichia coli* strain as a host for biotechnological applications. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3336-3342.
- Sutherland I.W** (1990) Biotechnology of Exopolysaccharides. En: Cambridge Studies in Biotechnology 9. Cambridge University Press. Cambridge, pp. 1-163.
- Sutherland, I.W.** (1969) The structure of colanic acid. *J Gen Microbiol* **57**: 18.
- Sutherland, I.W.** (1997) Microbial exopolysaccharides—structural subtleties and their consequence. *Pur Appl Chem* **69**: 1911-1917.
- Sutherland I.W.** (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**: 3-9.
- Svennerholm, L.** (1958) Quantitative estimation of sialic acids. *Acta Chem Scand* **12**: 547-554.
- Takeda, S., Fujisawa, Y., Matsubara, M., Aiba, H., Mizuno, T.** (2001) A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC -> YojN --> RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Mol Microbiol* **40**: 440-450.
- Torres, A.G., Kaper, J.B.** (2003) Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infect Immun* **71**: 4985-4995.
- Torres, A.G., Perna, N.T., Burland, V., Ruknudin, A., Blattner, F.R., Kaper, J.B.** (2002) Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**: 951-966.

- Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* **76**: 4350-4354.
- Trisler, P., Gottesman, S.** (1984) Lon transcriptional regulation of genes necessary for capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **160**: 184-191.
- Troy, F.A. 2nd** (1992) Polysialylation: from bacteria to brains. *Glycobiology* **2**: 5-23.
- Troy, F.A., Frerman, F.E., Heath, E.C.** (1971) The biosynthesis of capsular polysaccharide in *Aerobacter aerogenes*. *J Biol Chem* **246**: 118-133.
- Tsai, C.M., Frasch, C.E.** (1982) A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **119**: 115-119.
- Tsui, F.P., Schneerson, R., Boykins, R.A., Karpas, A.B., Egan, W.** (1981) Structural and immunological studies of the *Haemophilus influenzae* type d capsular polysaccharide. *Carbohydr Res* **97**: 293-306.
- Vanhooren, P., Vandamme, E.J.** (2000) Microbial production of clavan, an L-fucose rich exopolysaccharide. En: Food Biotechnology, pp. 109-114. Eds: Bielecki, S., Tramper, J., Polak, J. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Vanlandschoot, P., Van Houtte, F., Ulrichs, P., Tavernier, J., Leroux-Roels, G.** (2005) Immunostimulatory potential of hepatitis B nucleocapsid preparations: lipopolysaccharide contamination should not be overlooked. *J Gen Virol* **86**: 323-331.
- Vann, W.F., Soderstrom, T., Egan, W., Tsui, F.P., Schneerson, R., Orskov, I., Orskov, F.** (1983) Serological, chemical, and structural analyses of the *Escherichia coli* cross-reactive capsular polysaccharides K13, K20, and K23. *Infect Immun* **39**: 623-629.
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E.** (2009) Essentials of Glicobiology. New York: Cold Spring Harbor.
- Vengud, P.J., Otaolauruchi, S.J., Cortés-Botella, J., García-Salom, P., García-Monsalve, A.** (2000) Viscosuplementación: revisión de los diferentes hialuronatos en España. *Farm Hosp* **24**: 371-376.

- Vianney, A., Jubelin, G., Renault, S., Dorel, C., Lejeune, P., Lazzaroni, J.C.** (2005) *Escherichia coli tol* and *rca* genes participate in the complex network affecting curli synthesis. *Microbiology* **151**: 2487-2497.
- Vimr, E., Lichtensteiger, C.** (2002) To sialylate, or not to sialylate: that is the question. *Trends Microbiol* **10**: 254-257.
- Vimr, E.R.** (1992) Selective synthesis and labeling of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1 strains with mutations in *nanA* and *neuB*. *J Bacteriol* **174**: 6191-6197.
- Vimr, E.R., Kalivoda, K.A., Deszo, E.L., Steenbergen, S.M.** (2004) Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 132-153.
- Vimr, E., Steenbergen, S., Cieslewicz, M.** (1995) Biosynthesis of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1. *J Ind Microbiol* **15**: 352-360.
- Weiner, R., Langille, S., Quintero, E.** (1995) Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. *J Ind Microbiol* **15**: 339-346.
- Wells, J.** (1977) Extracellular microbial polysaccharides –a critical overview. En: ACS Symposium Series 45, pp. 229-325. Eds: Sanford, P.A., Laskin, A. American Chemical Society, Washington D.C.
- Whestphal, O., Luderitz, O., Bister, F.** (1952) Über die Extarktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z Naturforsch* **7B**: 148-155.
- White-Ziegler, C.A., Davis, T.R.** (2009) Genome-wide identification of H-NS-controlled, temperature-regulated genes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **191**: 1106-1110.
- White-Ziegler, C.A., Malhowski, A.J., Young, S.** (2007) Human body temperature (37degrees C) increases the expression of iron, carbohydrate, and amino acid utilization genes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **189**: 5429-5440.
- Whitfield, C.** (2006) Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* **75**: 39-68.
- Whitfield, C., Keenleyside, W.J.** (1995) Regulation of expression of group IA capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. *J Ind Microbiol* **15**: 361-371.



- Whitfield, C., Keenleyside, W.J., Clarke, B.R.** (1994) Structure, function and synthesis of cell surface polysaccharides in *Escherichia coli*. En: *Escherichia coli* Domestic Animals and Man, pp. 437-494. Ed: Gyles, C.L. CAB international.
- Whitfield, C., Paiment, A.** (2003) Biosynthesis and assembly of Group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. *Carbohydr Res* **338**: 2491-2502.
- Whitfield, C., Roberts, I.S.** (1999) Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **31**: 1307-1319.
- Whitfield, C., Valvano, M.A.** (1993) Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Adv Microb Physiol* **35**: 135-246.
- Whitfield, C., Vimr, E.R., Costerton, J.W., Troy, F.A.** (1984) Protein synthesis is required for in vivo activation of polysialic acid capsule synthesis in *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol* **159**: 321-328.
- Wilkinson, J.F.** (1958) The extracellular polysaccharides of bacteria. *Bacteriol Rev* **22**: 46-73.
- Wugedistch, T., Paiment, A., Hocking, J., Drummelsmith, J., Forrester, C., Whitfield, C.** (2001) Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**: 2361-2371.
- Xue, P., Corbett, D., Goldrick, M., Naylor, C., Roberts, I.S.** (2009) Regulation of expression of the region 3 promoter of the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster involves H-NS, SlyA, and a large 5' untranslated region. *J Bacteriol* **191**: 1838-1846.
- Yavuz, E., Drouillard, S., Samain, E., Roberts, I., Priem, B.** (2008) Glucuronylation in *Escherichia coli* for the bacterial synthesis of the carbohydrate moiety of nonsulfated HNK-1. *Glycobiology* **18**: 152-157.
- Ymele-Leki, P., Ross, J.M.** (2007) Erosion from *Staphylococcus aureus* biofilms grown under physiologically relevant fluid shear forces yields bacterial cells with reduced avidity to collagen. *Appl Environ Microbiol* **73**: 1834-1841.
- Yu, D., Ellis, H.M., Lee, E.C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Court, D.L.** (2000) An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5978-5983.

**Zhang, X.S., Garcia-Contreras, R., Wood, T.K.** (2008) *Escherichia coli* transcription factor YncC (McbR) regulates colanic acid and biofilm formation by repressing expression of periplasmic protein YbiM (McbA). *Isme J* **2**: 615-631.

**Zogaj, X., Nimt, M., Rohde, M., Bokranz, W., Römling, U.** (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **39**: 1452-1463.

**Zuber, C., Lackie, P.M., Catterall, W.A., Roth, J.** (1992) Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *J Biol Chem* **267**: 9965-9971.