



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Farmàcia

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

**Estudi estructural i genètic del nucli del lipopolisacàrid de  
*Serratia marcescens* N28b**

Núria Coderch Marco  
2008

# **1. INTRODUCCIÓ**



# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1 EL GÈNERE *Serratia*

### 1.1.1 CARACTERÍSTIQUES GENERALS

El gènere *Serratia*, que s'inclou actualment en la família *Enterobacteriaceae*, comprèn un grup de bacteris que estan relacionats entre sí tant a nivell genètic com fenotípic. L'espècie tipus d'aquest gènere és *Serratia marcescens*. El gènere *Serratia* està format per bacils gramnegatius de petites dimensions (de 0,5 a 0,8 µm de diàmetre i de 0,9 a 2,0 µm de llargària) i generalment mòbils per flagels perítrics. Són anaerobis facultatius, amb metabolisme respiratori i fermentador, quimioorganotròfics, oxidasa negatius i la majoria de soques d'aquest gènere presenten una forta activitat catalasa (Taylor i Achanzar, 1972).

Les espècies del gènere *Serratia* creixen bé tant en condicions aeròbiques com anaeròbiques en medis naturals tan variats com sòl, aigua, plantes i animals, en els quals poden causar-los malalties (Grimont i Grimont, 1993). També creixen bé en medis artificials i en general no requereixen factors de creixement. Poden utilitzar diversos compostos orgànics com a font de carboni i energia. Fermenten la majoria dels glúcids per la via del 2,3-butanodiol, produint acetoïna a partir del piruvat, i per tant la reacció de Voges-Proskauer dóna resultats positius, encara que hi ha algunes excepcions. Poden utilitzar el citrat i l'acetat com a única font de carboni, redueixen els nitrats a nitrits i la majoria d'espècies d'aquest gènere presenten activitat decarboxilasa per la lisina i l'ornitina. La temperatura òptima de creixement de les espècies del gènere *Serratia* se situa al voltant dels 30 °C, encara que algunes espècies poden créixer fàcilment a 5°C (*S. liquefaciens*, *S. plymuthica*, ...) i altres a 40-42°C (*S. marcescens* i algunes soques de *S. rubidaea* i *S. odorifera*). En totes les soques el creixement és inhibït a temperatures superiors a 45°C (Grimont i Grimont, 1984).

Una de les característiques més importants d'aquest gènere és la capacitat que tenen algunes soques de produir un pigment vermell, no difusible e insoluble en aigua que s'anomena prodigiosina (2-metil-3-pentil-6-metoxiprodigiosè) i que es troba unit a la membrana citoplasmàtica. La producció d'aquest pigment, que es dóna únicament en condicions d'aerobiosi i que depèn de diversos factors culturals (temps i temperatura

d'incubació, pH, presència d'ions..), confereix la característica coloració vermella d'algunes soques d'aquest gènere (Williams i Qadri, 1980), fet que ha comportat la seva associació des de l'antiguitat a fenòmens prodigiosos (Gaughran, 1969). A diferència d'altres enterobacteriàcies, les espècies del gènere *Serratia* (excepte *S. fonticola*) produeixen característics enzims extracel·lulars com exonucleases amb capacitat d'hidrolitzar l'ADN (Benedik i Strych, 1998); lipases (Akatsuka *et al.*, 1994); bacteriocines (Viejo *et al.*, 1992); quitinases (Fuchs *et al.*, 1986; Uchiyama *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2007) i vàries proteases (Braun i Schmitz, 1980; Bromke i Hammel, 1979, Matsumoto, 2004).

L'any 1823, Bizio va aïllar el microorganisme responsable de la coloració rogenca que adquiria la polenta contaminada i l'anomenà *Serratia marcescens* en honor al físic italià Serafino Serrati (Bizio, 1823). Aquest aïllament original no fou conservat i en realitat podia correspondre a qualsevol microorganisme productor de pigments vermells, inclosos alguns llevats, els quals se'ls va anomenar durant molts anys *Bacillus prodigiosus*. El nom de *Serratia* va ser definitivament acceptat gràcies als treballs de Breed i Breed (1924) i a l'adopció d'aquest nom en la primera edició del manual Bergey (1923). Al cap de poc temps es va establir la relació entre *Serratia* i els gèneres *Escherichia* i *Proteus*, i això va comportar la inclusió del gènere *Serratia* dins la família *Enterobacteriaceae* en la cinquena edició del manual Bergey (1939).

La taxonomia del gènere *Serratia* ha variat considerablement en les successives edicions del citat manual. L'aplicació de la taxonomia numèrica i l'estudi comparatiu de l'ADN de diverses soques aïllades en diferents hàbitats van comportar la inclusió de noves espècies dins el gènere *Serratia*. Actualment, es reconeixen fins a un total de 13 espècies (incloent 4 subespècies) dins el gènere de *Serratia* (veure Taula 1.1) (<http://www.bacterio.cict.fr/s/serratia.html>) (Euzéby, 1997). Cal destacar que recentment en una planta de tractament d'aigües residuals domèstiques s'ha aïllat una soca, identificada com a *Serratia marcescens*, que forma endòspores i produeix el pigment prodigiosina, fet que ha comportat la creació de la nova subespècie *S. marcescens* subsp. *sakuensis* (Ajithkumar *et al.*, 2003). Aquest fet és d'especial rellevància perquè fins el moment no s'havia observat mai la formació d'endòspores en bacteris gramnegatius.

**Taula 1.1.** Espècies i subespècies dins el gènere *Serratia*

<b>Gènere <i>Serratia</i></b>	
<i>S. entomophila</i>	<i>S. rubidaea</i> = <i>S. marinorubra</i>
<i>S. ficaria</i>	<i>S. odorifera</i>
<i>S. fonticola</i>	<i>S. plymuthica</i>
<i>S. grimesii</i>	<i>S. proteamaculans</i> ( <i>S. proteamaculans</i> subsp. <i>proteamaculans</i> )
<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. quinovorans</i> ( <i>S. proteamaculans</i> subsp. <i>quinovora</i> )
<i>S. marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	<i>S. ureilytica</i>
<i>S. marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i>	

### 1.1.2 EPIDEMIOLOGIA I PATOGÈNIA

Els bacteris del gènere *Serratia* no solen causar infeccions en individus sans, però en canvi, poden freqüentment infectar o colonitzar persones immunocompromeses i/o hospitalitzades, ja que actuen com a patògens oportunistes. *S. marcescens* és però, sens dubte, l'espècie dins del gènere de més preocupació en humans, ja que l'aïllament d'altres espècies del mateix gènere en mostres clíniques és molt poc freqüent i en cap cas s'ha pogut relacionar directament amb la patologia.

En humans, *S. marcescens* es comporta com un patògen oportunista i en les últimes tres dècades ha estat implicat en un nombre creixent d'infeccions nosocomials greus que han compromès sovint la vida del pacient hospitalitzat (Haddy *et al.*, 1996; Hezaji i Falkiner, 1997). Actualment, *S. marcescens* és responsable del 1% de totes les infeccions nosocomials, però aquest percentatge augmenta fins el 3% en el cas particular de les pneumònies. Les infeccions més comunes causades per aquest bacteri són infeccions del tracte respiratori en pacients ingressats en les unitats de cures intensives (UCI) que precisen respiració assistida; infeccions del tracte urinari en pacients tractats amb sondes urinàries (Su *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2005); infeccions de ferides quirúrgiques i l'aparició de septicèmia (Yu *et al.*, 1998; Shih *et al.*, 2005), especialment en aquells pacients que porten catèters intravenosos o com a complicacions d'infeccions locals. Poden haver-hi altres manifestacions clíniques comuns a d'altres patògens oportunistes com: osteomielitis, infeccions intraabdominals, endocarditis, meningitis (Theccanat *et al.*, 1991; Bizzarro *et al.*, 2007), conjuntivitis, keratitis...(von Graevenitz, 1980; Acar, 1986; Bollman *et al.*, 1989). En els darrers anys, *S. marcescens* s'ha convertit en una greu amenaça en les unitats de cures intensives pediàtriques, on ha causat en nens prematurs

quadres clínics de meningo-encefalitis amb un pronòstic neurològic molt greu (Assadian *et al.*, 2002; Berger *et al.*, 2002). És també interessant destacar que la majoria de les soques clíniques (a diferència de les ambientals) no presenten pigmentació (Hezaji i Falkiner, 1997; Carbonell *et al.*, 2000)

*S. marcescens* és resistent de manera natural a un ampli espectre d'antibiòtics que inclou tetraciclins,  $\beta$ -lactàmics com l'ampicil·lina, polimixines, macròlids i cefalosporines de primera i segona generació així com també a antisèptics i desinfectants. Degut a la teràpia antimicrobiana més recentment han aparegut soques resistents a aminoglicòsids (gentamicina, estreptomina...), a cefalosporines de tercera generació i fins i tot, alguna soca resistent a les quinolones (Begic i Worobec, 2007). Actualment, la teràpia d'elecció per tractar les infeccions per *Serratia* spp. inclou la combinació d'aminoglucòsids i betalactàmics antipseudomonadals, encara que aquesta s'hauria de basar en els resultats de les proves de susceptibilitat, ja que és molt comú la presència de soques multiresistents.

### **1.1.3 PROPIETATS DE *S. marcescens* QUE INFLUEIXEN EN LA PATOGENICITAT EN HUMANS**

Malgrat que *S. marcescens* representa un problema creixent per a la salut pública, tant per la seva implicació en un elevat nombre d'infeccions nosocomials com per la progressiva aparició de soques multiresistents, encara es coneixen poc els factors que contribueixen a la patogenicitat d'aquest bacteri dins l'hoste (Hezaji i Falkiner, 1997). Tot i que es poden identificar diferents factors que poden contribuir a l'augment de la virulència en determinades soques de *Serratia* spp. resta encara per establir un model general que descriu el mecanisme d'acció d'aquesta espècie com a patogen, o bé que permeti integrar l'acció dels diferents factors involucrats en la seva virulència.

A continuació es resumeixen els diferents factors de virulència que poden contribuir a la patogenicitat d'aquest bacteri en els humans.

### ▪ **Fímbríes**

Són projeccions filamentoses no flagel·lars formades per subunitats proteiques globulars (fímbrines) que es troben sobre la superfície bacteriana. Les fímbríes de *S. marcescens* juguen un paper clau en l'adhesió a les mucoses de l'hoste (Reid i Sobel, 1987), però també estimulen la producció de superòxids en els leucòcits polimorfonuclears, i per tant la fagocitosi, provocant lesions dels teixits en els òrgans infectats (Mizunoe *et al.*, 1995).

En el gènere *Serratia* s'ha observat una gran diversitat d'estructures fímbríques (Old *et al.*, 1983) a més dels característics tipus 1 i 3. La producció de fímbríes de tipus 1 s'ha relacionat amb la capacitat de *S. marcescens* d'adherir-se a les cèl·lules epitelials de la boca (Ismail i Som, 1982) o a la superfície de la bufeta de l'orina (Yamamoto *et al.*, 1985), mentre que el rol patogènic de les fímbríes tipus 3 no és encara prou conegut.

### ▪ **Producció de sideròfors i hemòfors**

Molts estudis han posat de manifest que la capacitat dels bacteris per capturar el ferro *in vivo* contribueix de forma important a la seva virulència. Com que el ferro és insoluble en condicions fisiològiques molts bacteris excreten molècules de baix pes molecular, anomenades sideròfors, que quelen els ions ferro formant complexos solubles que poden ser utilitzats pel bacteri a través de mecanismes de transport actiu. Quasi totes les soques clíniques i ambientals de *S. marcescens* produeixen potents sideròfors capaços de segrestar el ferro de quelants tan poderosos com l'àcid etilendiamino-di-O-hidroxiifenilacètic (Franczek *et al.*, 1986), essent l'enterobactina el sideròfor majoritari (Reissbrodt i Rabsch, 1988).

D'altra banda, *S. marcescens* pot utilitzar el ferro de l'hemoglobina a través de la secreció de l'hemòfor HasA. Aquest permet segrestar el grup hemo de l'hemoglobina, el qual, a través de la unió al receptor HasR, pot alliberar-se a l'interior del bacteri (Arnoux *et al.*, 1999).

### ▪ **Producció de l'hemolisina ShlA**

*S. marcescens* produeix una proteïna, l'hemolisina ShlA, que un cop activada per la proteïna ShlB té activitat hemolítica i citotòxica. Aquest efecte es produeix per la interacció específica d'aquesta proteïna amb les membranes de les cèl·lules eucariotes la



qual desencadena la formació de porus que condueixen a la lisi cel·lular (Schiebel i Braun, 1989; Hertle, 2005). L'activitat citotòxica que exerceix l'hemolisina Sh1A sobre les cèl·lules eucariotes contribueix a la patogenicitat de *S. marcescens* en els humans (Hertle *et al.*, 1999; Kurz *et al.*, 2003).

No es coneix encara si l'hemolisina Sh1A està implicada també en els processos d'adhesió o invasió de *S. marcescens* dins l'hoste, però cal pensar que la demostrada capacitat citotòxica hi podria contribuir.

#### ▪ **Resistència a l'acció bactericida del sèrum**

La resistència a l'acció bactericida del sèrum s'ha considerat com un dels principals factors relacionats amb la virulència de *S. marcescens*. Les soques d'aquesta espècie s'han classificat en tres categories atenent a la capacitat de resistència a l'acció bactericida del sèrum (Traub i Fukushima, 1979):

- *Soques sensibles*: en solucions amb el 80% de sèrum moren en pocs minuts. Representen el 6% de les soques estudiades.
- *Soques amb sensibilitat retardada al sèrum*: resisteixen medis amb un 80% de sèrum durant un cert nombre d'hores i després moren. Representen el 88% de les soques estudiades.
- *Soques resistents*: resisteixen una exposició d'una nit al sèrum. Representen el 6% de les soques estudiades.

#### ▪ **Producció de proteases**

*S. marcescens* produeix tiolproteases (Matsumoto *et al.*, 1984), metaloproteases i cisteinaproteases (Matsumoto, 2004). S'ha demostrat que aquestes proteases tenen un paper important en la patogènesi de pneumònies experimentals (Lyerly i Kreger, 1983) així com queratitis i necrosis de la còrnia (Matsumoto, 2004). Les proteases de *S. marcescens* tenen nombroses activitats biològiques tals com la degradació de constituents dels teixits, de les immunoglobulines A i G, de la fibronectina i d'altres proteïnes sèriques així com l'activació de zimògens (factor de Hagerman, precal·licreïna) a través de proteòlisi la qual cosa condueix a un augment de la permeabilitat vascular (Matsumoto, 2004).

### ▪ Lipopolisacàrid

El lipopolisacàrid (LPS) és una molècula glucolipídica formada per una part polisacàridica unida covalentment al lípid A i es troba inserida en la membrana externa dels bacteris gramnegatius. En general, en la part polisacàridica s'hi poden distingir alhora dues regions: el nucli i una regió més externa que es denomina antigen O.

El rol del lipopolisacàrid de *S. marcescens* com a factor de virulència ha estat prèviament estudiat (Traub *et al.*, 1987). Al igual que en d'altres bacteris gramnegatius, el lipopolisacàrid de *S. marcescens* contribueix en la virulència des de dos vessants diferents: d'una banda, el lípid A és el responsable de l'activitat endotòxica, per la qual s'activen els macròfags i s'indueix la resposta inflamatòria; d'altra banda, la presència de l'antigen O facilita l'adherència del bacteri a les mucoses de l'hoste i li confereix resistència enfront dels mecanismes de defensa de l'hoste (Palomar, 1994).

L'antigen O és la part del LPS més variable pel que fa a estructura i composició química, fins i tot entre soques de la mateixa espècie. Diversos estudis han mostrat que aquesta heterogènia podria ser un indicador molt fiable del potencial patògen de cada soca (Lerouge i Vanderleyden, 2002). Recentment, s'han designat nous serovars de *S. marcescens* que es basen tant en el tipus d'antigen O com en el K (antigen capsular) (Aucken *et al.*, 1998). Aquests autors, basant-se tant en dades químiques com serològiques, proposaren reduir els 29 serovars O clàssics de *S. marcescens* a 19 tipus O, cadascun dels quals representa una unitat estructural definida: O2, O4, O5, O6, O8, O10, O14, O16, O18, O19, O20, O21, O22, O23, O24, O26, O27, O28, O29; i també 14 tipus K (Aucken *et al.*, 1998). En mostres clíniques de *S. marcescens*, el serovar predominant és el O14:K14, seguit en menor grau d'altres com O27:K14, O21:K3 i O21:K14 (Aucken i Pitt, 1998). El fet que en mostres clíniques es trobi majoritàriament el serovar O14:K14, suggereix que aquest podria tenir avantatge en la colonització dels pacients hospitalitzats i per tant, podria ser que els polisacàrids O14 i K14 contribuïssin per ells mateixos a l'aparent patogenicitat d'aquests serovars (Aucken i Pitt, 1998).

Actualment es coneix que la toxicitat del LPS, atribuïda clàssicament quasi de manera exclusiva al lípid A, no depèn només de l'estructura d'aquesta molècula sinó també de la de la regió del nucli del LPS, que està unida covalentment al lípid A (Holst, 2007). És

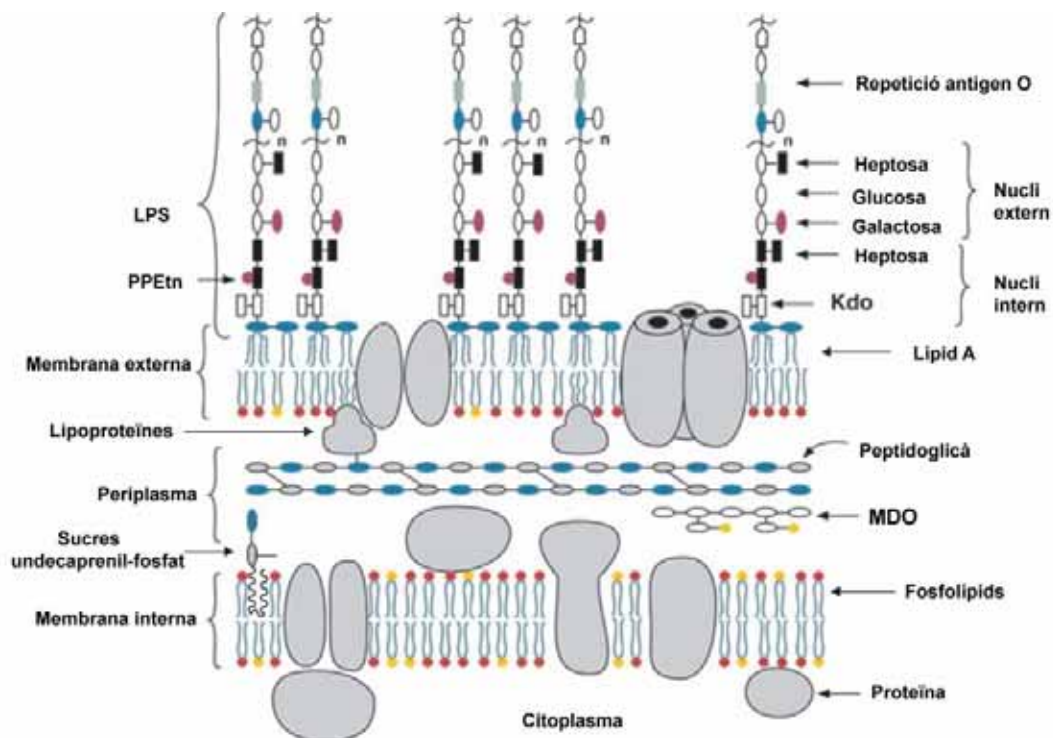
precisament objectiu d'aquesta tesi l'estudi de la regió del nucli del LPS de *S. marcescens*. L'elucidació de la seva estructura, desconeguda a l'inici d'aquest treball, permetrà conèixer la contribució d'aquesta regió en la immunogenicitat del LPS d'aquest bacteri i per tant, comprendre millor la seva acció endotòxica.

## **1.2 EL LIPOPOLISACÀRID**

### **1.2.1 IMPORTÀNCIA BIOLÒGICA**

La paret cel·lular dels bacteris gramnegatius es diferencia de la dels grampositius per la presència d'una membrana externa al peptidoglicà, que no és comparable a cap estructura dels grampositius. Aquesta membrana externa s'estructura com una bicapa extraordinàriament asimètrica respecte a l'estructura química i a les càrregues dels lípids que la componen. La capa més externa d'aquesta membrana està constituïda majoritàriament per unes macromolècules amfifíliques anomenades lipopolisacàrids (LPS), orientats de forma que el component hidrofòbic forma la capa exterior de la bicapa lipídica i queda ocult pels components polisacàridics de la molècula que es projecten cap a l'exterior (Rietschel *et al.*, 1994; Raetz, 1996; Raetz i Whitfield, 2002). Aquesta particular disposició del LPS comporta que sigui l'antigen superficial més important en els bacteris gramnegatius. D'altra banda, la capa interna de la membrana externa està formada bàsicament per una barreja de fosfolípids i proteïnes transmembrana (Nikaido, 2003). A mode d'exemple, en la Figura 1.1 s'inclou un esquema de l'organització de la membrana externa i interna en *Escherichia coli* K12.

Els lipopolisacàrids juguen un paper molt important en la formació i funció de la membrana externa i per la seva disposició, constitueixen el primer lloc d'interacció de la cèl·lula bacteriana amb els components del sistema immune de l'hoste (Holst *et al.*, 1996). Per tant, modificacions en l'estat físic o bioquímic del LPS poden influenciar el sistema de defensa del bacteri i conferir-li resistència contra l'acció bactericida del sistema complement o contra compostos antimicrobians (Brandenburg i Wiese, 2004).



**Figura 1.1.** Organització de la membrana interna i externa en *Escherichia coli* (extret de Raetz i Whitfield, 2002)

Abreviatures: PPEtN, 2-aminoetil difosfat; MDO, Oligosacàrids derivats de membrana; Kdo, Àcid 3-deoxi-D-manno-oct-2-ulosonic

D'altra banda, el LPS juga un paper rellevant en l'hoste durant les infeccions greus per bacteris gramnegatius i és el responsable de l'aparició de les diverses manifestacions tòxiques (Holst *et al.*, 1996; Branderburg i Wiese, 2004). Quan un bacteri envaeix un hoste, pot establir-se una infecció on el bacteri arriba als teixits subepitelials i al torrent sanguini. El LPS alliberat de la superfície bacteriana (per divisió cel·lular o per la mort i lisi del bacteri deguda a l'acció d'antibiòtics o del sistema complement de l'hoste), pot associar-se a determinats factors del sèrum i ser neutralitzat o bé interaccionar amb receptors de LPS que expressen les cèl·lules diana de l'hoste, donant lloc a l'activació de la resposta immune innata. En resposta al LPS, aquestes cèl·lules secreten mediadors endògens dotats de bioactivitats intrínseques, que actuen localment o viatjant per la sang o ambdues coses, i que en últim terme, potencialment poden conduir al quadre clínic de xoc sèptic (Raetz i Whitfield, 2002), el qual es caracteritza per febre, leucopènia, taquicàrdia, taquipnea, hipotensió, coagulació intravascular disseminada i el qual pot arribar a desencadenar una fallada multi-orgànica i fins i tot, la mort de l'individu (Holst *et al.*, 1996).

El principal responsable perquè es produeixin els efectes descrits és la part lipídica del LPS, que es coneix com a lípid A, i és degut al seu caràcter tòxic, que els LPS s'anomenen endotoxines (Westphal *et al.*, 1977). El lípid A lliure expressa les mateixes activitats biològiques que caracteritzen el LPS sencer, tal com la pirogenicitat i la letalitat, i és per això, que el lípid A representa el “principi endotòxic” del LPS (Zähringer *et al.*, 1994).

Paradoxalment, la pròpia molècula de LPS que pot posar en perill la salut humana, té una elevada capacitat, a petites dosis, d'induir la resistència immune de l'hoste davant d'infeccions bacterianes i virals i fins i tot enfront del càncer. Per fer ús d'aquests efectes beneficiosos, cal reduir al màxim la toxicitat del LPS mantenint les seves accions biològiques positives (Holst *et al.*, 1996).

Donat l'ampli espectre d'activitats biològiques, immunològiques i patològiques així com també per la seva complexitat estructural, el LPS ha estat una de les molècules bacterianes més ben estudiades, tant des del punt de vista de la seva estructura química com de la seva biosíntesi i organització genètica. Els primers models de LPS que es van conèixer foren els corresponents a *Escherichia coli* i *Salmonella enterica*, però en l'última dècada l'estudi d'aquesta molècula s'ha estès a un gran nombre d'espècies bacterianes. El major coneixement de tots aquests aspectes relacionats amb el LPS permetrà obrir esperances per a futures estratègies terapèutiques (veure secció 1.2.6 *El lipopolisacàrid com a diana terapèutica*).

#### **1.2.1.1 Molècules d'unió al LPS**

Entre els factors humorals que interactuen amb el LPS destaquen les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL), la proteïna sCD 14, i especialment, la proteïna d'unió al LPS (LBP o LPS *binding protein*). Les lipoproteïnes HDL actuen com proteïnes de transport del LPS en plasma cap al òrgans d'eliminació exercint una funció detoxificadora (Freudenberg *et al.*, 1980; Flegel *et al.*, 1989). La proteïna sCD14, que és la forma soluble del receptor CD14, a través de la unió directa al LPS permet activar la producció de citocines en les cèl·lules endotelials o del múscul llis que no tenen receptor CD14 (Rietschel *et al.*, 1996). Per últim, la proteïna del sèrum LBP, que es sintetitza als hepatòcits, té la capacitat d'interaccionar amb el LPS, a través del lípid A, formant

agregats i el transporta cap a diverses dianes cel·lulars, actuant com un amplificador biològic que permet a l'hoste detectar petites quantitats de LPS, activar el seu sistema de defensa i afrontar així la invasió del microorganisme (Tobias i Ulevitch, 1993).

### 1.2.1.2 Dianes cel·lulars

Les principals cèl·lules que responen a l'endotoxina són les que pertanyen al sistema immune, tals com els leucòcits polimorfonuclears (PMN), els limfòcits T i particularment, els monòcits i macròfags tissulars. A part de les cèl·lules immunocompetents, les cèl·lules epitelials i/o vasculars també hi poden interaccionar.

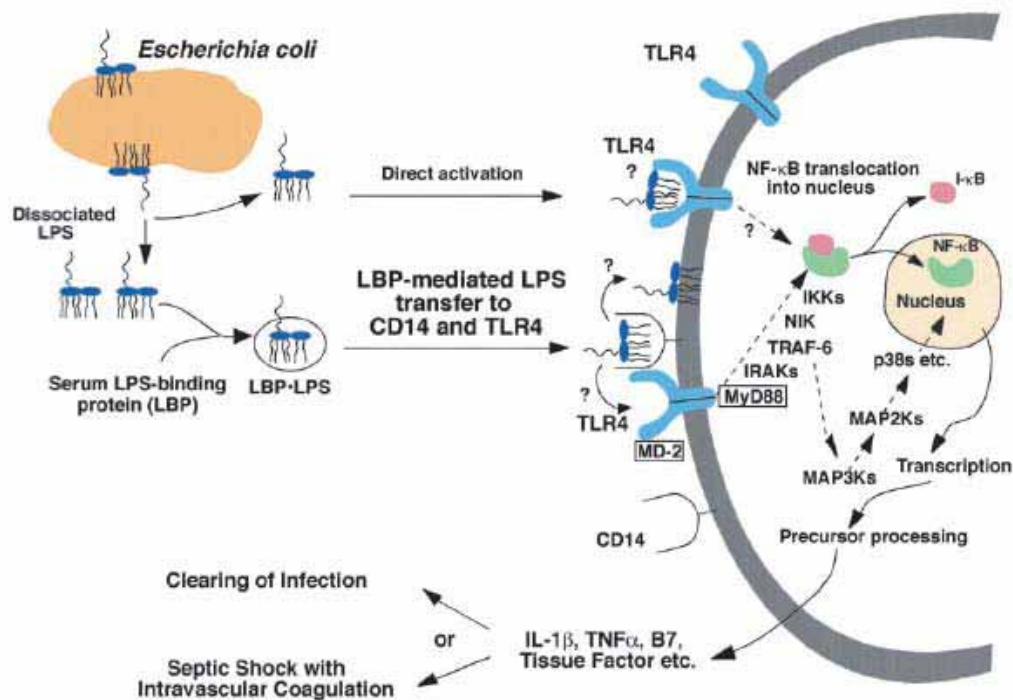
- **Leucòcits polimorfonuclears (PMN):** Representen la primera barrera inespecífica de l'hoste davant d'una infecció bacteriana gràcies a la seva capacitat fagocítica que augmenta en presència de LPS. També poden neutralitzar el LPS per l'acció d'enzims que el degraden en estructures parcials no tòxiques o bé per l'acció de la proteïna BPI (*Bactericidal/Permeability Increasing protein*) que contenen, la qual pot unir-se al LPS i així neutralitzar la seva bioactivitat (Holst *et al.*, 1996).
- **Limfòcits T:** en els humans, l'estimulació dels limfòcits T pel LPS condueix a una proliferació monòcit-dependent que resulta en la secreció de limfocines (Holst *et al.*, 1996).
- **Cèl·lules epitelials i vasculars:** Tant les cèl·lules vasculars (endotelials i del múscul lli) així com les epitelials tenen la capacitat d'activar-se davant la presència de LPS produint no tan sols mediadors com les citocines IL-1, IL-6 i IL-8 sinó també altres mediadors com prostaciclina, òxid nítric, el factor activador de plaquetes (PAF) i interferons i per tant, tenen un rol important en els processos inflamatoris en el curs del procés infecció (Rietschel *et al.*, 1996).
- **Monòcits i macròfags tissulars:** Aquestes dues poblacions, que són les dianes cel·lulars del LPS més ben estudiades, tenen la capacitat de produir una elevada varietat de mediadors bioactius, entre els quals s'inclouen la interleucina IL-1 $\beta$  i el factor de necrosi tumoral (TNF), quan són activades pel LPS (Rietschel *et al.*, 1996; Holst *et al.*, 1996). Presenten a la superfície cel·lular una glicoproteïna de membrana CD14 que els permet reconèixer el LPS.

Les cèl·lules que intervenen en la resposta immune innata han desenvolupat mecanismes que els hi permeten reconèixer molècules d'origen microbià i eliminar-les del lloc de la infecció. A més, contínuament monitoritzen el cos per tal de detectar la presència de LPS i d'altres productes microbians, que es coneixen com a patrons moleculars associats a patògens (PAMP) (Müller-Loennies *et al.*, 2007).

En els últims anys, s'ha descobert una família de receptors, anomenats TLRs (de l'anglès, *Toll-like receptors*) que juguen un paper molt important en la resposta primària del sistema d'immunitat innata davant de patògens invasors i que es troben en els macròfags i en les cèl·lules endotelials (Aderem i Ulevitch, 2000; Underhill i Ozinsky, 2002). Actualment, se sap que com a mínim hi ha 10 receptors TLRs en humans, dels quals el TLR4 està implicat en la detecció del LPS (Mitchell *et al.*, 2007). Apart però del sistema d'immunitat innata, davant una infecció també s'activa la resposta immune adaptativa.

D'acord amb el coneixement actual, l'activació del sistema immunitari es produeix quan el LPS és transportat a través de les LBPs fins a la superfície del macròfag. Allí pot interaccionar amb la molècula CD14 (soluble o unida al receptor) i unir-se al receptor TLR4 provocant la seva activació (Ulevitch i Tobias, 1999), el qual conjuntament amb la proteïna soluble accessòria MD2, desencadena una cascada de senyalitzacions que finalment condueix a l'activació del factor de transcripció NF- $\kappa$ B i a la biosíntesi de diversos mediadors de la inflamació com el TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), la IL1- $\beta$  i les diferents molècules requerides per a la resposta adaptativa (Raetz i Whitfield, 2002). En Figura 1.2 es mostra un esquema dels efectes biològics que es desencadenen com a conseqüència de la interacció del LPS amb un macròfag.

Tota aquesta sèrie d'esdeveniments provocats pel LPS són beneficiosos ja que poden conduir a l'eliminació del bacteri en el lloc de la infecció. No obstant, quan es produeix una sobreproducció d'aquests mediadors com en el cas d'infeccions severes, els diversos mediadors poden actuar sinèrgica o antagònicament donant lloc a un xoc sèptic que potencialment pot desencadenar la mort de l'individu.



**Figura 1.2.** Efectes biològics de la interacció del LPS amb un macròfag (extret de Raetz i Whitfield, 2002)

Abreviatures: LBP, proteïna d'unió al lipopolisacàrid; TLR, Toll-like receptor; IL, interleucina; TNF, factor de necrosi tumoral

## 1.2.2 CARACTERÍSTIQUES GENERALS DEL LPS

### 1.2.2.1 Característiques estructurals

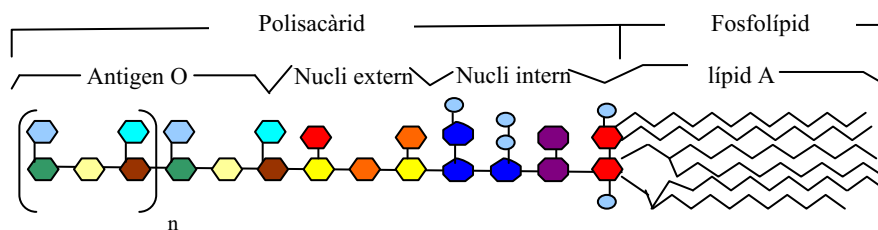
Els lipopolisacàrids poden classificar-se en dos grups depenent de la mida de la porció polisacàridica: les formes llises o LPS-S (de l'anglès *smooth*) o les formes rugoses o LPS-R (de l'anglès *rough*). Ambdós tipus de LPS consisteixen en una part lipídica (apolar) anomenada **lípid A**, altament conservada en els bacteris gramnegatius i que permet l'ancoratge del LPS a la membrana externa, unida covalentment a una part sacarídica, que conté fins a 15 sucres, que s'anomena **nucli** (Holst 1999, 2002 i 2007).

En els LPS-S, la regió del nucli està substituïda per un polisacàrid, que en la majoria de casos correspon al **polisacàrid O específic** o **cadena lateral O** (també anomenat **antigen O**, per les seves propietats immunogèniques) (Raetz i Whitfield, 2002), però que en alguns casos pot correspondre a l'antigen comú enterobacterià (ECA) (Kuhn *et al.*, 1988) a un polisacàrid capsular (Whitfield, 2006). La **cadena lateral O** o **antigen O** correspon a un polisacàrid serospecífic format, en la majoria de casos, per la repetició



d'una subunitat bàsica, que varia en funció de cada espècie i entre diferents serovars. Aquesta subunitat pot estar constituïda per un monosacàrid o diferents monosacàrids, constituint homopolímers o heteropolímers i pot formar subunitats lineals o ramificades. A més, poden haver-hi diverses modificacions no estequiomètriques (O-acetilació, glicosilació,...) dins d'una mateixa subunitat de repetició que contribueixen a incrementar notablement la variabilitat d'aquestes estructures. Aquesta heterogènia es fa palesa no tan sols en la composició de les subunitats que constitueixen l'antigen O, sinó també en el número de repeticions que hi ha en cada molècula de LPS i es manifesta per un patró característic "d'escala" quan s'observa el LPS per electroforesi en gels de poliacrilamida i dodecil sulfat (SDS-PAGE) (veure secció 1.2.5. *L'antigen O*).

D'altra banda, en aquests bacteris que presenten un LPS-S, l'oligosacàrid del nucli sol estar dividit en dues regions: el nucli intern (pròxim al lípid A) i el nucli extern, que serveix de punt d'ancoratge per al polisacàrid O específic o antigen O (Raetz i Whitfield, 2002). En la Figura 1.3 s'esquematitza l'estructura general d'un LPS complet (LPS-S) que presenta les tres regions: antigen O, nucli (extern i intern) i lípid A. Aquestes tres regions del LPS es diferencien tant per la seva composició, estructura química i grau de conservació estructural, com per les seves activitats biològiques i la seva biosíntesi i genètica (Mamat *et al.*, 1999).



**Figura 1.3.** Representació esquemàtica del LPS de *Salmonella enterica* com exemple de LPS-S (forma llisa o S)

Els bacteris que expressen el polisacàrid O específic (antigen O) presenten una morfologia colonial llisa quan creixen en plaques de medi sòlid i per això se'ls anomena formes llises. En contraposició, els bacteris que produeixen molècules de LPS que no tenen el polisacàrid O específic s'anomenen formes rugoses o LPS-R i presenten una morfologia colonial amb marges rugosos. Ambdós tipus de LPS (LPS-S i LPS-R) estan presents en soques salvatges de bacteris gramnegatius; per exemple, *Escherichia coli*,

*Klebsiella pneumoniae* o *Vibrio cholerae* presenten LPS-S mentre que espècies patògenes per als humans com *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae* i *Chlamydia* spp. presenten un LPS-R (Holst, 2007). D'altra banda, existeixen bacteris que presenten mutacions en la biosíntesi del LPS (mutants R) que produeixen uns LPSs amb cadenes oligosacàridiques molt curtes i que són incapaçs de produir o d'unir l'antigen O. L'anàlisi químic d'alguns d'aquests mutants de *Salmonella* va permetre la diferenciació de diferents quimiotips R, que es varen poden distingir serològicament, i que van des del quimiotip Ra (que correspon a l'estructura més completa) fins al Re, que correspon a l'estructura de nucli més petita, la qual presenta únicament un disacàrid de 3-deoxi-D-manno-oct-2-ulosonic (Kdo) unit per enllaç ( $\alpha 2 \rightarrow 4$ ) (Müller-Loennies *et al.*, 2007).

D'altra banda, molts d'aquests patògens de les mucoses com *Neisseria* spp. o *Haemophilus influenzae* que estan mancats de l'antigen O típic, produeixen, en canvi, lipooligosacàrids (LOSs). Aquests estan formats per un nucli intern a partir del qual s'estenen una o més cadenes mono- o oligosacàridiques que determinen la seva especificitat serològica (Raetz i Whitfield, 2002).

Els LPSs són molècules amb una elevada complexitat estructural. Degut a la seva importància microbiològica, immunològica i mèdica, ja que són importants factors de virulència en espècies patògenes, han atret en els darrers anys l'interès de la comunitat científica, que ha fet veritables esforços per elucidar les estructures químiques, funcions i rutes biosintètiques dels LPSs d'un gran nombre d'espècies bacterianes. Aquests estudis han posat de manifest l'enorme variabilitat existent entre les estructures químiques dels diferents LPSs sintetitzats pels bacteris, fet que evidencia la pressió evolutiva a la que han estat sotmeses aquestes molècules que han hagut d'adaptar-se per tal de poder permetre el creixement bacterià en diferents medis. Així, les molècules de LPS poden variar en el grau d'acilació, fosforilació, glicosilació i altres modificacions estructurals menys habituals. Per tal d'adaptar-se a les condicions canviants del medi, els bacteris han desenvolupat la capacitat de detectar canvis ambientals com el pH, la concentració de sals i la temperatura a través de sistemes de regulació de dos components com el PhoP/PhoQ i el PmrA/PmrB, que també estan implicats en les modificacions estructurals dels LPSs (Müller-Loennies *et al.*, 2007).

Dins d'una mateixa molècula de LPS, la variabilitat estructural disminueix gradualment des de l'antigen O, que està exposat a la superfície bacteriana, passant pel nucli, fins a la part més interna i conservada del LPS, on hi ha el lípid A, el qual està cobert per tota una estructura polisacàridica i ancorat en la membrana externa (Rietschel *et al.*, 1996). La raó d'aquesta gradació en la variabilitat estructural pot ser deguda a la pressió evolutiva exercida per les cèl·lules fagocítiques i pels anticossos contra els bacteris gramnegatius (Nikaido, 1970). Per tant, és lògic pensar que els bacteris han intentat evadir aquesta pressió modificant les estructures més superficials, com l'antigen O i en un menor grau, el nucli extern (Rietschel *et al.*, 1996). Per això aquestes parts més externes del LPS són les que tenen major variabilitat.

Per últim, cal destacar que, malgrat hi hagi un principi estructural comú, tots els bacteris, fins i tot els que pertanyen a la mateixa soca, produeixen una varietat de molècules de LPS que poden tenir potencialment accions biològiques diferents. Això comporta que en molts casos sigui necessari la identificació de compostos molt minoritaris en una preparació de LPS, per la qual cosa es fa necessari obtenir preparacions d'elevada puresa. Tot i els avenços tecnològics, l'anàlisi químic del LPS és molt complexa degut a la seva naturalesa amfifílica, a l'elevada heterogeneïtat de les preparacions de LPS com a conseqüència de modificacions no estequiomètriques i a la labilitat química d'alguns dels seus substituents (Müller-Loennies *et al.*, 2007). Els diferents procediments que s'han utilitzat en aquest treball per a l'anàlisi químic i estructural del LPS estan explicats a la secció 3. *Materials i Mètodes*.

#### **1.2.2.2 Característiques generals de la biosíntesi del LPS**

La biosíntesi del LPS té lloc per dues rutes diferents que convergeixen: d'una banda, la formació del lípid A i el nucli; d'altra banda, la síntesi de l'antigen O. Un cop sintetitzats independentment, les dues parts es lliguen per completar la molècula del LPS (Yethon i Whitfield, 2001). Aquest procés biosintètic implica un seguit de passos individuals que cal coordinar: la síntesi en el citoplasma de diversos precursors activats; la formació d'unitats sacarídiques bàsiques; la polimerització de les unitats de repetició i la formació de cadascun del dominis que componen el LPS; la translocació a través de la membrana citoplasmàtica; el transport i la integració en la membrana externa de les

molècules sintetitzades; i per últim, l'existència d'un sistema complex de regulació de la biosíntesi del LPS que coordini tots els passos individuals i el conjunt del sistema.

La major part del que es coneix de la biosíntesi del LPS, així com també de la seva estructura i funció, prové del descobriment de mutants defectius R (*rough*) en *Salmonella enterica* que presentaven mutacions en determinats passos de la biosíntesi del seu LPS (Yethon i Whitfield, 2001). Els primers anàlisis genètics d'aquests mutants *rough* van situar les mutacions en dos loci diferents anomenats *rfa* i *rfb*. El primer d'ells contenia els gens responsables de la biosíntesi del nucli del LPS, mentre que en el segon s'hi agrupaven els gens implicats en la biosíntesi de l'antigen O. El 1996, Reeves i col·laboradors (Reeves *et al.*, 1996) van proposar un nou sistema de nomenclatura per tal d'acomodar-se al creixent nombre de gens caracteritzats, segons el qual, els gens implicats en la biosíntesi del nucli del LPS es designen *wa\*\**, mentre que els que codifiquen per la biosíntesi de l'antigen O s'anomenen *wb\*\** (on els asteriscs representen lletres variables). Aquest sistema de nomenclatura s'ha utilitzat en el present treball.

Actualment, les rutes biosintètiques millor conegudes són les de *Escherichia coli* i *Salmonella* (Heinrichs *et al.*, 1998; Kaniuk *et al.*, 2002; Whitfield *et al.*, 2003). No obstant, en els darrers anys, s'han fet notables avenços en el coneixement dels mecanismes de biosíntesi de les diferents regions del LPS en un nombre important de bacteris gramnegatius com *Klebsiella pneumoniae* (Regué *et al.*, 2001) i *Yersinia* spp. (Skurnik i Bengoechea, 2003). Precisament, els estudis en d'altres bacteris han permès conèixer que la disposició típica dels gens implicats en la biosíntesi del nucli i de l'antigen O en les agrupacions gèniques *waa* i *wbb* no és present a tots els bacteris gramnegatius (Raetz i Whitfield, 2002), com per exemple passa a *Bordetella*, a on els gens implicats en la biosíntesi del nucli i de l'antigen O estan disposats en la mateixa agrupació gènica (Allen i Maskell, 1996).

Cal també destacar que l'elevada heterogeneïtat estructural que presenta el LPS com a conseqüència de la pressió evolutiva promoguda per l'adaptació a les condicions canviants del medi està directament lligada a l'existència d'un ampli polimorfisme dels gens que codifiquen per la seva biosíntesi (Schnaitman i Klena, 1993). No obstant, poden distingir-se uns principis comuns en la ruta de biosíntesi del LPS.

Per últim, cal tenir en compte que el coneixement de la biosíntesi del LPS i dels enzims implicats en ella és important per tal d'obrir noves vies terapèutiques (veure secció 1.2.6 *El lipopolisacàrid com a diana terapèutica*).

### 1.2.3 EL LÍPID A

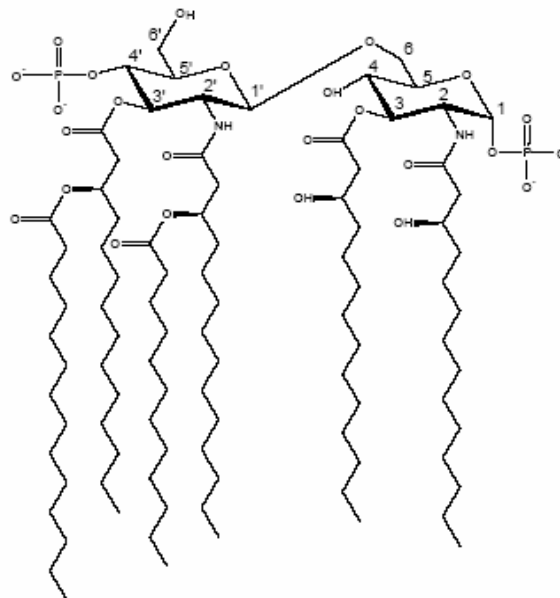
#### 1.2.3.1 Estructura i activitat

El lípid A és el responsable de les propietats endotòxiques del LPS i per això també rep el nom d'endotoxina (Galanos *et al.*, 1985). El lípid A és la part més interna del LPS i gràcies a la seva naturalesa hidrofòbica és el punt d'ancoratge del LPS a la membrana externa (Zähringer *et al.*, 1999). En una cèl·lula de *Escherichia coli* existeixen aproximadament de l'ordre de  $10^6$  molècules de lípid A i  $10^7$  de glicerofosfolípids (Galloway i Raetz, 1990).

En els últims anys s'han determinat les estructures químiques del lípid A d'un nombre molt important de bacteris les quals han estat revisades recentment per Zähringer *et al.*, 1999. Tots aquests estudis estructurals permeten afirmar que el lípid A és l'element més conservat del LPS, tot i que en diferents bacteris poden existir variacions a l'estructura estàndard del lípid A, tal i com es descriu més endavant en aquesta secció. Aquest elevat grau de conservació del lípid A reflexa el paper tan important que juga aquesta molècula en el manteniment de la integritat de la membrana externa, ja que participa en l'encaix de la membrana externa i a més interacciona de forma molt específica amb algunes de les proteïnes presents (Vaara, 1996; de Cock *et al.*, 1999). Per això la seva presència és indispensable en la majoria de bacteris gramnegatius (Galloway i Raetz, 1990). L'estructura mínima requerida per al creixement de *E. coli* i d'altres bacteris gramnegatius correspon al quimiotip de LPS conegut com Re que consisteix en un lípid A glicosilat amb 2 residus d'àcid 3-deoxi-D-manno-octulosonic (Kdo) (Raetz, 1990). No obstant, és interessant destacar que al contrari de la majoria de gramnegatius, *Neisseria meningitidis* no requereix lípid A per al seu creixement, tot i que aquest es veu molt alentit en la seva absència. Així, existeixen mutants viables d'aquest bacteri que malgrat no tenir lípid A tenen una membrana externa amb totes les seves proteïnes integrals. No obstant, per la viabilitat d'aquests bacteris és imprescindible la presència del polisacàrid capsular. Això fa

pensar que en aquests casos el polisacàrid capsular podria reemplaçar el lípid A (van der Ley i Steeghs, 2003).

La primera estructura química del lípid A que es va elucidar fou la de *Salmonella enterica* i *E. coli* (veure Figura 1.4), que és alhora compartida per bona part dels bacteris gramnegatius. En aquests bacteris l'estructura química bàsica del lípid A consisteix en un disacàrid de dos residus de glucosamina units per enllaç  $\beta(1' \rightarrow 6)$ , fosforilat en les posicions 1 i 4' i acilats en les posicions 2,2' (N-) i 3,3' (O-) amb *R*-3-hidroxiiristat. A més, en *E. coli* i *S. enterica*, els grups hidroxils de les cadenes acil unides a la posició 2' i 3' del disacàrid del lípid A estan esterificades amb laurat (C12) i miristat (C14), respectivament, donant lloc a una molècula asimètrica (Raetz, 1996; Zähringer *et al.*, 1999). A la posició 6', la molècula de lípid A està glicosilada amb dos residus de Kdo (Holst, 2002). La molècula aïllada de lípid A no existeix a la natura (excepte un mutant de *E. coli* K12 que sintetitza un lípid A sense cap molècula de Kdo) però pot alliberar-se de la regió del nucli del LPS sencer per hidròlisi suau ja que l'enllaç ketosídic entre el primer residu de Kdo i el lípid A és més làbil que d'altres enllaços glicosídics.



**Figura 1.4.** Estructura química del principal lípid A de *E. coli* i *S. enterica* (Raetz, 1990)

Tot i que l'estructura del lípid A està força conservada entre diferents bacteris, pot veure's modificada com a resposta a estímuls del medi. Al mateix temps, aquestes modificacions provocaran canvis a la superfície externa del bacteri. En general, aquestes modificacions de

l'estructura bàsica del lípid A inclouen canvis en el patró d'acilació, l'eliminació o la decoració dels grups fosfats del lípid A, la presència de residus de galacturònic i modificacions subtils en el disacàrid de glucosamina (Raetz i Whitfield, 2002).

Moltes d'aquestes modificacions estructurals del lípid A són degudes a diferències en el patró d'acilació. En *E. coli* s'ha observat que a la temperatura de creixement de 12°C (no a 30°C) el lípid A incorpora palmitoleat (C16:1) enlloc de laurat. Aquest canvi sembla que pugui ajudar al bacteri a mantenir la fluïdesa òptima de la seva membrana externa a baixes temperatures (Carty *et al.*, 1999). D'altra banda, el lípid A de molts bacteris patògens com *Salmonella typhimurium* o *Pseudomonas aeruginosa* pot ser modificat posteriorment per l'addició d'un grup palmitoil (C16) generant un lípid A heptaacilat (Trent, 2004). En concret, en el cas de *S. typhimurium* aquesta modificació estructural està controlada per un sistema de regulació de dos components PhoP/ PhoQ el qual detecta canvis i s'activa quan el  $Mg^{+2}$  és limitant (Guo *et al.*, 1997). És important destacar que es creu que aquestes condicions simulen el medi que hi ha dins els teixits de l'hoste i els fagolisosomes, indicant així que aquestes modificacions al lípid A poden tenir lloc en moments claus del procés infecciós (Yethon i Whitfield, 2001). Altres modificacions que poden ocórrer en el patró d'acilació és l'eliminació del grup R-3-hidroximiristat de la posició 3 del lípid A com succeeix a *S. typhimurium* o bé la substitució de la cadena acil secundària amb 2-hidroximiristat enlloc de miristat (Trent, 2004).

Igual que amb el patró d'acilació, els grups fosfats en posició 1 i 4' també poden ser modificats i/o eliminats. Així, alguns bacteris gramnegatius com *S. typhimurium*, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae* poden modificar els grups fosfats del lípid A amb diversos grups com fosfoetanolamina (pEtN) o 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa (Trent, 2004). Aquestes modificacions, al emascarar el grup fosfat, redueixen la càrrega negativa del lípid A i com a resultat, disminueixen les interaccions electrostàtiques entre la membrana externa i els antibiòtics catiónics com la polimixina. Aquest fet podria explicar perquè els bacteris que tenen el lípid A amb aquestes modificacions són resistents a la polimixina. Per tant, els enzims responsables d'aquestes modificacions sobre l'estructura "estàndard" del lípid A poden representar noves oportunitats per al disseny de noves estratègies terapèutiques (Yethon i Whitfield, 2001) (veure secció 1.2.6 *El lipopolisacàrid com a diana terapèutica*).

El lípid A d'un cert nombre de bacteris gramnegatius com *Helicobacter pylori*, *Bacteroides fragilis*, *Francisella tularensis* i *Rhizobium leguminosarum* té reduïda la seva càrrega total negativa per l'absència d'un o ambdós grups fosfats. En alguns d'aquests bacteris s'ha identificat la presència d'alguna fosfatasa addicional que seria responsable d'aquesta modificació estructural. L'eliminació dels grups fosfats del lípid A per fosfatases podria ser molt important pels bacteris patògens durant el procés infecció ja que d'una banda reduiria les propietats endotòxiques del lípid A i d'altra banda disminuiria la seva afinitat pels pèptids antimicrobians (Trent, 2004).

Altres modificacions del lípid A poden afectar al disacàrid de glucosamina. Per exemple, en *Rhizobium etli*, una de les glucosamines és reemplaçada per 2-amino-2-deoxi-gluconat que en la posició 4' està substituït per un residu d'àcid galacturònic (GalA) enlloc del fosfat (Que-Gewirth *et al.*, 2003).

En resum, la capacitat que tenen alguns bacteris, particularment els patògens, de poder realitzar modificacions estructurals al seu lípid A en resposta a estímuls del medi posa de relleu la importància de l'estructura del lípid A en el procés infecció i representa un dels mecanismes moleculars que utilitzen els bacteris per a remodelar les superfícies microbianes amb l'objectiu d'evadir la resposta immune de l'hoste (Trent, 2004). D'altra banda, el lípid A és el responsable d'una varietat d'efectes biològics que es produeixen en els mamífers durant el procés infecció per bacteris gramnegatius i per això rep també el nom d'endotoxina. Es coneix que petites modificacions en l'estructura del lípid A poden convertir-lo d'un mediador actiu del procés inflamatori a un potent antagonista (Yethon i Whitfield, 2001). Per tant, esbrinar aquelles característiques estructurals del lípid A que són particularment responsables de desencadenar una resposta immune és interessant per a poder dissenyar nous fàrmacs que bloquegin l'activitat endotòxica o desenvolupar vacunes (veure secció 1.2.6 *El lipopolisacàrid com a diana terapèutica*). Actualment, s'estableixen algunes regles generals que permeten relacionar l'estructura del lípid A amb la seva activitat biològica. Per exemple, es coneix que el trencament de l'enllaç del fosfat en posició 1 del lípid A provoca una reducció en la producció de citocines d'un ordre de magnitud (Gustmann *et al.*, 2007). D'altra banda, els grups aciloxiacils són molt importants per a l'activitat endotòxica. De fet, el lípid A hexaacilat d'*E. coli* mostra la màxima activitat endotòxica *in vitro* (Rietschel *et al.*, 1994; Holst *et al.*, 1996). En general, la pèrdua d'una



cadena acil com la cadena acil secundària de la posició 3' pot conduir a una reducció de l'activitat endotòxica de més de tres ordres de magnitud mentre que l'eliminació de les dues cadenes acil secundàries (tetracil lípid A, compost 406) comporta una pèrdua total d'activitat com endotoxina però en canvi, fa que es converteixi en un antagonista molt potent d'una endotoxina activa. Els resultats dels estudis biofísics més recents han suggerit que aquests canvis estructurals en el lípid A poden provocar canvis en les estructures agregades, és a dir, en la forma molecular i la conformació intramolecular del lípid A, que tenen un gran impacte en la seva activitat biològica (Gustmann *et al.*, 2007).

### 1.2.3.2 Biosíntesi del lípid A

L'enzimologia i la genètica molecular de la biosíntesi del lípid A ha estat resolta en bona part gràcies al treball iniciat per Raetz i col·laboradors, utilitzant *Escherichia coli* com organisme representatiu (Raetz, 1990, 1996). Recentment, s'han publicat diferents revisions sobre la biosíntesi del lípid A (Raetz i Whitfield, 2002; Trent, 2004). La ruta biosintètica del lípid A millor caracteritzada és la de *E. coli* i està altament conservada en la resta de bacteris gramnegatius. Hi intervenen nou enzims que treballen seqüencialment i que estan generalment localitzats en el citoplasma o en la part interna de la membrana citoplasmàtica (Raetz i Whitfield, 2002; Trent, 2004). L'estudi de la biosíntesi del lípid A té interès terapèutic ja que, si es té en compte que el lípid A és indispensable per a la viabilitat dels bacteris gramnegatius, el desenvolupament d'inhibidors de qualsevol dels enzims que intervenen en la seva síntesi hauria de ser bactericida per a la majoria de bacteris gramnegatius (veure secció 1.2.6 *El lipopolisacàrid com a diana terapèutica*).

Molts dels precursors biosintètics del lípid A com la UDP-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) i el R-3-hidroxiiristoïl intervenen també en les rutes biosintètiques d'altres importants compostos bacterians com són la síntesi del peptidoglicà (Morrison i Ryan, 1992), de l'antigen comú de les enterobactèries (ECA) (Meier-Dieter *et al.*, 1992) i dels antigens O *rfe* dependents (Stevenson *et al.*, 1994) en el cas de la UDP-GlcNAc, o bé en la síntesi dels fosfolípids de membrana en el cas del R-3-hidroxiiristoïl (Raetz, 1996).

La formació de la UDP-GlcNAc està catalitzada per un enzim bifuncional, codificat pel gen *glmU*, que en un primer pas, catalitza l'acetilació de la glucosamina-1-fosfat a

acetilglucosamina-1-fosfat, la qual en un segon pas és convertida a UDP-GlcNAc (Mengin-Lecreulx i van Heijenoort, 1994).

A continuació, es resumeixen els passos de la ruta biosintètica del lípid A en *E. coli*, que està altament conservada fins i tot entre bacteris que podrien estar genèticament molt allunyats. A la Figura 1.5 s'inclou un esquema del procés biosintètic.

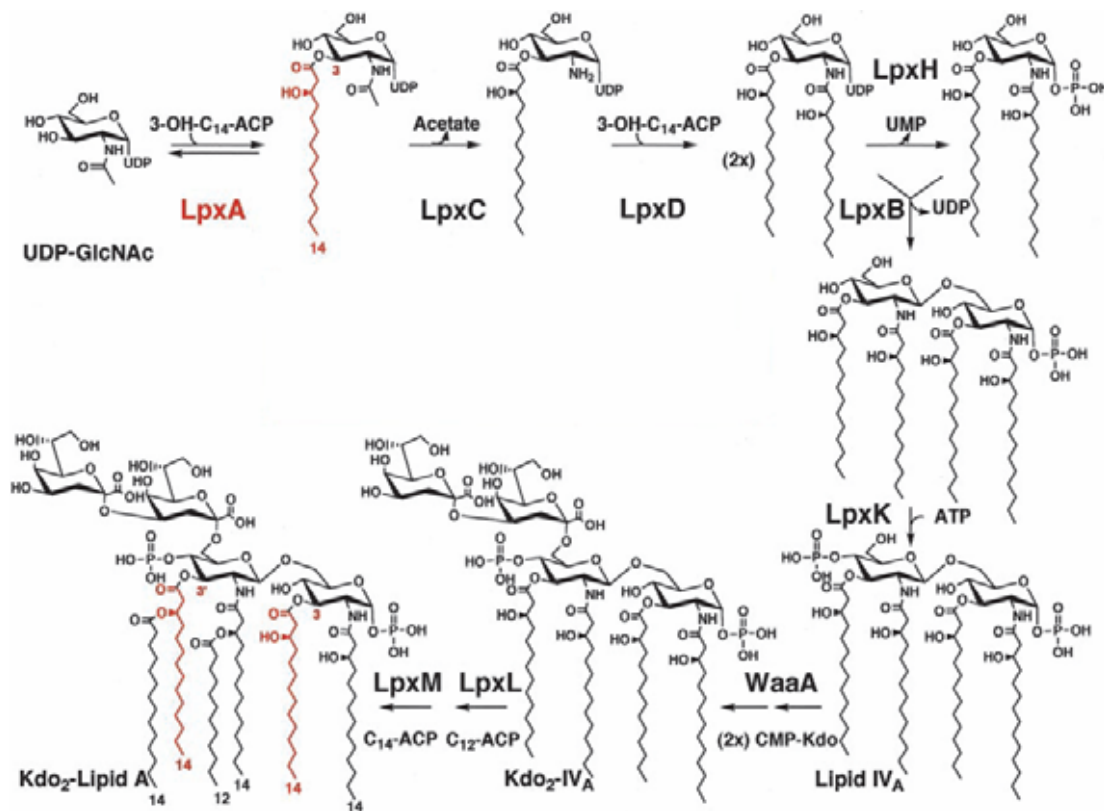
- **(Pas 1) Acilació en posició 3 de la UDP-GlcNAc:** És la reacció inicial en la síntesi del lípid A i està catalitzada per una aciltransferasa citoplasmàtica, anomenada LpxA, que en *E. coli* catalitza la unió de l'àcid R-3-hidroximirístic al grup 3-OH de la UDP-GlcNAc (Anderson i Raetz, 1987). En *E. coli* aquest enzim és altament selectiu per l'àcid R-3-hidroximirístic i usa únicament la proteïna transportadora de grup acil (ACP) com a substrat donador. No obstant, aquesta especificitat és variable entre diferents bacteris i contribueix a la diversitat estructural del lípid A (Trent, 2004).
- **(Pas 2) Deacetilació de la UDP-GlcNAc-3-Acil:** Aquesta reacció, catalitzada per la deacetilasa LpxC, és la primera reacció irreversible en la biosíntesi del lípid A i suposa l'eliminació del grup acetil en posició 2 de la UDP-GlcNAc-3-Acil donant lloc al producte UDP-GlcN-3-Acil (Young *et al.*, 1995). Aquest zinc- metaloenzim és el producte del gen *lpxC*, que està altament conservat en diversos bacteris gramnegatius i alhora no presenta homologia amb desacetilases o amidases dels mamífers. Per aquesta raó, LpxC és una diana terapèutica excel·lent per dissenyar nous antibiòtics específics contra bacteris gramnegatius (Onishi *et al.*, 1996; Jackman *et al.*, 2000) (veure secció 1.2.6 *El lipopolisacàrid com a diana terapèutica*).
- **(Pas 3) Acilació en posició 2:** aquesta reacció catalitzada per l'aciltransferasa específica LpxD consisteix en la transferència d'un segon grup R-3-hidroximiristoïl des de la proteïna ACP fins a la posició 2 de la molècula de UDP-GlcN-3-Acil generant el compost UDP-2,3-diacil-GlcN. La proteïna LpxD té elevada similitud amb la proteïna LpxA i està codificada pel gen *lpxD*, que forma part del mateix operó complex que *lpxA* i *lpxB* (Trent, 2004).
- **(Pas 4) Formació del lípid X:** La pirofosfatasa altament selectiva LpxH, codificada pel gen *lpxH*, trenca l'enllaç pirofosfat de l'intermedi UDP-2,3-diacil-GlcN

generant UMP i el compost 2,3-diacil-GlcN-1-fosfat, anomenat també lípid X (Babinski *et al.*, 2002).

- **(Pas 5) Formació del disacàrid amb enllaç  $\beta(1' \rightarrow 6)$ :** Aquesta reacció catalitzada per la disacàrid sintasa o LpxB consisteix en la condensació d'una molècula de lípid X, que actua com acceptor, amb una molècula de UDP-2,3-diacil-GlcN per a generar el compost di-(2,3-diacil-GlcN)-1-P a través de la formació del característic enllaç  $\beta(1' \rightarrow 6)$ . L'enzim LpxB està codificat pel gen *lpxB*, el qual en *E. coli* i en d'altres bacteris es transcriu conjuntament amb el gen *lpxA* (Crowell *et al.*, 1987). Fins a la formació del disacàrid que serveix d'esquelet pel lípid A, tots els enzims que participen a la biosíntesi del lípid A estan ubicats al citoplasma (Trent, 2004).
- **(Pas 6) Formació del lípid IV<sub>A</sub>:** Una quinasa específica (LpxK) codificada pel gen *lpxK* (Garrett *et al.*, 1997) catalitza la fosforilació ATP dependent de la posició 4' del disacàrid formant el lípid IV<sub>A</sub>. Aquest és el primer intermediari d'aquesta ruta biosintètica que posseeix certa activitat biològica com endotoxina (Raetz *et al.*, 1985), actuant com un antagonista d'endotoxina en cèl·lules humanes o com agonista en cèl·lules murines (Raetz i Whitfield, 2002).
- **(Pas 7) Transferència de residus de Kdo al lípid IV<sub>A</sub>:** En *E. coli* el següent pas consisteix en la transferència d'un residu de Kdo a la posició 6' del lípid IV<sub>A</sub>. La reacció està catalitzada per l'enzim WaaA (Clementz i Raetz, 1991) que utilitza com a substrat donador CMP-Kdo (Raetz i Whitfield, 2002; Trent, 2004). En *E. coli* aquest enzim WaaA és una glicosiltransferasa bifuncional que catalitza l'enllaç de dos residus de Kdo a través de diferents enllaços glicosídics: el primer Kdo s'uneix a la glucosamina (GlcN) del lípid IV<sub>A</sub> per enllaç  $\alpha(2 \rightarrow 6')$  mentre que el segon Kdo s'uneix al primer Kdo per enllaç  $\alpha(2 \rightarrow 4)$ . Es coneix que l'enzim WaaA és monofuncional en *Haemophilus influenzae* (White *et al.*, 1997) i trifuncional en *Chlamydia trachomatis* (Belunis *et al.*, 1992).
- **(Pas 8 i 9) Acilació final:** En *E. coli*, la biosíntesi del lípid A es completa amb l'addició de dos cadenes acil, una lauroil (C12) i l'altre miristoil (C14) a les posicions 2' i 3' de la glucosamina més distal del compost Kdo<sub>2</sub>-lípid IV<sub>A</sub>, generant estructures de tipus aciloxiacil. Aquestes dues reaccions estan catalitzades per les aciltransferases LpxL (anteriorment HtrB) i LpxM (anteriorment MsbB), respectivament. En el cas de *E. coli* aquestes aciltransferases finals requereixen la

presència del disacàrid de Kdo i l'addició del residu lauroil al Kdo<sub>2</sub>-lípid IV<sub>A</sub> precedeix necessàriament a la incorporació del residu miristoil. No obstant, aquesta seqüència no és requerida a d'altres bacteris gramnegatius com *Pseudomonas aeruginosa* o *Neisseria meningitidis* (Trent, 2004). Les aciltransferases LpxL i LpxM, codificades pels gens *lpxL* i *lpxM*, no tenen homologia amb les LpxA o LpxD malgrat utilitzar com a donadors grups acil units a ACP.

Amb posterioritat als passos finals d'acilació del lípid A, l'oligosacàrid del nucli s'uneix al residu de Kdo i el LPS és transportat a la seva ubicació final (veure secció 1.2.4.2. *Biosíntesi de la regió del nucli*).



**Figura 1.5.** Biosíntesi del lípid A en *E. coli* (extret de Raetz i Whitfield, 2002)

Com s'ha vist a l'anterior secció 1.2.3.1 *Estructura i activitat*, el lípid A, malgrat tenir una estructura bastant conservada, pot patir diverses modificacions estructurals en resposta a diferents estímuls ambientals. Això implica que a part dels nou enzims claus per la biosíntesi del lípid A – Kdo, en els bacteris existeixen enzims addicionals que són els responsables d'aquestes modificacions estructurals posteriors. La distribució d'aquests enzims entre diferents bacteris no és homogènia i es troben ubicats en l'espai

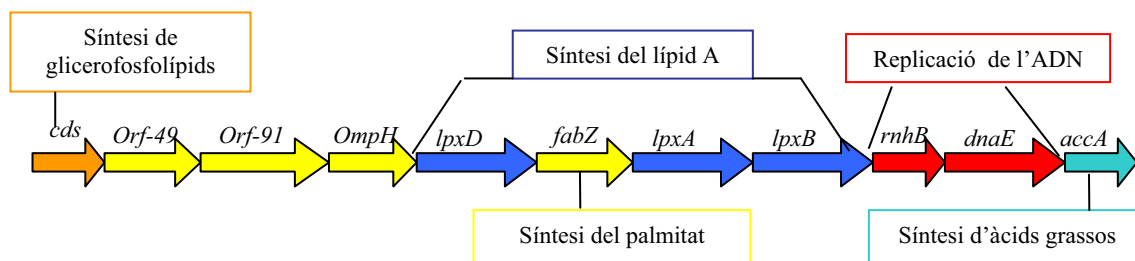
periplàsmic o a la membrana externa, possiblement per no interrompre la ruta biosintètica conservada (Trent, 2004). Així, a mode d'exemple, *E. coli* conté una aciltransferasa addicional (LpxP) que insereix un palmitoleat enlloc del laurat quan creix en condicions de 12°C (Carty *et al.*, 1999); alguns bacteris patògens insereixen un palmitat addicional al lípid A gràcies a l'acció de la serinhidrolasa PagP (Trent, 2004); en *S. typhimurium* la lipasa PagL elimina el R-3-hidroximiristat de la posició 3 del lípid A (Trent *et al.*, 2001) mentre que d'altres bacteris tenen enzims latents capaços de modificar els fosfats del lípid A amb 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) i/o fosfoetanolamina sota l'activació de diferents sistemes de regulació de la transcripció (Trent, 2004). Molts d'aquests enzims que intervenen en modificacions estructurals, estan regulats per sistemes de regulació de dos components com el PhoP/ PhoQ (Guo *et al.*, 1997) i el PmrA/PmrB que s'activen sota l'acció de diferents estímuls del medi com la baixa concentració del  $Mg^{+2}$  extern o baix pH (Soncini i Grossman, 1996).

### 1.2.3.3 Organització genètica

A partir de la comparació del nombre cada cop més important de genomes de bacteris gramnegatius que es coneixen en l'actualitat es dedueix que gairebé en tots els casos, els enzims que participen en la biosíntesi del lípid A estan codificats per gens d'una sola còpia (Raetz i Whitfield, 2002). De tots aquests gens implicats en la biosíntesi del lípid A, el *lpxA* i el *lpxC* són els que estan més conservats (Raetz i Whitfield, 2002) i és per això que en els últims anys s'han dissenyat inhibidors de l'enzim codificat pel gen *lpxC* com a potencial eina terapèutica (Raetz i Whitfield, 2002) (veure secció 1.2.6 *El lipopolisacàrid com a diana terapèutica*). En canvi, hi ha altres gens com el *lpxH* que només hi és present en un 70% dels genomes, suggerint que hi ha d'haver isoenzims addicionals del LpxH que puguin catalitzar la formació del lípid X (Raetz i Whitfield, 2002) mentre que en alguns pocs genomes no es localitzen els gens *lpxL* ni *lpxM*. D'altra banda, els enzims que catalitzen les modificacions regulades o especials del lípid A tenen molta més variabilitat i la seva distribució no és tan ubiqua (Raetz i Whitfield, 2002).

La localització i l'organització dels gens implicats en la biosíntesi del lípid A és força complexa. Mentre que en la majoria de bacteris gramnegatius pràcticament tots els gens relacionats amb la biosíntesi del nucli del LPS o del antígen O estan organitzats en

agrupacions gèniques (*waa* i *wbb* respectivament), els gens implicats en la biosíntesi del lípid A es troben dispersos al llarg del genoma bacterià (Schnaitman i Klena, 1993). Aquesta distribució és probablement deguda a la complexa interrelació amb d'altres rutes biosintètiques de macromolècules amb les quals el lípid A comparteix intermediaris. No obstant, tres dels gens implicats en la biosíntesi del lípid A, el *lpxA*, *lpxB* i *lpxD* (veure secció 1.2.3.2 Biosíntesi del lípid A) es troben agrupats en un mateix operó complex que rep el nom d'Operó de Síntesi Macromolecular (OSM II) (veure Figura 1.6). Aquest està format per 11 gens, entre els quals n'hi ha que codifiquen per enzims relacionats amb la replicació de l'ADN o amb la biosíntesi de glicerofosfolípids (Schnaitman i Klena, 1993).



**Figura 1.6.** Esquema de l'operó OSM II en *E. coli* K12  
Els colors indiquen les diferents rutes en les quals participen els gens marcats

La resta de gens involucrats en la biosíntesi del lípid A es localitzen en diferents regions del cromosoma. Així, per exemple, en *E. coli* K12 el gen *lpxC*, que codifica per la deacetilasa es troba en l'extrem 3' d'una gran agrupació de gens relacionats amb la divisió cel·lular (*ftsQ,A,Z*) i amb la secreció de proteïnes (*secA*) (Schnaitman i Klena, 1993). D'altra banda, el gen *lpxK* que codifica per la quinasa que permet la formació del lípid IV<sub>A</sub> està localitzat en un operó junt amb el gen *msbA*, que està involucrat en les etapes inicials de l'exportació de lípid A i fosfolípids (Garret *et al.*, 1997). El gen *lpxH* està cap a l'extrem 5' del gen *ppiB* (peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa) en un operó que conté aquests dos gens (Babinski *et al.*, 2002). Finalment, el gen *waaA* que codifica per la glicosiltransferasa responsable de transferència de residus de Kdo al lípid IV<sub>A</sub> i està àmpliament conservat entre els diferents enterobacteris està ubicat en la agrupació gènica *waa* que conté els gens implicats en la biosíntesi del nucli del LPS.

En la Taula 1.2 es mostra un resum dels gens implicats en la biosíntesi del lípid A, la funció del producte gènic i la seva localització en el cromosoma bacterià de *E. coli*.

**Taula 1.2.** Gens implicats en la biosíntesi del lípid A

Gen	Funció del producte gènic	Localització
<i>lpxA</i>	UDP-GcNAc 3-O-aciltransferasa	OSM II
<i>lpxC</i>	UDP-3-O-acil-GlcNAc deacetilasa	Fora de OSM II
<i>lpxD</i>	UDP-3-O-acil-GlcN 3-O-aciltransferasa	OSM II
<i>lpxH</i>	UDP-2,3-diacil- GlcN pirofosfatasa	Fora de OSM II
<i>lpxB</i>	Lípid A sintasa	OSM II
<i>lpxK</i>	Lípid A 4' quinasa	Fora de OSM II
<i>waaA</i>	Kdo transferasa	Agrupació <i>waa</i>
<i>lpxL</i>	Lauroil transferasa	Fora de OSM II
<i>lpxM</i>	Miristoil transferasa	Fora de OSM II

## 1.2.4 EL NUCLI DEL LIPOPOLISACÀRID

### 1.2.4.1 Estructura i funció

El nucli del LPS és un oligosacàrid heteropolimèric sense unitats de repetició que està unit covalentment al lípid A per la posició 6' del disacàrid de glucosamina, de manera que constitueix el nexe d'unió entre el lípid A i el polisacàrid O. En els bacteris que produeixen un LPS de tipus S, l'oligosacàrid del nucli es pot dividir en dues regions: el nucli intern, pròxim al lípid A, i el nucli extern, que sol ser el lloc d'unió de l'antigen O. Alguns bacteris patògens que envaeixen les mucoses com *Neisseria*, *Haemophilus* i *Campilobacter*, no tenen polisacàrid O i, en el seu lloc, produeixen una molècula que s'anomena lipooligosacàrid (LOS) que conté un nucli intern a partir del qual s'estenen una o més ramificacions oligosacàridiques, que equivaldrien al nucli extern i que determinarien l'especificitat serològica (Raetz i Whitfield, 2002).

Fins fa poc es prenia com a dogma que l'existència d'una mínima estructura de nucli del LPS era imprescindible per la supervivència bacteriana. De fet, des de fa temps s'ha cregut que la mínima estructura necessària per al creixement de *E. coli* consistia en dos residus de Kdo units al lípid A (Raetz, 1990) encara que de tots els bacteris, la mínima estructura viable consistia en un lípid A substituït per un residu de Kdo fosforilat que corresponia al LPS d'un mutant de *Haemophilus influenzae* (Helander *et al.*, 1988). Recentment, però, s'ha identificat un mutant viable de *E. coli* K12 que sintetitza únicament lípid IV<sub>A</sub>, que correspon a un precursor del lípid A sense cap molècula de Kdo (Meredith *et al.*, 2006). Malgrat això, el principi comunament acceptat segons el qual lípid A i nucli representen l'element estructural comú a tots els lipopolisacàrids segueix essent vàlid per a la resta de bacteris (Holst, 2007).

La majoria de les propietats biològiques del LPS s'han associat tradicionalment a la seva part lipídica; de fet, el lípid A representa el principi endotòxic del LPS (veure secció 1.2.3 *El lípid A*). No obstant, el nucli juga un paper molt important en la modulació de la bioactivitat del lípid A, augmentant la seva activitat (Lüderitz *et al.*, 1989). Això es posa de manifest en el fet que un LPS-Re constituït per un lípid A amb dos residus de Kdo indueix unes activitats biològiques molt més potents que un lípid A aïllat o sintètic i a més, la conformació de com a mínim una part del lípid A està modificada pels Kdo o les seves càrregues. D'altra banda, s'ha observat que la presència d'un residu de Kdo amb càrrega unit al lípid A és indispensable per a la inducció de la secreció d'interleucina -1 per part dels monòcits humans mentre que una molècula aïllada de lípid A no presenta aquesta activitat (Caroff i Karibian, 2003).

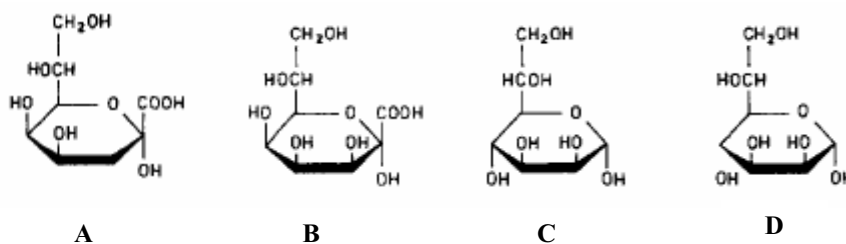
El nucli també és important per a altres activitats biològiques. Alguns estudis han relacionat la presència d'aquesta molècula amb l'adhesió d'alguns bacteris a les cèl·lules de l'hoste (Jacques, 1996). A més, el nucli intern té certes propietats antigèniques ja que conté l'epítoc comú pels anticossos i factors del sèrum i això pot tenir interessants aplicacions terapèutiques (Brade *et al.*, 1987; Rozalski *et al.*, 1989; Müller-Loennies *et al.*, 2003). En canvi, se sap que el nucli extern actua com a receptor de bacteriòfags, determina les especificitats del nucli i està implicat en la unió del LPS als limfòcits (Jirillo *et al.*, 1990). Tot i això, el nucli del LPS no sol considerar-se un factor de virulència en si mateix però, d'una manera indirecta, contribueix en la virulència. Així, el nucli és important perquè serveix de punt d'ancoratge per a l'antigen O, que és un factor de virulència en molts bacteris i juntament amb el lípid A juga un paper fonamental en el manteniment de l'estabilitat i la funció de la membrana externa.

Per tant, tenint en compte la influència de la regió del nucli en el LPS com a factor de virulència i a més considerant que la pròpia molècula té propietats immunogèniques, els anàlisis estructurals d'aquesta regió i la identificació de la seva funció són molt importants per a comprendre millor l'acció dels lipopolisacàrids. Per això, en els últims anys, s'han fet considerables esforços per elucidar l'estructura d'aquesta regió del LPS en un ampli ventall d'espècies bacterianes. Fruit d'aquests estudis, a dia d'avui es coneix un nombre considerable d'estructures de nucli de bacteris molt diversos, que han estat revisades per diferents autors (Holst, 1999, 2002, 2007; Raetz i Whitfield, 2002).



### 1.2.4.1.1 El nucli intern

La comparació de totes les estructures conegudes fins el moment, ens mostra una considerable variació estructural en aquesta regió, però en tot cas, inferior a la que presenten els antígens O. L'únic element estructural comú que està present en tots els nuclis és el residu d'àcid 3-deoxi-D-*manno*-oct-2-ulopiranosònic (Kdo), que uneix la regió del nucli al lípid A. No obstant, la majoria de nuclis, fins i tot de famílies taxonòmicament allunyades, presenten a més residus de L-*glicero*-D-*manno*-heptopiranososa (L,D-Hep) i l'oligosacàrid L- $\alpha$ -D-Hep-(1 $\rightarrow$ 3)-L- $\alpha$ -D-Hep-(1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -Kdo (Holst, 2002), constituint l'estructura comuna del nucli intern del LPS. Aquests residus solen anomenar-se HepII, HepI i KdoI, respectivament, i formen part del que es coneix com a nucli intern del LPS. L'estructura química d'aquests dos sucres es mostra en la Figura 1.7, A i C.



**Figura 1.7.** Estructura química dels monosacàrids característics del nucli del LPS

(A) àcid 3-deoxi-D-*manno*-oct-2-ulopiranosònic (Kdo); (B) àcid D-*glicero*-D-*talo*-oct-2-ulònic (Ko); (C) L-*glicero*-D-*manno*-heptopiranososa (L,D-Hep); (D) D-*glicero*-D-*manno*-heptopiranososa (D,D-Hep)

Dins d'un mateix gènere o família, l'estructura del nucli intern tendeix a estar força ben conservada. Així, la majoria d'enterobacteris presenten un oligosacàrid comú: L- $\alpha$ -D-HepIII-(1 $\rightarrow$ 7)-L- $\alpha$ -D-HepII-(1 $\rightarrow$ 3)-L- $\alpha$ -D-HepI-(1 $\rightarrow$ 5)-[ $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -KdoI (Holst, 2007), mentre que d'altres famílies o gèneres bacterians tenen altres estructures parcials compartides per tots els seus membres. Les variacions estructurals en aquesta regió ocorren per la presència en aquestes estructures bàsiques de diferents substitucions, sovint no-estequiòmriques, que poden consistir en l'addició de diferents sucres (glucosa, galactosa, glucosamina, N-acetilglucosamina, àcids urònics,...) habitualment com a  $\alpha$ -D-piranoses però en alguns casos poden trobar-se com a  $\beta$ -D-piranoses. No obstant, un dels trets més característics d'aquesta regió és la presència de substitucions, sovint no-estequiòmriques, amb diversos grups fosforilats (fosfats, pirofosfats, fosforiletanolamina, fosforilcolina), que en el cas de la soca *Pseudomonas*

*aeruginosa* PAC605 s'han arribat a detectar fins a 14 grups fosfats (Holst, 1999). En alguns casos hi ha substituents poc usuals, com la presència d'un residu carbamoil en la posició O7 de l'HepII a *P. aeruginosa* (Holst, 1999) o la presència d'un residu de manosa en posició O8 del KdoII a *Legionella pneumophila* (Moll *et al.*, 1997). La relativa diversitat d'aquestes modificacions contribueix a crear certa heterogeneïtat entre les molècules de LPS extretes d'un mateix cultiu bacterià, de manera que en molts casos tan sols es coneix l'estructura més predominant i es desconeix l'extensió de les fosforilacions i substitucions no-estequiomètriques (Raetz i Whitfield, 2002).

A més de la presència de L,D-Hep, en la regió del nucli d'alguns bacteris com *Klebsiella pneumoniae* O1, *Proteus mirabilis* o *Yersinia enterocolitica* entre d'altres, s'hi poden també trobar residus de D-glicero-D-manno-heptopiranososa (D,D-Hep) (Holst, 1999). La D,D-Hep (per estructura química, veure Figura 1.7, D) constitueix un precursor biosintètic de la L,D-Hep (Ding *et al.*, 1994). No obstant, hi ha alguns LPSs que només contenen D,D-Hep i d'altres fins i tot, no presenten cap heptosa (Holst, 2002). Aquest és el cas d'alguns bacteris patògens com *Chlamydia trachomatis*, en el qual el nucli del LPS està constituït únicament per un trisacàrid de Kdo (Rund *et al.*, 1999); o *Acinetobacter* spp., on almenys en una de les seves espècies és característica la presència de l'àcid 3-deoxi-D-lixo-hept-2-ulósaric (Dha) en el nucli del LPS (Vinogradov *et al.*, 1997); o *Moraxella* spp., on el nucli del LPS està constituït per un oligosacàrid ramificat format per residus de glucosa, galactosa i N-acetilglucosamina enllaçats a un residu de Kdo (Holst, 1999). Un altre nucli del LPS que no conté heptosa és el de *Legionella pneumophila* i el d'alguns simbionts de plantes com els bacteris dels gèneres *Bradyrhizobium* i *Rhizobium*, on en el cas particular de *R. etli* és interessant destacar la presència d'un residu de Kdo a l'extrem no-reductor del nucli (Caroff i Karibian, 2003).

Pel que fa a l'altre sucre característic de la regió del nucli, el Kdo, el més habitual és la presència de dos residus de Kdo units per enllaç  $\alpha(2\rightarrow4)$ , formant el disacàrid [ $\alpha$ -Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -Kdo (Kdo II i Kdo I, respectivament) a través del qual es produeix la unió de la regió del nucli amb la del lípid A. Tot i així, poden existir altres variants, de manera que en alguns bacteris, com *C. trachomatis*, hi ha un tercer residu de Kdo que s'uneix al Kdo II per enllaç  $\alpha(2\rightarrow8)$  (Rund *et al.*, 1999) i fins i tot, en el cas d'algunes soques de *Acinetobacter* hi poden haver fins a quatre residus de Kdo (Vinogradov *et al.*, 1998). En

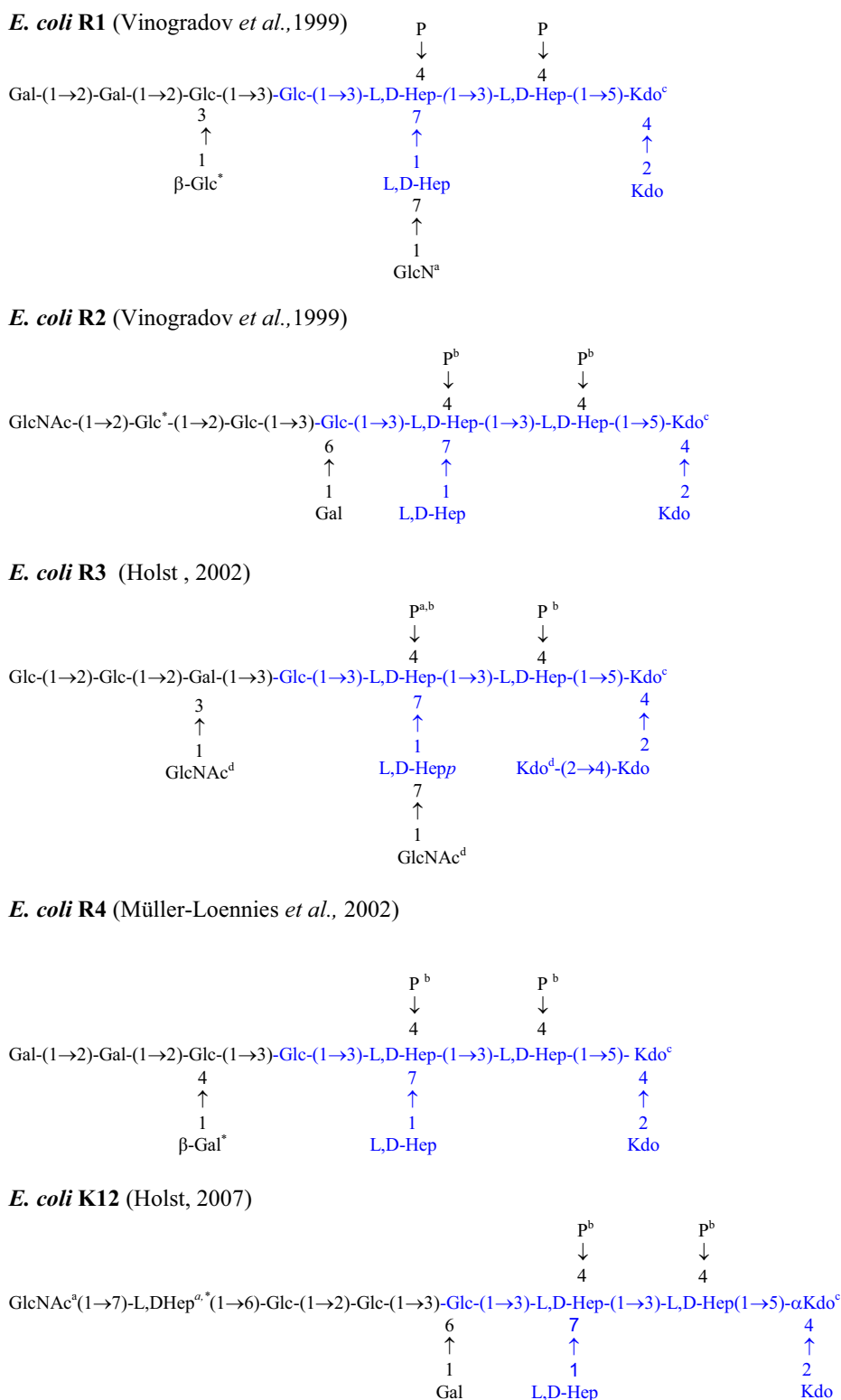
canvi, en altres casos, com per exemple a *Bordetella pertussis*, hi ha un sol residu de Kdo en el nucli (Carof *et al.*, 2000). A més, un dels residus de Kdo pot tenir unit residus sacarídics o fosfoetanol com en el cas de *E. coli* o *Salmonella enterica* (Holst, 1999) o un residu fosfat com passa a *Vibrio cholerae* O1 (Vinogradov *et al.*, 1995). D'altra banda, el Kdo I, en el cas de dues soques de *Acinetobacter*, o el KdoII, en el cas de *Burkholderia cepacia*, pot estar reemplaçat per un altre sucre, d'estereoquímica similar, que és l'àcid D-glicero-D-talo-oct-2-ulosònic (Ko) (veure Figura 1.7, B) (Holst, 1999, 2002). La biosíntesi del Ko i la regulació de l'intercanvi entre Kdo i Ko encara no s'han pogut elucidar (Holst, 2007).

Com ja s'ha dit anteriorment, la regió del nucli intern de la molècula del LPS, tot i presentar diferències estructurals, és en general un regió força conservada, on existeixen trets estructurals comuns fins i tot entre bacteris llunyanament relacionats, la qual cosa reflexa la importància d'aquesta regió en el manteniment de la integritat de la membrana externa (Heinrichs *et al.*, 1998). La presència de residus de Kdo, que tenen un grup carboxil que aporta càrregues negatives constants en aquesta regió del LPS, té un important paper fisiològic ja que permet concentrar cations divalents com el  $\text{Ca}^{2+}$  i el  $\text{Mg}^{2+}$  al voltant de la superfície cel·lular, a través dels quals poden establir-se enllaços entre molècules de LPS adjacents, permetent així el manteniment estructural i funcionalitat de la membrana externa, i per tant, garantint la supervivència del bacteri (Rietschel *et al.*, 1994). A part del Kdo, les heptoses de la regió del nucli també són molt importants per al manteniment de l'estructura interna de la membrana externa ja que sovint estan modificades amb grups fosforilats (units a l'HepI i Hep II en *E. coli* i *Salmonella*), que gràcies a les càrregues negatives que aporten faciliten les unions entre molècules de LPS adjacents a través de la interacció amb cations divalents o poliamines. A més, gràcies a aquestes unions més fortes també s'evita la penetració de compostos hidrofòbics a través de la membrana externa (Nikaido i Vaara, 1985). Tanmateix, la falta d'aquests grups fosfats o l'absència de la regió de les heptoses del nucli intern en *E. coli* i *Salmonella* dona lloc a importants canvis en l'estructura i composició de la membrana externa que condueixen a la seva inestabilitat i que es tradueixen en una hipersensibilitat del bacteri als colorants i antibiòtics hidrofòbics, als antibiòtics catiónics (com la polimixina), als detergents, a l'alliberació d'enzims periplàsmics al medi, etc. Aquest fenotip pleiotròpic és el que es coneix com fenotip *deep rough* (Schnaitman i Klena, 1993). En canvi, en alguns bacteris, com *Pseudomonas*

*aeruginosa*, l'absència d'heptoses o grups fosforilats en la regió del nucli impedeix totalment la seva viabilitat (Walsh *et al.*, 2000). D'altra banda, hi ha bacteris, com *K. pneumoniae*, que no tenen grups fosforilats a la regió del nucli però, en el seu lloc, presenten residus d'àcid galacturònic que també aporten càrregues negatives. Recentment, s'ha comprovat que l'absència de residus d'àcid galacturònic a *K. pneumoniae* comporta també l'aparició d'un fenotip *deep rough*, que es manifesta per característiques similars a les del fenotip *deep rough* de *E. coli* i *Salmonella*. Aquest descobriment posa de manifest que les càrregues negatives aportades pels grups carboxils de l'àcid galacturònic a *K. pneumoniae* juguen un paper equivalent als que tenen els grups fosfats del nucli en el manteniment de la membrana externa de *E. coli* i *Salmonella* (Firdich *et al.*, 2005).

#### 1.2.4.1.2 El nucli extern

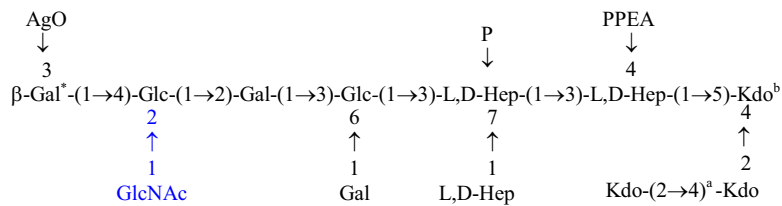
El nucli extern és una regió on predominen les hexoses (majoritàriament glucosa (Glc), galactosa (Gal) i *N*-acetilglucosamina (GlcNAc). Presenta un grau més alt de diversitat estructural que el nucli intern, com és d'esperar d'una regió que està exposada a una major pressió selectiva per part de la resposta immune de l'hoste, dels bacteriòfags i del medi ambient que l'envolta. Tot i així, dins d'una mateixa espècie i fins i tot podríem dir que dins d'un mateix gènere, la variació estructural és limitada en comparació amb l'hipervariabilitat que pot presentar l'antigen O, la qual cosa ha obert les portes a la possibilitat de poder utilitzar el nucli del LPS per crear noves vacunes (Stanislavsky i Lam, 1997) (veure secció 1.2.6 *El lipopolisacàrid com a diana terapèutica*). Per exemple, en el cas de *Salmonella enterica*, tan sols s'han identificat dos tipus de nucli de LPS diferents que es distingeixen únicament per la substitució d'una *N*-acetilglucosamina terminal, que està present en *S. enterica* sv. Typhimurium (Jansson *et al.*, 1981), per una glucosa, present a *S. enterica* sv. Arizonae IIIA (Oltshoorn *et al.*, 1998). En canvi, en *E. coli* es distingeixen fins a cinc tipus de nuclis diferents (R1, R2, R3, R4 i K12) que difereixen principalment en el nucli extern però també en algunes substitucions no estequiomètriques del nucli intern (Heinrichs *et al.*, 1998). A mode d'exemple, en la Figura 1.9 i Figura 1.8 es mostren les estructures conegudes del nucli del LPS de *E. coli* i *S. enterica*, respectivament.



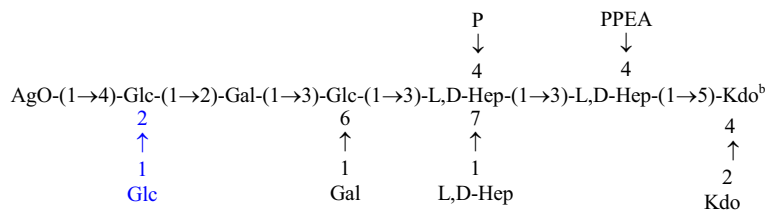
**Figura 1.8.** Estructures de les regions del nucli del LPS de *E. coli*

Quan no s'indica el contrari, els sucres són  $\alpha$ -D-piranoses. En blau es ressaltava l'oligosacàrid comú  
P: fosfat; Gal: galactosa; Glc: glucosa; GlcNAc: N-acetilglucosamina; GlcN: glucosamina; Hep: heptosa  
\*) Lloc d'unió al polisacàrid O (segons Raetz i Whitfield, 2002); a) substitució no estequiomètrica; b) producte obtingut després de de-O-acilació; c) lloc d'unió al lípid A; d) parcialment N-acetilat en el nucli complet

*S. enterica* sv. Typhimurium (Holst, 1999)



*S. enterica* sv. Arizonae IIIA (Olsthoorn *et al.*, 1998)



**Figura 1.9.** Estructures de les regions del nucli del LPS de *S. enterica*

Quan no s'indica el contrari, els sucres són  $\alpha$ -D-piranoses. En blau es ressalta la diferència més rellevant entre el serovar Typhimurium i Arizonae IIIA.

PPEA: 2-aminoetil difosfat; P: fosfat; Gal: galactosa; Glc: glucosa; Hep: heptosa

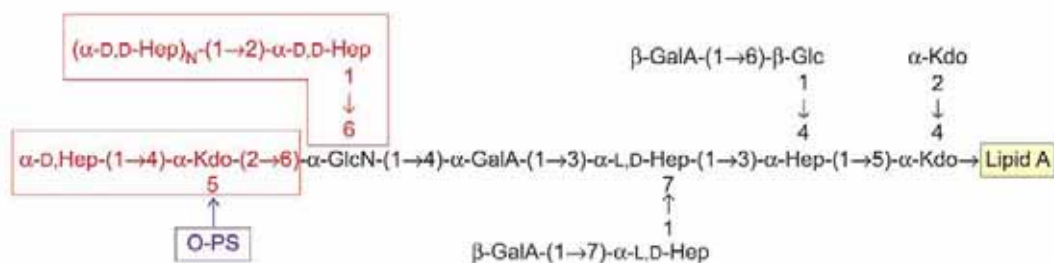
\*) la unió al polisacàrid O té lloc a través d'un residu de  $\beta$ -Gal que fou identificat amb posterioritat a la resta d'estructures per Olsthoorn *et al.*, 2000; a) substitució no-estequiomètrica; b) lloc d'unió al lípid A

Una llista no exhaustiva de constituents no gaire comuns que poden formar part del nucli extern inclouria:

- la presència d'un àcid galacturònic (GalA) unit per enllaç amida a una amina alifàtica o al grup  $\alpha$ -amino de la L-lisina, en el cas de *Proteus mirabilis* O28 (Vinogradov i Radziejewska-Lebrecht, 2000);
- la presència d'una forma oberta d'una *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) unida per enllaç glicosídic a una galactosamina en forma d'acetal cíclic, en el cas de *P. mirabilis* O27 (Vinogradov i Bock, 1999);
- la presència de 6-deoxisucres com la ramnosa (Rha) o la 6-deoxiglucosamina (QuiN, quinovosamina), i un elevat nombre de grups N- i O- acetilats, que confereixen a la regió del nucli del LPS de *Legionella pneumophila* un elevat grau d'hidrofobitat (Knirel *et al.*, 1996), que podria jugar un important paper com a factor de virulència;

- la presència en el nucli extern de residus de D,D-Hep així com de  $\alpha$ -Kdo i L,D-Hep, que són característics del nucli intern. Per exemple, en el cas del nucli extern de *K. pneumoniae* O1 s'hi troba un residu de  $\alpha$ -Kdo substituït no-estequiomètricament per un residu de L,D-Hep a través d'un enllaç  $\alpha(1\rightarrow4)$  (Vinogradov i Perry, 2001). Precisament, és important destacar que la presència d'un residu de  $\alpha$ -Kdo en el nucli extern de *K. pneumoniae* O1 és un exemple d'una estructura làbil a diversos processos químics com la hidròlisi àcida suau i la deacilació alcalina, que són dos mètodes àmpliament utilitzats per als anàlisis estructurals d'aquesta regió del nucli del LPS. Aquesta fet explicaria perquè no fou en un principi detectada la presència del Kdo en el nucli extern d'aquest bacteri (Raetz i Whitfield, 2002).

Cal també tenir present que alteracions en el nucli extern poden modificar l'eficiència de lligació de l'antigen O al nucli, de manera que dins d'una mateixa espècie bacteriana poden haver diferències estructurals significatives en el nucli extern del LPS en funció de la presència o no de l'antigen O. És possible que moltes d'aquestes modificacions del nucli extern estiguin profundament afectades per les condicions de creixement així com per diversos factors ambientals (Raetz i Whitfield, 2002). Un exemple és el cas de *K. pneumoniae* O1 (veure Figura 1.10), on el nucli del LPS de les formes S (LPS-S) presenta un residu  $\alpha$ -Kdo unit al residu de GlcN del nucli extern i que serveix de lloc d'unió a l'antigen O, mentre que el nucli del LPS de les formes R (LPS-R) no presenta el residu  $\alpha$ -Kdo del nucli extern i en el seu lloc s'hi uneix una cadena d'un nombre variable de D,D-Hep (Vinogradov *et al.*, 2002).



**Figura 1.10.** Estructura química de la regió del nucli de *K. pneumoniae* O1

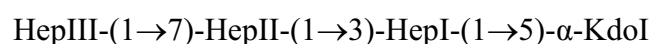
Els residus d'àcid galacturònic són no-estequiomètrics. Les regions en vermell poden variar entre les formes S i R del LPS (extret de Raetz i Whitfield, 2002)

Com s'ha dit anteriorment, la decoració del nucli del LPS amb addicions no-estequiomètriques contribueix a crear heterogeneïtat en les molècules de LPS. Això pot comportar sovint variacions en el nombre de nuclis “complets” i en la quantitat de molècules de nucli-lípid A lligades a l'antigen O extrems d'un mateix cultiu bacterià, la qual cosa dificulta l'anàlisi estructural de la regió del nucli (Schnaitman i Klena, 1993). Aquesta heterogeneïtat estructural també pot generar-se com a conseqüència dels tractaments que s'utilitzen per a l'aïllament i posterior anàlisi químic del nucli del LPS, els quals poden alterar i dificultar la determinació completa de l'estructura exacta del nucli. Cal tenir en compte que, encara que per a aïllar l'oligosacàrid del nucli se solen utilitzar condicions d'hidròlisi suau que trenquen l'enllaç entre el Kdo i el lípid A, el Kdo o d'altres substituents làbils i/o fosforilats es poden alterar. Això comporta que, en molts casos, tan sols es pugui conèixer la cadena oligosacàridica predominant per a un determinat nucli del LPS (Raetz, 1996).

Finalment, és interessant destacar l'existència d'una altra tipus d'heterogeneïtat que té lloc en el cas dels LOS dels patògens de les mucoses. En aquests bacteris l'expressió de diferents oligosacàrids units a la regió del nucli intern condueix a una “variació de fase” amb l'aparició de múltiples glicofomes i immunotipus. El LOS de *Neisseria meningitidis* n'és un bon exemple, ja que l'elevada variabilitat en la composició de la cadena  $\alpha$  i les diferents substitucions de la cadena lateral de l'heptosa (cadenes  $\beta$  i  $\gamma$ ) així com l'existència de sialilacions (unió de l'àcid N-acetilneuramínic) generen un alt grau d'heterogeneïtat (Raetz i Whitfield, 2002). El resultat d'aquestes modificacions en l'estructura del nucli és l'emascament dels grups antigènics (epítops) o bé la mimetització d'estructures de l'hoste (Caroff i Karibian, 2003).

#### 1.2.4.1.3 Característiques de la regió del nucli del LPS dels enterobacteris

En la família *Enterobacteriaceae*, les regions del nucli intern del LPS es classifiquen en dos grans grups en funció de les seves característiques estructurals. Un primer grup, estaria format pels nuclis que comparteixen uns trets estructurals comuns amb *Salmonella enterica*, mentre que el segon grup inclouria tots aquells nuclis que no comparteixen aquells trets estructurals. Ambdós grups comparteixen el següent oligosacàrid comú:





La diferència entre els dos grups és la presència de diferents substituents en aquest oligosacàrid. Així, en els membres del primer grup, entre els quals s'inclouen a part de *S. enterica*, *E. coli*, *Shigella* spp., *Hafnia alvei* o *Citrobacter freundii*, la posició O-3 de la Hep II sol estar substituïda per un residu de glucosa; els residus HepI i HepII solen estar fosforilats i la posició O-4 de l'Hep I no està substituïda per un residu sacarídic (Holst 1999, 2002, 2007). D'altra banda, en els membres del segon grup, entre els quals s'inclouen *K. pneumoniae*, *Proteus* spp. i *Yersinia* spp., la posició O3 de la Hep II sol estar ocupada per un residu d'àcid galacturònic enlloc de glucosa; el residu d'heptosa no solen estar fosforilats i la posició O-4 de l'Hep I sol estar substituïda per un residu d'hexosa (habitualment  $\beta$ -glucosa) o per un oligosacàrid (Holst 1999, 2002, 2007). En aquest sentit, és interessant destacar que la presència d'un residu de  $\beta$ -glucosa unit a la HepI per mitjà d'un enllaç  $\beta(1\rightarrow4)$  no és un tret únicament característic d'aquests bacteris sinó que és compartit amb membres d'altres famílies bacterianes com *Vibrio cholerae* O1 (Vinogradov *et al.*, 1995), *Neisseria*, *Haemophilus* o *Campylobacter* (Holst, 1999).

En el cas particular de *S. marcescens*, l'estructura del nucli del LPS no era coneguda en cap dels serovars a l'inici d'aquest treball. Estudis preliminars havien però posat de manifest la presència de residus de D,D-Hep (Wang *et al.*, 1974) i d'àcid galacturònic (GalA) (Radziejewska-Lebrecht *et al.*, 1990). Posteriorment, resultats de composició química obtinguts en el nostre grup de treball van corroborar la presència d'aquests residus en el nucli de *S. marcescens* N28b així com la presència de residus de  $\beta$ -Glc i de GlcN i l'absència de grups fosfats (Piqué, 2000). Aquestes dades feien pensar que el nucli del LPS de *S. marcescens* N28b pogués tenir una estructura química més pròxima als nuclis del LPS de *K. pneumoniae* i *Proteus* spp. que pas no als de *E. coli* i *Salmonella*.

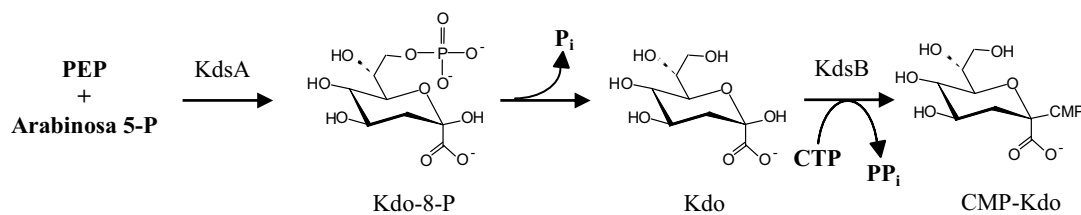
#### **1.2.4.2 Biosíntesi de la regió del nucli**

L'inici de la biosíntesi del nucli s'intercala amb el final de la biosíntesi del lípid A, ja que l'estructura del Kdo<sub>2</sub>-lípid A (veure secció 1.2.3.2 *Biosíntesi del lípid A*) actua com acceptor a partir del qual l'oligosacàrid del nucli o les cadenes de LOS són formades a través de la transferència seqüencial de residus glicosídics activats amb nucleòtids precursors. S'assumeix que en la biosíntesi d'aquesta regió hi participen un complex coordinat de proteïnes de glicosiltransferases associades a la membrana citoplasmàtica

que actuarien a la seva cara citoplasmàtica, on l'acceptor i els precursors nucleotídics són accessibles (Raetz i Whitfield, 2002). Tot i haver-se identificat molts dels gens implicats en la biosíntesi de la regió del nucli del LPS en un gran nombre de bacteris, en molts casos encara no s'ha pogut assignar la funció exacta de les transferases codificades per tots aquests gens, degut a l'àmplia diversitat estructural d'aquesta regió. No obstant, pel que fa a la regió del nucli intern, els enzims responsables de la seva formació estan força conservats, tal i com es pot predir a partir de la seva estructura (Heinrichs *et al.*, 1998).

#### 1.2.4.2.1 Formació del Kdo i transferència d'aquest residu al lípid IV

Abans de ser transferit al lípid A, el Kdo ha de ser activat. Per a la formació del Kdo activat (CMP-Kdo) cal l'actuació de dos enzims (veure Figura 1.11). En primer lloc, actua l'enzim Kdo-8-fosfat-sintasa, codificat pel gen *kdsA*, que catalitza la condensació aldòlica entre la D-arabinosa-5-P i l'àcid fosfoenolpirúvic (PEP) per generar la molècula Kdo-8-fosfat. A continuació, una fosfatasa específica elimina el fosfat i posteriorment, la CMP-Kdo-sintetasa, codificada pel gen *kdsB*, forma el CMP-Kdo (Strohmaier *et al.*, 1995). La biosíntesi d'aquest precursor ha atret considerable interès com a diana per a noves estratègies terapèutiques (veure secció 1.2.6 *El lipopolisacàrid com a diana terapèutica*).



**Figura 1.11.** Biosíntesi del CMP-Kdo

Tal i com s'ha descrit anteriorment a la secció 1.2.3.2 *Biosíntesi del lípid A*, la proteïna responsable de la transferència de residus de Kdo al lípid IV<sub>A</sub> és la Kdo transferasa WaaA, codificada pel gen *waaA*, que es localitza en el cluster *waa* (Clementz i Raetz, 1991). La Kdo transferasa (WaaA) és en *E. coli* un enzim bifuncional (Belunis i Raetz, 1992). Per a més informació, veure secció 1.2.3.2 *Biosíntesi del lípid A*.

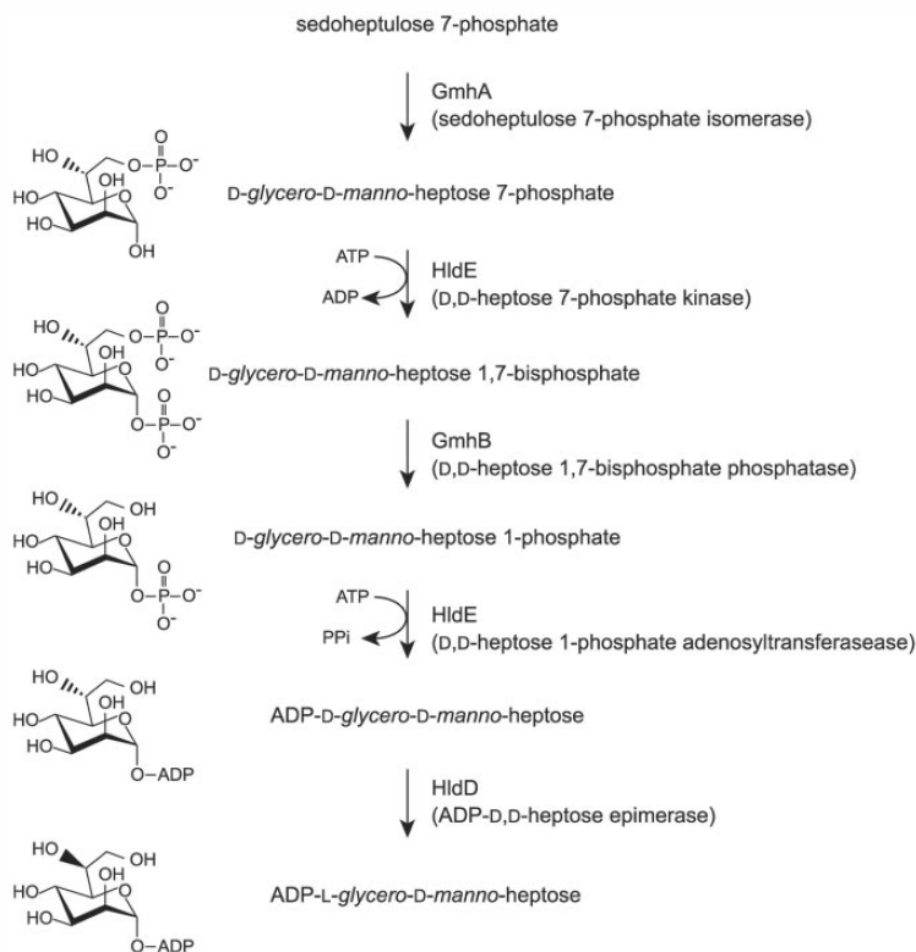
#### 1.2.4.2.2 Formació del nucli intern

Un cop formada la molècula completa constituïda pel lípid A-Kdo<sub>2</sub>, es produeix l'extensió de l'oligosacàrid del nucli intern per l'actuació seqüencial de glicosiltransferases específiques a partir de precursors nucleotídics activats. En *E. coli* i *Salmonella* això implica la transferència de residus d'heptosa a través de l'activitat seqüencial de les heptosiltransferases WaaC (Kardmas i Raetz, 1998) i WaaF (Gronow *et al.*, 2000) utilitzant preferentment com a substrat ADP-L,D-heptosa i amb molta menys eficiència ADP-D,D-heptosa (Gronow *et al.*, 2000). S'han identificat homòlegs de WaaC i WaaF en un elevat nombre de bacteris, que en la majoria de casos han estat corroborats per complementacions de les mutacions corresponents a *Salmonella* i *E. coli*.

La ruta biosintètica de la ADP-L,D-heptosa a *E. coli* ha estat recentment revisada (Kneidinger *et al.*, 2002) i s'esquematitza en la Figura 1.12. La biosíntesi de la ADP-L,D-heptosa s'inicia amb la conversió de la sedoheptulosa-7-fosfat a D,D-heptosa-7-fosfat per l'acció de l'isomerasa GmhA. A continuació, l'enzim bifuncional HldE (antigament RfaE) fosforila l'heptosa generant D,D-heptosa-1,7-bifosfat, la qual seguidament és desfosforilada per la fosfatasa GmhB donant lloc al compost D,D-heptosa-1-P. Seguidament, l'enzim HldE actua de nou generant ADP-D,D-heptosa. Finalment, l'acció de l'epimerasa HldD (també anomenada GmhD i antigament RfaD) converteix aquest compost en ADP-L,D-heptosa, que és el substrat preferent de les heptosiltransferases I, II i III.

En el nucli intern de la majoria d'enterobacteris s'hi troba un tercer residu de L,D-heptosa unit a l'Hep II a través d'un enllaç  $\alpha(1\rightarrow7)$ . En el cas de *E. coli* i *Salmonella* l'enzim responsable d'aquesta activitat és la heptosiltransferasa WaaQ (Yethon *et al.*, 1998). Les proteïnes WaaQ de *Salmonella* i *E. coli* R1, R2, R3 i R4 comparteixen una similitud total que oscil·la entre el 75,6 i el 99,6% (Heinrichs *et al.*, 1998). A part d'aquest enzim WaaQ, les modificacions en la regió del nucli de *E. coli* i *Salmonella* requereixen l'acció de dos enzims més: WaaP (LPS quinasa) i WaaY (enzim requerit per a la segona fosforilació), implicats en les reaccions de transferència dels grups fosfats. D'aquests, l'enzim WaaP és el més important ja que les modificacions en el nucli intern del LPS d'aquests bacteris han de seguir l'ordre estricte WaaPQY, de manera que els mutants que no tenen l'activitat WaaP exhibeixen un fenotip *deep-rough*

i no són virulents (Yethon *et al.*, 1998; Yethon *et al.*, 2000). Per aquesta raó, la proteïna WaaP ha esdevingut una diana terapèutica potencial (veure secció 1.2.6 *El lipopolisacàrid com a diana terapèutica*). Aquest ordre estricte d'esdeveniments suggereix que els enzims que intervenen en aquestes modificacions puguin tenir uns requisits complexes respecte als seus acceptors (Raetz i Whitfield, 2002). D'altra banda, s'han identificat també putatives glicosiltransferases que podrien estar implicades en altres modificacions del nucli intern (Raetz i Whitfield, 2002).



**Figura 1.12.** Biosíntesi de l'ADP-L-glicero-D-manno-heptosa a *E. coli* (extret de Raetz i Whitfield, 2002)

#### 1.2.4.2.3 Formació del nucli extern

La biosíntesi del nucli extern ocorre d'una manera similar a la del nucli intern amb la diferència que els enzims implicats en la seva biosíntesi estan menys conservats, tal i com cal esperar d'una regió estructuralment més variable que el nucli intern.

Tots els nuclis del LPS de *E. coli* i *Salmonella* tenen un residu de glucosa com a primer sucre del nucli extern. A partir de dades bioquímiques, d'estructura del LPS i d'estudis de complementació gènica es va poder identificar la glicosiltransferasa WaaG com l'enzim responsable de la transferència d'un residu de glucosa a partir del UDP-glucosa a la segona heptosa per enllaç  $\alpha(1\rightarrow3)$ . Per a la biosíntesi de la resta de nucli extern, hi intervenen diferents glicosiltransferases que transfereixen residus de glucosa o galactosa a través de diferents enllaços  $\alpha$ -glicosídics, en funció de l'estructura de LPS final. Totes aquestes transferases pertanyen a una mateixa família de glicosiltransferases, la família 8 en el sistema de classificació de glicosiltransferases CAZY (*Carbohydrate-Active enZymes*) (<http://www.cazy.org/>), i comparteixen regions altament conservades (Raetz i Whitfield, 2002). Totes aquestes glicosiltransferases catalitzen la formació d'enllaços  $\alpha$ -glicosídics a partir de donadors units per enllaços  $\alpha$ . No obstant, en el cas dels nuclis de *Salmonella enterica* sv. Typhimurium i els de *E. coli* R1 i R4 a més hi intervenen  $\beta$ -glicosiltransferases, que utilitzen un donador unit per enllaç  $\alpha$  per a generar un producte unit per enllaç  $\beta$ . En el cas de *E. coli* R1 i R4 s'afegeixen en la mateixa regió del nucli diferents residus per enllaç  $\beta$ -glicosídic a través de reaccions catalitzades pels enzims WaaV i WaaX, respectivament (Heinrichs *et al.*, 1998a). Ambdues proteïnes però presenten nivells baixos de similitud (Heinrichs *et al.*, 1998).

#### 1.2.4.2.4 Lligació del polisacàrid O a l'acceptor lípid A-nucli

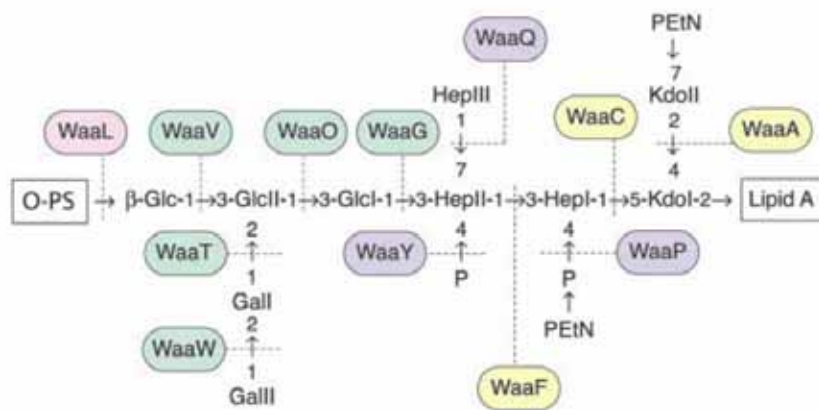
El punt final del procés biosintètic en el cas de les molècules de LPS-S consisteix en la unió covalent del polisacàrid o antigen O al complex lípid A-nucli i aquesta reacció de lligació té lloc a la cara periplàsmica de la membrana citoplasmàtica (Whitfield *et al.*, 1997). El mecanisme que permet transportar el complex lípid A-nucli a través de la membrana citoplasmàtica cap a l'espai periplàsmic on s'unirà amb l'antigen O és en bona part desconegut però en els últims anys s'han fet notables avenços en elucidar aquest mecanisme de transport. Actualment es coneix que hi està implicada la proteïna MsbA que és un transportador de tipus ABC essencial per a la supervivència del bacteri. Aquesta proteïna actua com una flipasa, la qual a través de la unió i hidròlisi de l'ATP en els dominis d'unió als nucleòtids forçaria, per un mecanisme flip-flop, al complex lípid A-nucli a moure's cap a l'espai periplàsmic de la membrana interna (Trent, 2004; Raetz i Whitfield, 2002). No obstant, resta encara per determinar el

mecanisme exacte i si ha més proteïnes implicades en aquest transport (Raetz i Whitfield, 2002).

El mecanisme exacte de lligació del complex lípid A-nucli a l'antigen O no és del tot conegut, però actualment l'únic enzim que se sap que és requerit per aquest procés és l'enzim WaaL. Aquests enzims són força diferents d'una espècie bacteriana a una altra i presenten forces variacions en la seva seqüència primària. Tot i això, s'ha pogut predir que en tots els casos es tracta de proteïnes integrals, amb vuit o més dominis transmembrana, que mantenen unes característiques fisico-químiques similars. Aquests enzims catalitzen la formació d'enllaços glicosídics però, com que el substrat donador és un oligo- o polisacàrid unit a l'undecaprenol fosfat, no comparteixen similitud amb les famílies de glicosiltransferases que utilitzen com a donadors residus de sucres nucleotídics. D'altra banda, s'ha comprovat que els enzims WaaL no discriminen entre la majoria d'antígens O que poden unir a l'acceptor (complex lípid A- nucli). Per tant, es creu que les variacions en les seqüències de les lligases pot ser un reflex de la especificitat per a una determinada estructura de nucli a la qual uniran cert antigen. S'ha demostrat que l'especificitat d'aquest enzim lligasa per l'acceptor implica no tan sols el residu concret del nucli on s'hi unirà l'antigen O sinó també els residus més pròxims en el nucli (Heinrichs *et al.*, 1998; Raetz i Whitfield, 2002).

#### 1.2.4.2.5 Casos particulars de rutes biosintètiques

Com a exemple, a la Figura 1.13 es mostra el sistema de biosíntesi del nucli del LPS de *E. coli* R1 (Heinrichs *et al.*, 1998a; Yethon *et al.*, 1998), que és un dels primers i millors sistemes caracteritzats. En aquests sistema de biosíntesi, l'assignació de la funció corresponent a cadascun dels enzims implicats es va realitzar a partir de la generació de mutants de cadascun dels gens involucrats i el subseqüent estudi de l'estructura del LPS resultant en cadascun d'aquests mutants.



**Figura 1.13.** Estructura i biosíntesi del nucli del LPS de *E. coli* R1 (extret de Raetz i Whitfield, 2002)

Els enzims implicats en la formació del nucli intern estan marcats en groc mentre que els implicats en les seves modificacions són de color violeta. En verd s'indiquen les glicosiltransferases implicades en la formació del nucli extern, mentre que la lligasa està marcada en rosa

En el cas particular de *S. marcescens*, estudis previs realitzats en el nostre grup de recerca van permetre clonar i seqüenciar els gens implicats en la biosíntesi del nucli del LPS de *S. marcescens* N28b (Piqué, 2000; Abitiu, 2000), que és el punt de partida d'aquest treball. No obstant, com ja s'ha dit anteriorment, es desconeixia l'estructura química d'aquesta regió del LPS d'aquest bacteri i per tant, no fou possible assignar la funció exacte per a cadascuna de les glicosiltransferases identificades (veure secció 1.2.4.3 *Organització genètica*). Tot i així, atès als certs nivells de similitud de la proteïna codificada pel gen *waaE* amb proteïnes implicades en la transferència d'un residu de  $\beta$ -glucosa a l'heptosa I del nucli intern es va proposar que aquest gen podria estar implicat en aquesta funció a *S. marcescens* N28b (Piqué, 2000). A més, a través de la comparació de seqüències es va poder assignar funcions putatives a algunes de les transferases identificades (Abitiu, 2000), que es proposen de corroborar en el present treball (veure secció 4. *Resultats*).

#### 1.2.4.3 Organització genètica

Els estudis de caracterització dels gens implicats en la biosíntesi de la regió del nucli del LPS a *Escherichia coli* i *Salmonella enterica* (Heinrichs *et al.*, 1998) així com a *Klebsiella pneumoniae* (Regué *et al.*, 2001) i d'altres bacteris han posat de manifest que aquests gens solen estar agrupats en una regió del cromosoma que es coneix com

l'agrupació gènica *waa*, en la que es codifiquen totes les activitats enzimàtiques necessàries per a la formació del nucli extern i intern (Raetz i Whitfield, 2002). No obstant, aquesta distribució no hi és present a d'altres bacteris; així, en alguns casos, com a *Bordetella*, els gens implicats en la biosíntesi del nucli i del polisacàrid O es troben ubicats a la mateixa agrupació gènica (Allen i Maskell, 1996), mentre que en altres bacteris com *P. aeruginosa* o *V. cholerae* es troben agrupats únicament part del total dels gens implicats en la biosíntesi del nucli (Raetz i Whitfield, 2002). Fora d'aquesta agrupació gènica *waa* s'hi ubiquen els gens *kdsA* i *KdsB*, implicats en la biosíntesi del Kdo, així com la majoria de gens relacionats amb la biosíntesi de la L,D-heptosa (Schnaitman i Klena, 1993).

En el cas de *E. coli* i *Salmonella*, el locus *waa* consisteix en tres operons que es defineixen pel primer gen de cada unitat transcripcional: *hldD*-, *waaQ*-, i *waaA* (veure Figura 1.14). Els gens *hldD*, *waaF* i *waaC*, que formen part del primer operó, són necessaris per a la biosíntesi de la L,D-heptosa i la seva transferència al nucli intern. En *E. coli* K12 la transcripció d'aquest operó està regulada per un promotor sensible a la temperatura (*heat shock promoter*), que potser pot indicar la necessitat de la regió de les heptoses per al creixement del bacteri a temperatures elevades (Schnaitman i Klena, 1993; Raetz, 1996). El llarg operó central *waaQ* conté els gens implicats en la biosíntesi del nucli extern i en les modificacions del nucli i en el cas dels nuclis de *E. coli* R1 i R4 també conté el gen *waaL* que codifica per la lligasa que uneix el polisacàrid O a la regió del nucli. Aquest operó *waaQ* està precedit per una seqüència de 39 parells de bases (pb) anomenada JUMPStart (*Just Upstream of Many Polysaccharide-associated gene Starts*) que inclou una seqüència conservada de 8 pb anomenada *ops* (*operon polarity supressor*) que junt amb la proteïna RfaH és necessària per a la supressió de la polaritat de l'operó. Així, la proteïna RfaH pot interaccionar amb la proteïna Rho i amb la ARN polimerasa per a formar un complex de transcripció que pot estendre's més enllà de certs elements de terminació. D'aquesta manera la proteïna RfaH i l'element *ops* funcionarien com un sistema antiterminació en la biosíntesi del nucli, eludint així les múltiples seqüències de parada que hi ha al llarg de l'operó (Bailey *et al.*, 1997). Per últim, en direcció oposada, es transcriu l'operó *waaA*, que conté els gens *waaA*, que codifica per l'enzim bifuncional Kdo transferasa i el gen *coaD*, que no està implicat en la biosíntesi del nucli del LPS sinó en la biosíntesi del coenzim A (Geerlof *et al.*, 1999).

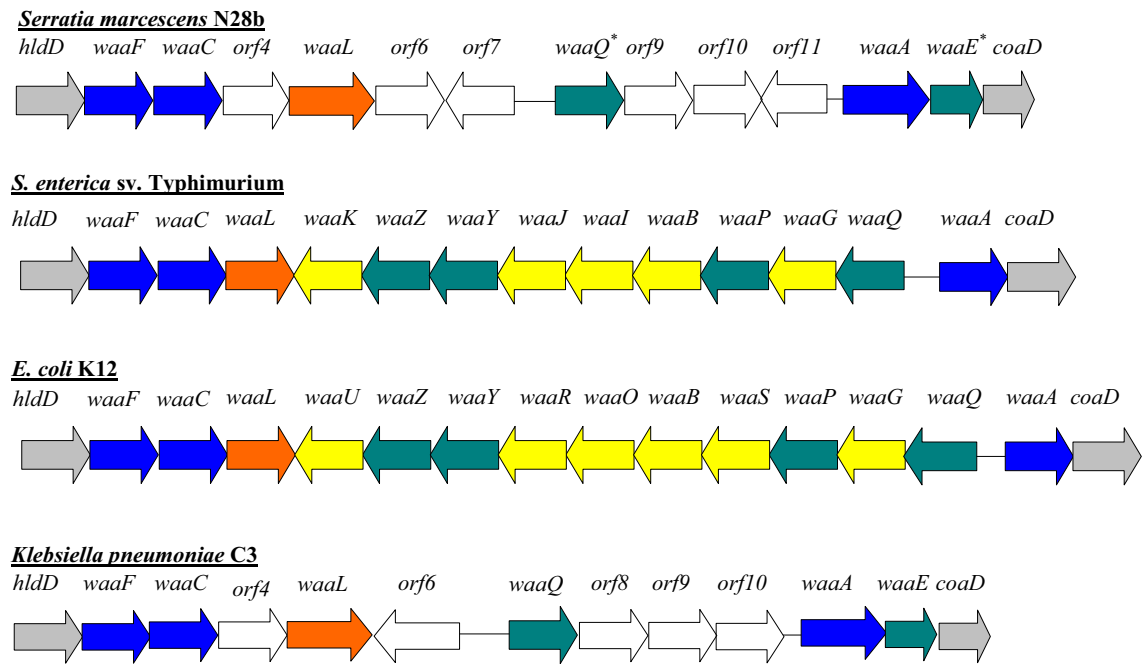


La comparació de l'agrupació gènica *waa* de *S. marcescens* N28b amb la dels altres membres de la família *Enterobacteriaceae* posa de relleu tant l'existència de similituds com de diferències en la seva organització genètica (veure Figura 1.14). Estudis realitzats pel nostre grup de recerca van identificar 14 pautes de lectura oberta (ORFs, *open reading frame*) en l'agrupació gènica *waa* de *S. marcescens* N28b (Abitiu, 2000) que estaven organitzades en tres operons, mentre que els *orf7* i *orf11* aparentment corresponien a dos gens monocistrònics que es transcrivien en direcció contrària als tres operons, i per als quals no es va poder assignar una determinada funció.

El primer operó de tots, l'operó *hldD*, contenia sis ORFs, de les quals les tres primeres foren identificades com els gens *hldD*, *waaF* i *waaC* que eren compartits amb la resta d'enterobacteris (veure Figura 1.14). Els productes gènics d'aquests tres gens estarien implicats en la biosíntesi de l'heptosa i en la transferència de l'heptosa I i II al nucli intern i les seves funcions van ser assignades tant per l'elevat grau d'identitat de la seva seqüència aminoacídica amb la dels enzims responsables d'aquestes funcions a d'altres enterobacteris com per estudis de complementacions gèniques amb mutants de *Salmonella* (Abitiu, 2000). A més, en aquest mateix operó *hldD* s'hi identificaren tres ORFs addicionals, de les quals a dues (*orf4* i *orf6*) no se'ls hi va poder assignar funció mentre que l'*orf5* es va proposar que podria codificar per l'enzim WaaL, el qual estaria implicat en la lligació de l'antigen O.

El segon operó contenia únicament tres ORFs; una d'elles, la *orf8*, es postulà com a candidata per ser el gen *waaQ* que codificaria per l'enzim responsable de catalitzar la unió de l'heptosa III ramificada al nucli mentre que a les altres dues *orfs* no se'ls hi va poder assignar clarament una funció.

Finalment, l'operó *waaA* estava format per tres gens: el *waaA*, *waaE* i *coaD* (Guasch *et al.*, 1996). Estudis de complementació van permetre identificar el producte del gen *waaA* com la transferasa bifuncional que uniria els residus de Kdo al lípid A (Guasch *et al.*, 1996; Abitiu, 2000) mentre que el gen *coaD* estaria implicat en la biosíntesi del coenzim A. Finalment, estudis previs realitzats en el nostre grup proposaven el producte gènec del gen *waaE* com el responsable de transferir un  $\beta$ -glucosa ramificada a l'heptosa I del nucli intern.



**Figura 1.14.** Esquema de l'agrupació gènica *waa* de *S. marcescens* N28b i comparació d'aquesta agrupació gènica amb les de *E. coli* K12, *S. enterica* sv. Typhimurium (Heinrichs *et al.*, 1998) i *K. pneumoniae* C3 (Regué *et al.*, 2001)

En blau s'indiquen els gens implicats en la formació del nucli intern comuns a tots els enterobacteris mentre que en verd es mostren els implicats en les modificacions de la seva estructura. En groc s'indiquen les glicosiltransferases implicades en la formació del nucli extern, mentre que el gen de la lligasa està marcat en taronja. En blanc es mostren aquelles pautes de lectura que codifiquen per enzims que no tenen una funció assignada i en gris els gens que o bé no estan directament relacionats amb la transferència de sucres al nucli (*hldD*) o que no estan involucrats en la biosíntesi del LPS (*coaD*). L'asteric (\*) sobre els gens *waaQ* i *waaE* indica que l'assignació d'aquests gens és temptativa i per això s'ha corroborat en el present treball

Quan es comparen les agrupacions gèniques *waa* de *S. marcescens* N28b i *K. pneumoniae* C3 es poden observar diferències en la distribució d'alguns gens en els diferents operons, tot i que s'aprecien més similituds que quan es comparen amb les de *E. coli* i *Salmonella enterica* (veure Figura 1.14). L'agrupació de *S. marcescens*, igual que la de *K. pneumoniae* C3, conté a l'extrem 3' del gen *waaA*, el gen *waaE* que no està present ni a *E. coli* ni a *Salmonella*. No obstant, a *S. marcescens*, el gen *waaE* forma part de l'operó *waaA* que conté únicament tres gens mentre que a *K. pneumoniae* C3 el gen *waaE* és part de l'operó *waaQ* que conté 7 gens. Una altra diferència se situaria a l'operó *hldD*. Els tres primers gens d'aquest operó *hldD*, *waaF* i *waaC* són comuns a *E. coli* K12, *S. enterica* sv. Typhimurium, *S. marcescens* N28b i a *K. pneumoniae* C3 però la resta de gens de l'operó varia en funció del bacteri (veure Figura 1.14).

En resum, les diferències entre les diverses agrupacions gèniques *waa* seqüenciades fins el moment, determinen importants variacions estructurals en el nucli extern i en les modificacions del nucli intern, mentre que les regions, o gens, altament conservats dins d'aquestes agrupacions es relacionen amb les funcions crítiques e inalterables del nucli intern (Heinrichs *et al.*, 1998).

## **1.2.5 L'ANTIGEN O**

### **1.2.5.1 Estructura i funció**

Els polisacàrids O específics o antígens O, que estan únicament presents en bacteris que produeixen LPS de tipus S, són polisacàrids formats per repeticions d'una unitat estructural bàsica que estan exposats a la superfície bacteriana i es troben normalment units per un residu terminal del nucli extern. Els antígens O presenten una elevada diversitat estructural; s'han trobat més de 60 monosacàrids i 30 components no-sacarídics diferents com a constituents dels antígens O de diferents bacteris (Raetz i Whitfield, 2002). Un antígen O pot estar constituït per 50 subunitats de repetició i alhora cadascuna d'aquestes subunitats pot estar formada per grups d'un a vuit monosacàrids (Caroff i Karibian, 2003; Jansson, 1999). Les subunitats de repetició poden variar en els monòmers que les formen, la posició i estereoquímica dels enllaços O-glicosídics i en la presència o absència de substituents no-sacarídics (Raetz i Whitfield, 2002). D'altra banda, les unitats de repetició de diferents bacteris, a part de poder diferir en el nombre de monosacàrids que les formen, poden ser lineals o ramificades, i poden donar lloc a antígens O homopolimèrics o més freqüentment, heteropolimèrics. En alguns casos, a més, poden haver-hi modificacions no estequiomètriques tals com O-acetilacions o glicosilacions que encara dificulten més la identificació d'una subunitat estructural concreta (Raetz i Whitfield, 2002). Quan s'analitzen per SDS-PAGE les molècules de LPS-S extretes d'un cultiu bacterià, existeix una elevada heterogeneïtat en la mida de les molècules deguda a les variacions en la llargada de les cadenes d'antigen O. Aquesta heterogeneïtat es posa de manifest per un patró característic "d'escala", que sol ser típic de cada soca, on cada "graó" de l'escala representa una molècula de lípid A- nucli substituïda per una unitat O addicional i a on l'espai entre els diferents graons depèn de la mida de la unitat O (Raetz i Whitfield, 2002).

L'antigen O és la part més externa del LPS i al mateix temps la més immunogènica i variable. Cada antigen O conté uns grups estructural específics, anomenats factors O, que formen epítops reconeguts per anticossos específics i que determinen el serovar d'una soca en particular, fet que ha comportat la creació dels diferents esquemes de serotipat que s'utilitzen en epidemiologia. Per tal d'evadir els anticossos del sèrum, les diferents soques produeixen un nombre extraordinàriament elevat d'estructures diferents d'antigen O, fins i tot dins d'una mateixa espècie (Müller-Loennies *et al.*, 2007). Així, per exemple en *E. coli* es reconeixen més de 180 antígens O diferents, les estructures dels quals són accessibles a través de la base de dades de *E. coli* ECODAB (<http://www.casper.organ.su.se/ECODAB/>) (Stenutz *et al.*, 2006). Cal també tenir en compte que encara que existeixi una elevada diversitat estructural, l'aparició de certes reactivitats serològiques creuades indica l'existència de cadenes d'antígens O, o de part d'elles, similars o idèntiques, fins i tot en espècies taxonòmicament allunyades. Basant-se en aquest fenomen, es va desenvolupar una vacuna de bacteris vius de *Salmonella landau* que va donar bons resultats contra *E. coli* O:157:H7 en un model de ratolí de colonització intestinal (Caroff i Karibian, 2003). D'altra banda, cal tenir present que en molts bacteris l'estructura lípid A – nucli pot servir de punt d'ancoratge d'altres polisacàrids de la superfície bacteriana diferents de l'antigen O com l'antigen comú dels enterobacteris (ECA) o antígens capsulars (K) i això fa que encara es compliquin més els anàlisis estructurals i la terminologia de l'antigen O (Raetz i Whitfield, 2002).

En el cas de *Serratia marcescens*, clàssicament s'havien definit 29 serovars O. El 1998, Aucken i col·laboradors, a partir de les estructures químiques identificades fins el moment per l'antigen O d'aquest bacteri i dels estudis serològics, van determinar que moltes de les soques de referència d'aquests 29 serovars contenien tant polisacàrids neutres com àcids que corresponien a antígens O i antígens capsulars K, respectivament. Per això, van proposar un nou esquema de serotipat O complementat amb els antígens capsulars (K) on els 29 serovars O clàssics quedaren reduïts a 19 serovars O, cadascun dels quals representava una unitat estructural definida (Aucken *et al.*, 1998). En general, les subunitats de repetició de l'antigen O de *S. marcescens* són químicament simples, formades habitualment per di- o trisacàrids. Els monosacàrids que componen aquestes subunitats solen ser força comuns: pentoses, hexoses, N-acetilaminosucres... L'especificitat serològica en molts casos es deu únicament a la presència o absència d'un substituent O-acetil o bé a un canvi en el tipus d'enllaç entre

dos residus sacarídics diferents (Aucken *et al.*, 1998). La soca de *S. marcescens* N28b utilitzada en aquest treball pertany al serovar O4. La subunitat de repetició de l'antigen O4 correspon a un disacàrid de L-ramnosa unit per enllaç  $\alpha(1\rightarrow4)$  a una D-glucosa (Oxley i Wilkinson, 1988). En la Taula 1.3 es resumeixen les diferents estructures químiques per a cadascun dels 19 nous serovars proposats per Aucken *et al.*, 1998.

La localització de l'antigen O a la superfície cel·lular fa que se situï a la interfase entre el bacteri i el medi que l'envolta. L'interès científic en aquesta molècula ha estat en bona part motivat pel seu paper com a factor de virulència bacterià i per la seva possible aplicació per al desenvolupament de vacunes (Raetz i Whitfield, 2002) (veure secció 1.2.6 *El lipopolisacàrid com a diana terapèutica*). Una de les funcions biològiques principals que se li atribueixen a l'antigen O és la d'emascarar el bacteri per tal de protegir-lo i ajudar-lo a evadir els sistemes de defensa de l'hoste, particularment de l'acció lítica del sistema complement (Raetz i Whitfield, 2002). El mecanisme precís pel qual el bacteri pot evitar l'activitat bactericida del sèrum no és del tot conegut però és probable que ho faci mantenint les molècules perilloses lluny dels elements essencials i més vulnerables de la membrana superficial del bacteri. De fet, la pèrdua de l'antigen O sol anar acompanyada per una disminució significativa de la virulència degut a un increment en la susceptibilitat a l'acció bactericida del sistema complement (Müller-Loennies *et al.*, 2007). La quantitat de molècules de LPS cobertes amb antigen O així com la composició i llargada de les cadenes polisacàridiques influencien la capacitat que tenen alguns bacteris de resistir a l'acció lítica del sistema complement (Raetz i Whitfield, 2002). El paper exacte que juga cada antigen O en els diferents bacteris és però molt variable. Així, en alguns bacteris s'ha vist que l'expressió de l'antigen O els protegeix contra l'efecte de nombrosos antibiòtics tal i com s'observa per la relativa sensibilitat de les soques rugoses enfront de les llises (Caroff i Karibian, 2003). En d'altres casos, l'antigen O és el responsable de l'adhesió als teixits dels mamífers afavorint així el procés infecció (Williams i Tomás, 1990; Caroff i Karibian, 2003).

**Taula 1.3.** Estructures químiques dels 19 nous serovars de *S. marcescens* (extret de Aucken *et al.*, 1998) #

Soca de referència (nou serovar)	Estructura
O16† (O16)	→ 2)-β-D-Ribf-(1 →
O12 & O14 (O14)	→ 2)-β-D-Ribf-(1 → 4)-α-D-GalpNAc-(1 →
	y ↓ 2
O4 (O4)	→ 3)-x-L-Rhap-(1 → 4)-α-D-Glcp-(1 → α OAc
O27 (O27)	α -
O6 & O7 (O6)	β OAc
	→ X)-α-L-Rhap-(1 → Y)-β-D-HexpNAc-(1 →
O1 (O19)	4 3 Glc
O19 (O19)	3(4) 3 Glc
O9 (O26)	3(4) 3 Gal
O15 & O26 (O26)	4(3) 3 Gal
O23 (O23)	4 4 Gal
	x y ↓ ↓ 2 4
O5 (O5)	→ 3)-β-D-Galf-(1 → Y)-α-D-Hexp-(1 → OAc 4 Glc (no z)
O16† & O20 (O20)	- 3 Gal (no z)
O24 (O24)	- 3 Gal (z = α-D-Galp)
	→ 4)-α-D-GlcpX-(1 → 4)-β-D-ManpNAc-(1 →
O2 & O3 (O2)	NAc
O21 (O21)	-
O28 (O28)	→ 3)-β-D-Manp-(1 → 2)-α-D-Manp-(1 → 2)-α-D-Manp-(1 →
	y ↓ 4
O10 (O10)	→ 2)-α-L-Rhap-(1 → 2)-α-L-Rhap-(1 → X)-α-L-Rhap-(1 → Z)-α-D-GlcpX-(1 → 3 α-D-Glcp 3 NAc
O22 (O22)	3 - 3 NAc
O18 (O18)	2 - 6 NAc
O29 (O29)	2 - 6 -
	β-D-GlcpNAc 1 ↓ 3
O8 (O8)	→ 6)-α-D-Glcp-(1 → 4)-α-D-Galp-(1 → 3)-β-D-GlcpNAc-(1 →

# Sense parèntesi s'indiquen els 29 serovars clàssics i entre parèntesi la correspondència amb cadascun dels 19 serovars proposats per Aucken *et al.*, 1998

† Es van identificar dos polisacàrids neutres (O16 i O20) a la soca de referència O16 IP687

Abreviatures: Gal, galactosa; GalNAc, N-acetilgalactosamina; Glc, glucosa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; Hex, hexosa; HexNAc, N-acetilhexosamina; Man, manosa; ManNAc, N-acetilmanosamina; Rha, ramnosa; Rib, ribosa

### 1.2.5.2 Biosíntesi de l'antigen O

La biosíntesi de l'antigen O es produeix independentment de la biosíntesi del lípid A i del nucli i té lloc en un proteïna transportadora de membrana que s'anomena undecaprenol fosfat (und-P). Malgrat la gran diversitat estructural que presenten els antigens O, la seva ruta biosintètica presenta passos força conservats, particularment els passos d'iniciació i el pas final de lligació, per la qual cosa tenen cert interès com a futures dianes terapèutiques (Yethon i Whitfield, 2001) (veure secció 1.2.6 *El lipopolisacàrid com a diana terapèutica*). En línies generals, els antigens O es sintetitzen a partir de monosacàrids activats per l'acció de glicosiltransferases a la cara interna de la membrana citoplasmàtica, però són posteriorment transferits i units al complex lípid A – nucli en la cara periplàsmica de la membrana plasmàtica, la qual cosa implica l'existència d'un sistema de transport de l'antigen O cap a l'espai periplàsmic (McGrath i Osborn, 1991). Les tres rutes que actualment es coneixen per a la biosíntesi de l'antigen O es distingeixen pels seus mecanismes d'exportació i s'anomenen Wzy-dependent, transportador ABC-dependent i sintasa-dependent, tenint aquesta última una distribució molt més limitada. A part de les diferències en el seu sistema d'exportació, les tres rutes biosintètiques tenen reaccions d'iniciació similars i el mateix procés de lligació al complex lípid A – nucli (Whitfield *et al.*, 1997; Raetz i Whitfield, 2002).

Alguns dels precursors necessaris per a la síntesi de l'antigen O s'obtenen del metabolisme central del bacteri. Aquest és el cas de la UDP-glucosa, UDP-galactosa o UDP-N-acetilglucosamina que, o bé es poden incorporar directament al polímer en formació, o bé poden servir d'intermediaris per a la síntesi d'altres monosacàrids activats, com la GDP-manosa, la dTDP-ramnosa o la CDP-abequosa que només estan presents en alguns antigens O. Molts d'aquests últims monosacàrids activats estan sintetitzats per enzims codificats per gens localitzats a l'agrupació gènica *wbb*, que conté els gens necessaris per a la biosíntesi de l'antigen O (veure secció 1.2.5.3 *Organització genètica*).

A continuació, es resumeixen els passos més importants de la biosíntesi de l'antigen O.

#### 1.2.5.2.1 Reaccions d'iniciació

La biosíntesi de l'antigen O s'inicia amb la transferència d'una hexosa –fosfat des d'un precursor monosacàridic activat a la proteïna transportadora de lípids anomenada undecaprenol fosfat (und-P), per a formar un residu monosacàridic unit per enllaç fosfodiester a l'und-P. Aquest pas inicial condiona al und-P cap a la biosíntesi de l'antigen O, potser a través del segrest d'aquesta molècula de les seves altres funcions essencials a la cèl·lula, com per exemple, el seu requeriment per a la biosíntesi del peptidoglicà o de polisacàrids capsulars (Yethon i Whitfield, 2001).

Tot i que els antígens O presenten una elevada diversitat estructural, només s'han trobat dues classes diferents d'enzims iniciadors: WecA i homòlegs i la família dels enzims WbaP. L'enzim WecA (rfe), identificat inicialment en la ruta biosintètica del ECA, inicia la síntesi del polímer amb l'addició d'una N-acetilglucosamina-1-P (GlcNAc-1-P) (Meier-Dieter *et al.*, 1992), encara que els seus homòlegs poden utilitzar altres hexosamines-1-fosfat com a substrats (Yethon i Whitfield, 2001). D'altra banda, la família d'enzims WbaP (RfbP) inicien la síntesi del polímer gràcies a la transferència d'una glucosa-1-fosfat o una galactosa-1-fosfat al und-P (Wang *et al.*, 1996).

#### 1.2.5.2.2 Polimerització i exportació

Un cop iniciat el procés biosintètic l'elongació de la cadena pot ocórrer per qualsevol dels tres mecanismes que es descriuen a continuació:

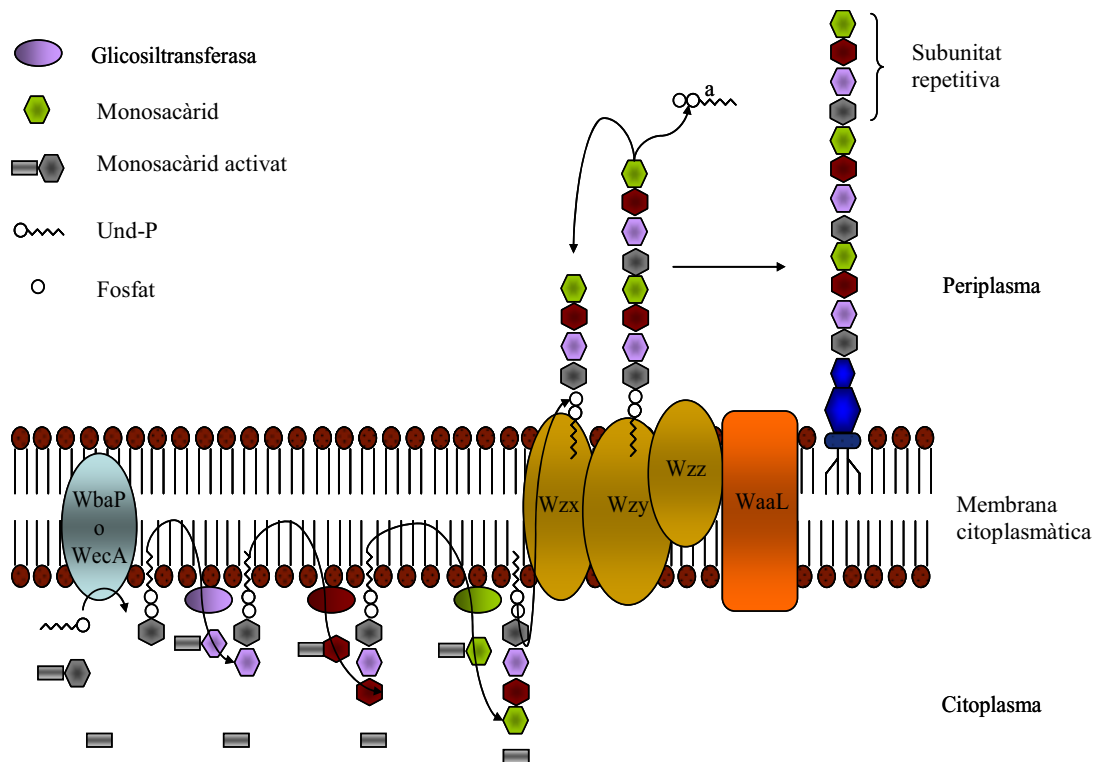
- **Sistema Wzy-dependent** (veure Figura 1.15): Aquest sistema és el que es duu a terme per a la biosíntesi de la major part d'heteropolisacàrids que sovint presenten ramificacions i implica l'acció coordinada de tres productes gènics: Wzy (antigen O polimerasa), Wzz (regulador de la cadena d'antigen O) i Wzx (putativa antigen O flipasa) (Raetz i Whitfield, 2002). En aquest sistema, un cop realitzada la reacció d'iniciació que està catalitzada per la proteïna WbaP o WecA, el procés continua amb l'addició seqüencial dels diferents monosacàrids fins a constituir una subunitat O de repetició. Aquest procés té lloc a la cara citoplasmàtica de la membrana plasmàtica gràcies a l'acció de glicosiltransferases específiques. Posteriorment, cadascuna de les subunitats O unides a l'undecaprenol és individualment transferida



a la cara periplàsmica de la membrana plasmàtica, a través d'un procés transmembrana de translocació, tipus "flip-flop". Actualment, es coneix que aquest procés de translocació requereix l'acció de la proteïna transmembrana Wzx (Feldman *et al.*, 1999), però el mecanisme bioquímic exacte que intervé en aquesta translocació encara no és prou conegut ni tampoc es coneix si hi intervé cap altre enzim (Raetz i Whitfield, 2002).

Un cop arriben al periplasma, les subunitats de repetició unides a l'undecaprenol-PP polimeritzen mitjançant la transferència del polímer en formació des del seu transportador und-PP cap a l'extrem no reductor de la nova subunitat O i això resulta en un increment d'una unitat de repetició per l'extrem no reductor del polímer en formació. Aquesta reacció de polimerització és catalitzada per l'antigen O polimerasa Wzy, que és una proteïna amb múltiples dominis transmembrana. S'ha observat que mutants en aquesta proteïna produeixen LPS de tipus *smooth-rough* (SR) amb una sola unitat de repetició unida al nucli (-LPS) (Collins i Hackett, 1991). En aquesta reacció de polimerització s'allibera cada cop una unitat de und-PP que ha de ser reciclada a la forma activa monofosforilada. Degut a la utilització intensiva d'aquest transportador, aquesta ruta biosintètica queda inhibida per l'antibiòtic bacitracina, ja que inhibeix la desfosforilació del und-PP (Raetz i Whitfield, 2002).

L'últim component d'aquest sistema és la proteïna Wzz, que és la responsable de regular la longitud de la cadena d'antigen O. S'han postulat dos mecanismes d'actuació per aquesta proteïna. El primer model considera que Wzz interactua amb la Wzy modulant la seva activitat entre dos estats funcionals diferents: un que afavoriria l'elongació de la cadena polisacàridica i l'altra que afavoriria la transferència a la lligasa. Segons el segon model, la proteïna Wzz actuarà com una xaperona que permetria la formació d'un complex entre Wzy, la lligasa WaaL i el polisacàrid unit al und-PP, on la longitud de la cadena es determinaria per la proporció de Wzy i WaaL (Raetz i Whitfield, 2002).



**Figura 1.15.** Esquema de la biosíntesi d'un antigen O Wzy-dependent

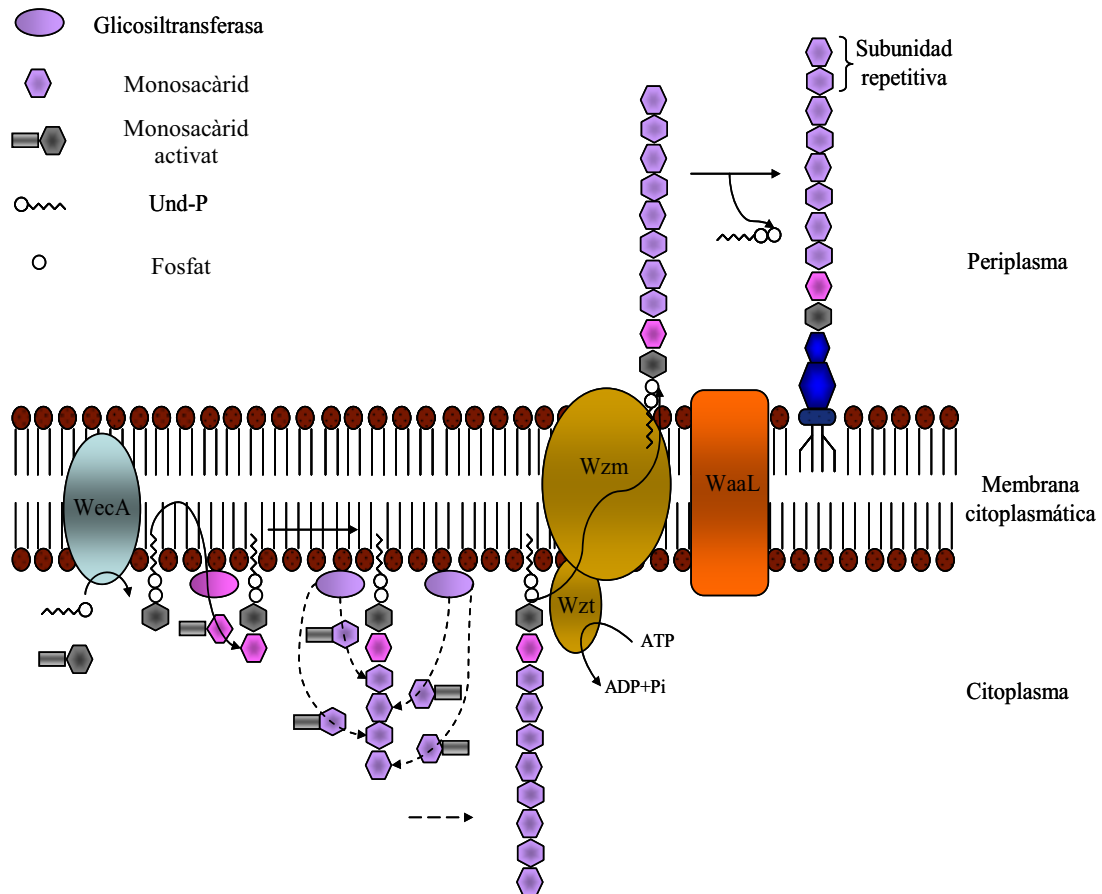
Les subunitats de repetició són exportades al citoplasma individualitzadament a través de la proteïna Wzx. Allí, la proteïna Wzy regula la polimerització unint el polímer en formació a la subunitat recent exportada. Cada subunitat polimeritzada representa l'alliberació d'una molècula de und-PP (a) que ha de ser reciclada

- **Sistema transportador ABC-dependen** (veure Figura 1.16): Aquest sistema és propi dels antígens O lineals (no ramificats). Encara que clàssicament aquesta ruta biosintètica s'ha considerat característica dels antígens O homopolimèrics (Whitfield, 1995), recentment s'han identificat alguns antígens O heteropolisacàrids com l'antigen O12 de *Klebsiella pneumoniae* (Izquierdo *et al.*, 2003a) o l'antigen O4 de *Serratia marcescens* N28b (Saigí *et al.*, 1999), que és la soca utilitzada en aquest treball, que són exportats per un sistema transportador ABC-2 dependen. En aquesta ruta, el polisacàrid és sintetitzat completament al citoplasma, la polimerització no requereix una polimerasa específica i l'exportació a la cara periplàsmica de la membrana citoplasmàtica es produeix a través d'un transportador de tipus ABC (ATP- binding cassette) i per tant no actua la proteïna Wzx. Fins el que es coneix actualment, la formació dels polisacàrids O que segueixen aquesta ruta biosintètica (*K. pneumoniae* O3 i O5, *E. coli* O8,..) s'inicia amb la col·locació per part d'un homòleg de la proteïna WecA d'un residu de GlcNAc en el und-P. El

und-PP-GlcNac generat actua com a encebador per a l'extensió de la cadena. En un segon pas, una glicosiltransferasa específica del polisacàrid O afegeix un adaptador a la GlcNac a partir del qual s'entendrà la cadena. Ambdós sucres, iniciador i adaptador, han estat detectats a les regions d'unió amb el nucli en els LPS estudiats. L'extensió es produeix per la transferència seqüencial dels residus monosacàridics a l'extrem no reductor de l'acceptor unit al und-PP. Tot el mecanisme requereix la participació d'una sola molècula de und-P per cadena, per la qual cosa el reciclatge d'aquesta molècula no és un factor limitant, i per tant, a diferència de la ruta Wzy-dependent, aquest procés no és inhibit per bacitracina (Raetz i Whitfield, 2002).

L'exportació de l'antigen O complet al periplasma té lloc a través d'un transportador ABC-dependent que està format per dos components: una proteïna integral de membrana anomenada Wzm i una proteïna hidrofílica que conté un domini d'unió a l'ATP, anomenada Wzt. Actualment hi ha molts interrogants sobre el mecanisme d'acció d'aquest transportador però s'ha suggerit que la hidròlisi de l'ATP podria comportar un canvi conformacional a la proteïna Wzt que permetria la seva inserció a la membrana per mitjà de la interacció amb la proteïna Wzm i d'aquesta manera introduiria el polisacàrid O en el canal (Raetz i Whitfield, 2002).

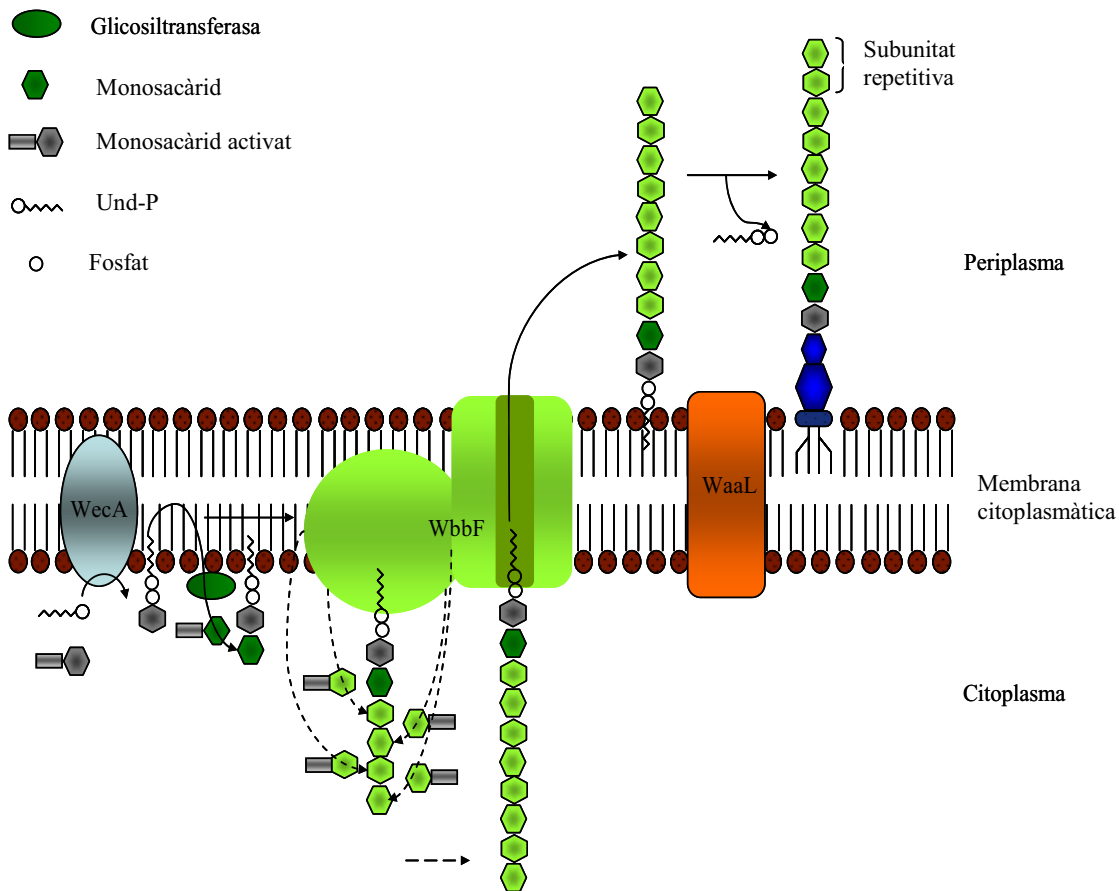
En aquesta ruta biosintètica la regulació de la longitud de les cadenes polisacàridiques no requereix una proteïna específica com la Wzz i sembla ser que hi podria estar implicat alguna mena de mecanisme de competició entre les activitats d'exportació i extensió de la cadena (Raetz i Whitfield, 2002). D'altra banda, una característica de molts antigens O que segueixen aquesta ruta biosintètica és la presència d'uns residus específics terminals (Vinogradov *et al.*, 2002) que podrien indicar la presència d'algun sistema de regulació particular pel qual la seva incorporació a la cadena aturés l'elongació i iniciés el procés d'exportació (Raetz i Whitfield, 2002).



**Figura 1.16.** Esquema del sistema de biosíntesi de l'antigen O transportador ABC-dependent

El polímer complet sintetitzat al citoplasma és exportat al periplasma per un mecanisme transportador ABC-dependent. El creixement de l'antigen O es produeix per l'extrem no reductor i únicament s'usa una molècula und-P per cadena sintetitzada

- **Sistema sintasa-dependent** (veure Figura 1.17): Actualment l'únic antigen O que es coneix que es sintetitza per aquesta via és l'antigen O:54 de *S. enterica* serovar Borreze que consisteix en un homopolímer de poli-*N*-acetilmanosamina (Keenleyside i Whitfield, 1996). La seva síntesi s'inicia per la proteïna WecA que uneix un primer residu d'acetilmanosamina (ManNAc) al und-PP i continua amb l'acció de la transferasa WbbE que uneix un segon residu de ManNAc. A continuació, intervé la proteïna integral de membrana WbbF, que sembla ser que podria actuar com una sintasa amb una doble funció, estenent la cadena polisacàridica i simultàniament, exportant la cadena polisacàridica a l'espai periplàsmic on té lloc la lligació amb el complex lípid A – nucli.



**Figura 1.17.** Esquema del sistema de biosíntesi de l'antigen O sintasa- dependent

El procés s'inicia amb l'actuació de WecA que afegeix un residu de ManNAc al und-PP, posteriorment WbbE transfereix un nou residu de ManNAc i la proteïna WbbF s'encarrega de sintetitzar el resta de cadena. Aquesta última proteïna també és l'encarregada de transportar el polisacàrid al periplasma on serà lligat al lípid A – nucli per la proteïna WaaL

En les tres rutes biosintètiques, l'undecaprenol unit a l'antigen O complet que està a l'espai periplàsmic és unit covalentment al complex lípid A – nucli prèviament format a través d'una reacció de lligació en la que hi estaria involucrada la lligasa WaaL (veure secció 1.2.4.2.4 *Lligació del polisacàrid O a l'acceptor lípid A-nucli*). El mecanisme exacte de translocació pel qual les molècules de LPS sencer travessen el periplasma i s'ubiquen a la membrana externa és encara desconegut. Sembla però probable que el sistema de translocació pel LPS pugui implicar funcions generals d'assemblatge de la membrana externa en la cèl·lula i que altres mecanismes coneguts com la proteïna TolA puguin també estar-hi involucrats (Raetz i Whitfield, 2002).

### 1.2.5.3 Organització genètica

En general, els enzims que estan implicats en la biosíntesi dels antígens O estan codificats per gens localitzats a l'agrupació gènica coneguda com *wbb* (antigament *rfb*). La majoria d'aquests sistemes estan localitzats en el cromosoma però hi ha algunes excepcions, com en el cas de l'antigen O:54 de *S. enterica*, on els enzims necessaris per la seva biosíntesi estan codificats per gens localitzats en un plasmidi (Keenleyside i Whitfield, 1996). D'altra banda, els antígens O poden patir algunes modificacions estructurals del tipus glicosilacions o acetilacions no-estequiomètriques, on hi estan involucrats enzims que estan codificats per gens localitzats a bacteriòfags lítics o críptics. Aquests tipus de modificacions estructurals reben el nom de seroconversions i tenen un paper molt important en la modulació de l'antigenicitat de la cadena lateral (Raetz i Whitfield, 2002).

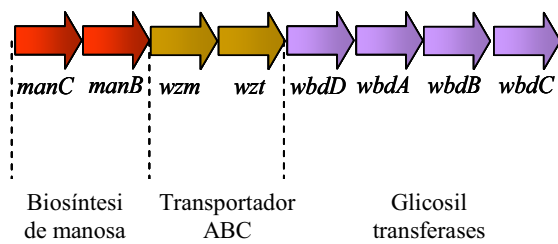
Actualment es coneixen diverses agrupacions gèniques *wbb* de bacteris diferents. El nombre de gens que inclouen aquestes agrupacions és força variable en funció de la composició i complexitat de l'antigen O que codifiquen, de manera que la diversitat estructural dels antígens O queda reflectida en un elevat polimorfisme genètic. Tot i així, totes les agrupacions gèniques *wbb* codifiquen per enzims implicats en la síntesi de nous precursors monosacàrids activats, glicosiltransferases que sintetitzen l'antigen O, i enzims requerits per als processos d'exportació. Dins d'una agrupació gènica *wbb* hi ha gens bastant conservats i d'altres que són molt variables. Per exemple, els gens implicats en la biosíntesi de monosacàrids activats estan molt més conservats que els que codifiquen per les glicosiltransferases implicades en la polimerització.

La majoria dels operons *wbb* sembla que s'expressen constitutivament i sovint es troben precedits per un JUMPstart amb una seqüència *ops*, que podria indicar l'existència d'un mecanisme d'antiterminació (Raetz i Whitfield, 2002). Es coneix un cas, en *Yersinia enterocolitica* O:3, on l'expressió de l'antigen O està regulada *in vitro* per la temperatura a través d'un sistema repressor que està localitzat fora de l'agrupació *wbb* (Skurnik and Bengoechea, 2003).

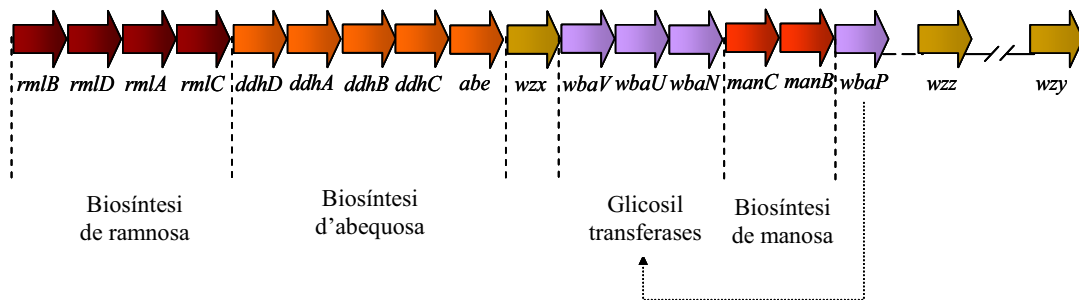
A mode d'exemple, a la Figura 1.18 s'inclouen les agrupacions gèniques *wbb* de tres bacteris que presenten vies de síntesi diferents per als seus antígens O:

- l'agrupació gènica *wbb* de *Escherichia coli* O9 (Kido *et al.*, 1995), com exemple d'antigen O homopolisacàridic sintetitzat via transportador ABC-depenent,
- l'agrupació gènica *wbb* de *Salmonella enterica* sv Typhimurium O4 (Liu *et al.*, 1995) com exemple d'antigen O heteropolisacàridic sintetitzat via Wzy-depenent,
- l'agrupació gènica *wbb* de *Serratia marcescens* N28b O4 (Saigí *et al.*, 1999) que és la soca utilitzada en aquest treball, com un exemple particular d'un antigen O heteropolisacàridic però sintetitzat via transportador ABC- depenent.

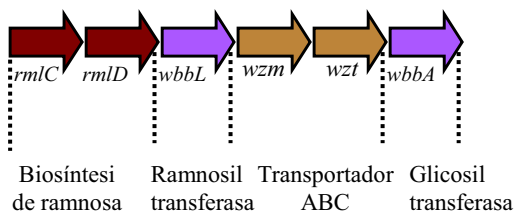
Agrupació gènica *wbb* de *Escherichia coli* O9 (Kido *et al.*, 1995)



Agrupació gènica *wbb* de *Salmonella enterica* sv. Typhimurium O4 (Liu *et al.*, 1995)



Agrupació gènica *wbb* de *Serratia marcescens* N28b O4 (Saigí *et al.*, 1999)



**Figura 1.18.** Organització de les agrupacions gèniques *wbb* de *E. coli* O9, *S. enterica* sv. Typhimurium O4 i *S. marcescens* N28b O4 com exemples d'organitzacions gèniques d'un antigen O homopolisacàridic sintetitzat via transportador ABC- depenent, d'un antigen O heteropolisacàridic sintetitzat via Wzy-depenent i d'un antigen O heteropolisacàridic sintetitzat via transportador ABC- depenent, respectivament

En color marró clar s'indiquen els gens que codifiquen pels diferents sistemes de transport, en lila s'indiquen les glicosiltransferases i en vermell, marró fosc o taronja els gens involucrats en la síntesi dels diferents precursors activats

### 1.2.6 EL LIPOPOLISACÀRID COM A DIANA TERAPÈUTICA

L'eficàcia clínica de molts antibiòtics està actualment amenaçada per l'aparició de bacteris patògens amb resistències múltiples als antibiòtics i per tant, es fa necessari disposar de nous compostos antibacterians que puguin actuar per diferents mecanismes d'acció que evitin els mecanismes de resistència adquirits pels bacteris.

Els lipopolisacàrids són glicolípidis amfifílics, que es troben situats a la capa més externa de la membrana externa dels bacteris gramnegatius. Gràcies a les seves peculiars característiques estructurals, els LPSs són els principals contribuïdors en la permeabilitat selectiva i en la funció de barrera que exerceix la membrana externa. L'interès del LPS com a diana per al desenvolupament de nous compostos antimicrobians i/o vacunes recau tant en el paper essencial que juga en el manteniment de la integritat de la membrana externa (i consegüentment de la viabilitat dels bacteris gramnegatius) com en la capacitat que té d'induir diverses accions biològiques i immunològiques en l'hoste, exercint una acció endotòxica que està altament relacionada amb la seva complexitat estructural.

En les anteriors seccions s'ha donat una visió general del coneixement actual que es té de l'estructura química d'aquestes molècules complexes, on s'han fet notables avenços en els últims anys. En aquest sentit, els estudis estructurals que actualment s'estan duent a terme amb un gran nombre de bacteris adquireixen rellevant importància per tal de poder establir relacions estructura- activitat i per tant, conèixer quines estructures específiques juguen un paper crític en la virulència bacteriana. De la mateixa manera, el millor coneixement de les rutes biosintètiques d'aquestes molècules té també un gran interès en l'àmbit clínic perquè obre portes a la síntesi de nous compostos antimicrobians. Precisament, el principal avantatge de considerar la biosíntesi del LPS com a diana per al desenvolupament de nous antibiòtics és el fet que aquesta molècula no es troba en l'hoste i que per altra banda, està bastant ben conservada entre diversos bacteris que tenen certa rellevància clínica. Per tant, si és té en compte que el lípid A-Kdo és l'element més conservat del LPS, cal esperar que les dianes terapèutiques més viables puguin ser aquelles relacionades amb la seva biosíntesi (Yethon i Whitfield, 2001).



En línies generals, els lipopolisacàrids es divideixen en tres regions estructuralment diferenciades (polisacàrid O, nucli i lípid A) que presenten diferent grau de variabilitat estructural. Aquest fet condiciona lògicament les possibilitats de cada regió d'esdevenir dianes terapèutiques i l'estratègia a seguir.

Considerant tots aquests antecedents, aquesta secció es planteja com una revisió general, en base al coneixement actual, de les diverses possibilitats que ofereix cada regió del LPS d'esdevenir diana terapèutica (potencial o en estudi) per a la generació de nous compostos antimicrobians o vacunes.

### 1.2.6.1 El lípid A

El lípid A és l'element més conservat del LPS i és el principal responsable de la unió del LPS als receptors de diverses dianes cel·lulars, fet que desencadena la gran varietat d'efectes biològics (i tòxics) que s'observen en els mamífers durant les infeccions per bacteris gramnegatius. Es per això que el lípid A rep el nom d'endotoxina (Galanos *et al.*, 1985) (veure secció 1.2.3 *El lípid A*).

#### 1.2.6.1.1 Anàlegs del lípid A amb acció antagonista

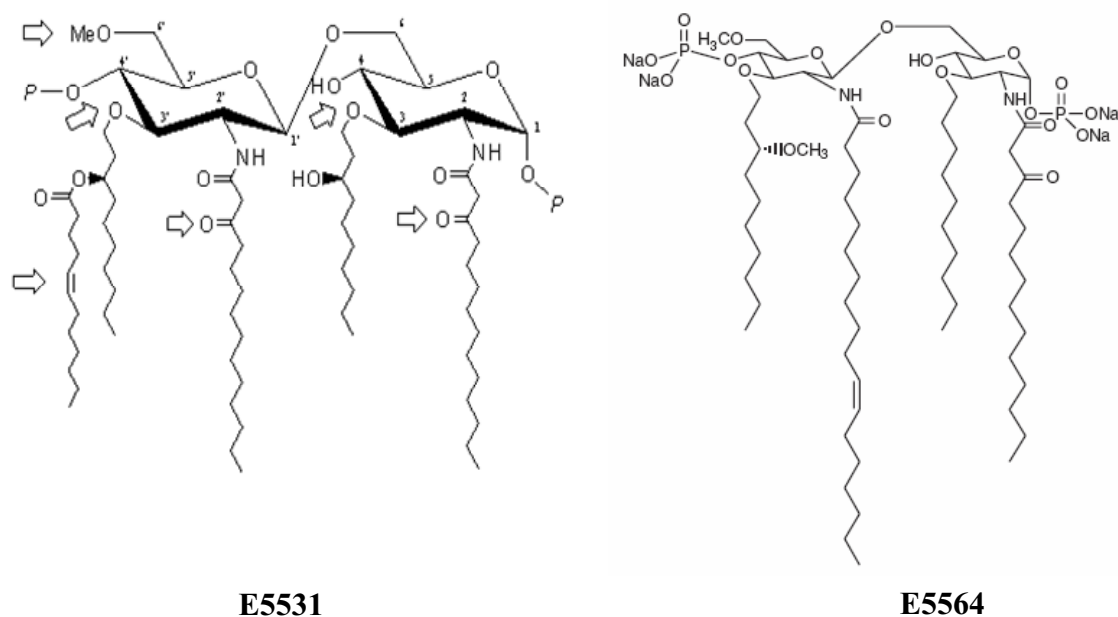
Tot i ser l'element estructural més conservat del LPS poden existir modificacions a l'estructura estàndard. Aquest fet té gran interès pel sector farmacèutic, ja que aquestes petites modificacions estructurals poden convertir el LPS des d'un mediador actiu de la inflamació a un potent **antagonista**. Per exemple, alguns precursors del lípid A i certs lípids A pentaacilats (enlloc dels estàndard hexaacilats) que presenten de manera natural certes espècies de *Rhodobacter* són capaços d'inhibir l'activitat d'estimulació cel·lular que provoca l'endotoxina (Golenbock *et al.*, 1991; Takayama *et al.*, 1989).

Prenent com a model les característiques estructurals del lípid A no tòxic de *Rhodobacter capsulatus*, Christ i col·laboradors varen sintetitzar l'any 1995 un antagonista del lípid A que es coneix com a compost **E5531** (Christ *et al.*, 1995). Tal i com es pot observar a la Figura 1.19, l'estructura del compost antagonista E5531 correspon bàsicament a la mateixa estructura que la del lípid A de *Rhodobacter capsulatus*, amb la diferència que en el compost E5531 la posició 6' del disacàrid de

glucosamina està ocupada per un grup metilèter que facilita la purificació del compost i els residus 3 i 3' estan units per enllaç èter, en comptes d'enllaços èster que són menys estables a la hidròlisi. En els estudis *in vitro*, el compost E5531 va demostrar una potent activitat antagonista contra l'activació cel·lular induïda per LPS en una gran varietat de sistemes, mentre que *in vivo*, el compost E5531 va protegir als ratolins de la mort induïda per LPS, sense mostrar cap activitat agonista del LPS (Christ *et al.*, 1995). Aquesta potent activitat antagonista es posà també de manifest en un estudi clínic, doble cec i controlat per placebo que es realitzà en 32 voluntaris sans als quals se'ls hi administrà per infusió intravenosa dosis de fins a 1000 µg de E5531 i un bolus de 4 ng/kg de LPS. En aquest estudi, l'antagonista E5531 fou capaç de bloquejar completament els efectes del LPS a una dosi de 250 µg, essent aquest efecte antagonista dosi-depenent (Bunnell *et al.*, 2000).

Posteriorment, es desenvolupà el compost **E5564** (veure Figura 1.19), un antagonista del LPS de segona generació que correspon a un anàleg del lípid A del bacteri no tòxic *Rhodobacter sphaeroides*. Aquest compost E5564 va demostrar una activitat antagonista dels efectes bioquímics i fisiològics del LPS encara més potent que el E5531 en diversos models *in vitro* e *in vivo* (Mullarkey *et al.*, 2003) i té l'avantatge de ser molt més soluble que el E5531, la qual cosa facilita la seva purificació i formulació. Aquest antagonista del LPS, el compost E5564, es troba actualment en desenvolupament clínic com a possible agent terapèutic per al tractament del xoc sèptic, amb resultats fins ara força esperançadors. Diversos estudis clínics de fase I (Wong *et al.*, 2003; Lynn *et al.*, 2004; Rossignol *et al.*, 2004) han permès definir un perfil farmacodinàmic, farmacocinètic i de seguretat per aquest compost E5564 (*Eritoran*, Eisai Medical Research Inc.). Actualment es troba en la fase de reclutament un estudi clínic de fase III, controlat per placebo, en el qual està planejat que hi participin centres d'uns 250 llocs dels EEUU, Canada, Europa, Austràlia, Sud-àfrica, Xile, Brasil, Mèxic entre d'altres, amb l'objectiu de confirmar l'eficàcia del compost E5564 (*Eritoran*) en el tractament de la sepsis severa (*US National Institutes of Health*; disponible a <http://clinicaltrials.gov/ct>). Aquest estudi de clínic de fase III es proposa gràcies als resultats disponibles de l'estudi clínic de fase II conduït en 293 pacients randomitzats en tres grups (A: placebo; B: tractament de 6 dies per infusió i.v. amb 105mg E5564 dos cops al dia; C: tractament de 6 dies amb 45mg de E5564 per infusió i.v dos cops al dia), en el què es va posar de manifest l'eficàcia del tractament amb E5564 a la dosi més alta

en la reducció de la mortalitat per sepsis severa en comparació amb el tractament amb placebo (*Eisai Medical Research Inc.*; disponible a <http://www.eisai.com>).



**Figura 1.19.** Estructura química dels compostos no-tòxics E5531 i E5564 amb acció antagonista del LPS

#### 1.2.6.1.2 *Inhibidors de la biosíntesi del lípid A com a potencials fàrmacs antimicrobians*

Tenint en compte el doble paper que juga el lípid A tant en el manteniment de la integritat i funcionalitat de la membrana externa com en la capacitat d'actuar com endotoxina, cal pensar que molècules petites dissenyades per bloquejar la seva síntesi poden resultar molt eficaces com a antibiòtics des de diferents punts de vista (Yethon i Whitfield, 2001):

1. el lípid A és essencial per la viabilitat de la majoria de bacteris gramnegatius i per tant, agents inhibitoris haurien de ser bactericides per a la majoria de bacteris gramnegatius (de fet, la inhibició de qualsevol dels primers set passos de la biosíntesi de *E. coli* resulta en una pèrdua de la viabilitat cel·lular (Raetz 1996; Raetz i Whitfield, 2002));
2. nivells baixos de lípid A poden comprometre la funció de barrera de la membrana externa, augmentant la permeabilitat als antibiòtics i en conseqüència, sensibilitzar

els bacteris a l'acció d'altres antibiòtics que en condicions habituals no poden penetrar la membrana externa;

3. nivells baixos de lípid A disminueixen l'amenaça d'una resposta immunitària severa de l'hoste que pot conduir al xoc sèptic.

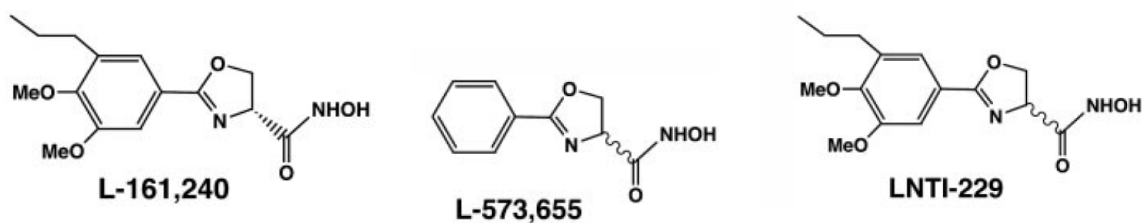
Des del punt de vista de la recerca de nous compostos antibacterians, hi ha dues reaccions del procés biosintètic del LPS (veure secció 1.2.3.2 *Biosíntesi del lípid A*) que han estat estudiades com a potencials dianes terapèutiques: la reacció inicial d'acilació de la UDP-GlcNAc per l'enzim LpxA i el pas de deacilació catalitzat per l'enzim LpxC.

Amb l'objectiu de facilitar un disseny racional d'inhibidors de l'enzim LpxA, s'han fet diversos estudis de cristal·lització proteica que han permès conèixer la seva estructura tridimensional. Tanmateix, s'han realitzat diversos estudis de mutagènesi dirigida per tal d'accelerar el disseny d'inhibidors (Yethon i Whitfield, 2001). Recentment s'ha identificat el compost **peptídic 920** que és un potent inhibidor de *E. coli* LpxA ( $K_i = 50$  nM). Aquest compost ofereix un interessant punt de partida per a la síntesi de nous inhibidors de l'enzim LpxA que siguin més potents, travessin les membranes i no siguin susceptibles a la proteòlisi (Williams *et al.*, 2006).

Per contra, molts més progressos s'han fet en l'estudi com a diana terapèutica de l'enzim LpxC, que catalitza la primera reacció irreversible en la biosíntesi del lípid A (veure secció 1.2.3.2 *Biosíntesi del lípid A*). L'enzim LpxC és un zinc-metal·loenzim que conté un lloc d'unió al  $Zn^{2+}$  que és requerit per a la seva activitat catalítica però que és diferent del de la resta de zinc-metal·loenzims i per tant, permet el disseny d'antibiòtics segurs que no interfereixin amb les zinc metal·loamidases o deacetilases de l'hoste (Yethon i Whitfield, 2001). A més, si es té en compte que l'enzim LpxC és un enzim altament conservat entre els bacteris gramnegatius, cal pensar que ens podem trobar davant d'una prometedora diana terapèutica (Trent, 2004).

En els últims anys s'han descrit un nombre considerable de compostos que inhibeixen l'enzim LpxC de *E. coli* però també d'altres bacteris gramnegatius (Onishi *et al.*, 1996; Jackman *et al.*, 2000). Els primers inhibidors de l'enzim LpxC que es varen identificar foren compostos derivats de l'àcid hidroxàmic unit a un anell de 2-feniloxazolina

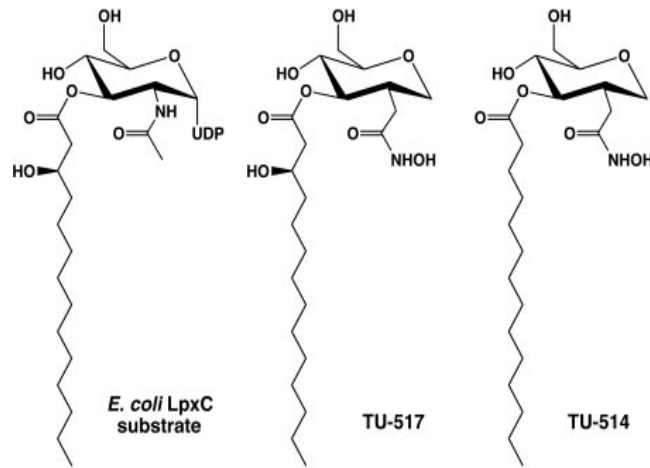
(Onishi *et al.*, 1996), l'estructura dels quals es mostra a la Figura 1.20. D'aquests inhibidors, el més potent és el que presenta un grup propil i dos grups metoxi units a la fracció fenil i que es coneix com a compost **L-161.240** (Onishi *et al.*, 1996). Aquest inhibidor té una constant d'inhibició  $K_i \approx 50$  nM, és bactericida contra *E. coli* a una mínima concentració inhibidora de 1 µg/ml (comparable a l'ampicil·lina) i s'ha demostrat que té la capacitat de curar els ratolins prèviament infectats amb una dosi letal de *E. coli* (Onishi *et al.*, 1996). No obstant, tot i que presenten activitat bactericida contra soques de *Enterobacter* i *Klebsiella*, no són actius contra *Pseudomonas* (Onishi *et al.*, 1996; Jackman *et al.*, 2000), ja que aquests compostos no són capaços d'inhibir l'enzim LpxC de *Pseudomonas*, entre d'altres.



**Figura 1.20.** Estructures dels compostos inhibidors L-161.240, L-573.655 i LNT-229 (extret de Jackman *et al.*, 2000)

L'estructura base d'aquests compostos correspon a derivats de l'àcid hidroxàmic unit a un anell de feniloxazolina i presenten activitat inhibidora de l'enzim LpxC de *E. coli*, *Enterobacter* i *Klebsiella*. El compost LNTI-229 correspon a la forma racèmica del compost L-161.240

Posteriorment, amb l'objectiu d'ampliar l'espectre d'activitat antibacteriana, es va desenvolupar una altra classe de compostos inhibidors que incorporaven el grup funcional hidroxamat, que és necessari per l'activitat inhibidora de l'enzim LpxC, o el grup fosfinat als anàlegs estructurals del substrat fisiològic de l'enzim LpxC. El més potent d'aquests compostos és el **TU-517** (veure estructura a la Figura 1.21), amb una constant d'inhibició  $K_i \approx 190$  nM. Aquests compostos mostren una forta activitat inhibidora *in vitro* contra un ampli espectre d'enzims LpxC de bacteris molt diferents però en canvi, no presenten activitat bactericida bé perquè no entren a les cèl·lules bacterianes, o bé perquè són metabolitzats o exportats ràpidament (Jackman *et al.*, 2000).



**Figura 1.21.** Estructures dels compostos inhibidors de LpxC anàlegs del substrat TU-517 i TU-514 (extret de Jackman *et al.*, 2000)

L'estructura bàsica d'aquests compostos correspon a la dels anàlegs del substrat fisiològic de l'enzim LpxC que porten incorporat un grup hidroxamat. Aquests compostos presenten forta activitat inhibidòria *in vitro* sobre un ampli espectre d'enzims LpxC però no tenen activitat bactericida significativa

En els últims anys, s'han identificat altres famílies de compostos inhibidors de l'enzim LpxC. Un exemple són els compostos derivats de sulfonamides dels àcids  $\alpha$ -R-hidroxiàmic com **BB-78484** i **BB-78485**, que han demostrat tenir una potent activitat inhibidòria de l'enzim LpxC en diferents espècies bacterianes a més d'exercir una acció bactericida contra *E. coli* (Clements *et al.*, 2002). Recentment, el nou compost **CHIR-090**, que és un àcid N-aril-L-treonina hidroxiàmic, ha demostrat tenir una forta activitat inhibidòria de l'enzim LpxC d'un ampli ventall de bacteris gramnegatius patògens com *Pseudomonas*, *Neisseria meningitidis* i *Helicobacter pylori* a més d'exercir una excel·lent activitat antibiòtica contra *Pseudomonas* i *E. coli*, la qual cosa el situa com una excel·lent diana per al desenvolupament de nous antibiòtics (Barb *et al.*, 2007).

Com s'ha dit anteriorment, el lípid A, malgrat tenir una estructura bastant conservada, pot presentar diverses modificacions estructurals tant en el patró d'acilació com en els grups fosfats units a la glucosamina. Com s'ha vist a la secció 1.2.3 *El lípid A*, els bacteris que presenten aquestes modificacions en els grups fosfats són resistent als antibiòtics catiónics com la polimixina, fet que es podria explicar per la reducció de la càrrega negativa del lípid A i com a resultat, una disminució de la interacció electrostàtica entre la polimixina i la membrana externa. Per tant, inhibidors d'aquests enzims que intervenen en les modificacions de l'estructura estàndard del lípid A poden també tenir interès terapèutic.

#### 1.2.6.1.3 *Altres aplicacions terapèutiques*

Com s'ha vist anteriorment, petites modificacions en els grups aciloxiacil del lípid A poden tenir grans implicacions en la toxicitat de la molècula. S'ha observat que mutants de lípid A que tenen un nombre reduït de cadenes acil secundàries tenen atenuada la seva capacitat d'activar els macròfags humans mantenint una activitat adjuvant similar a la de la soca salvatge i això té un potencial interès per al desenvolupament de **noves vacunes** (Raetz i Whitfield, 2002). Així, s'estan estudiant mutants de les aciltransferases finals (LpxL i LpxM) de varis patògens com *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *E. coli* i *Salmonella* per a ser utilitzats en el desenvolupament de noves vacunes (Trent, 2004).

Una altra aplicació terapèutica que té el LPS, i particularment el lípid A, és l'ús com **adjuvant** en vacunes, com a substància que augmenta la immunogenicitat. Des de fa temps se sap que el LPS és un potent adjuvant quan s'administra amb combinació amb antigens proteics. No obstant, l'ús del LPS com a adjuvant està limitat per la seva alta toxicitat. Això va comportar la recerca de formes naturals o modificades del LPS que tinguessin reduïda la capacitat endotòxica però que mantinguessin una forta activitat com a adjuvants (Goldstein *et al.*, 1992). Així, s'han desenvolupat nombrosos derivats del lípid A amb acció agonista dels receptors TLR4 per al seu ús com **adjuvants** però també com a **immunomoduladors** per ells sols degut a la seva capacitat d'estimular tant la resposta immune innata com l'adaptativa (Dougan i Hormaeche, 2006). Potser l'anàleg derivat que ha progressat més en l'àmbit clínic és el monofosforil lípid A, comercialitzat com a MPL<sup>®</sup> (Corixa; actualment propietat de GlaxoSmithkline). MPL<sup>®</sup> és un derivat del lípid A de *Salmonella minnesota* que reté bona part de l'activitat immunoestimulatòria però en canvi té significativament reduïda la seva toxicitat quan es compara amb el LPS natural. Està compost d'una barreja de diferents congèneres compostos del disacàrid de glucosamina unit per enllaç  $\beta(1' \rightarrow 6)$  fosforilat a la posició 4' i substituït a les posicions 2,2' i 3,3' per varis grups hidroxiacil o aciloxiacil donant lloc a un total de entre 3 i 6 grups acil. El MPL<sup>®</sup> ha demostrat ser segur en nombrosos estudis no clínics i clínics. Aquest compost, sol o en combinació amb altres adjuvants, ha demostrat ser eficaç com a adjuvant de vacunes en més de 120000 dosis administrades en humans i forma part de formulacions de vacunes per a diversos tipus de patologies com al·lèrgies o infeccions causades per Hepatitis B, Herpesvirus o

*Plasmodium falciparum* (Dougan i Hormaeche, 2006). S'estan també investigant una altre classe de compostos sintètics derivats del lípid A, els aminoalquil glucosaminida 4-fosfat, específicament dissenyats per a interaccionar amb el receptor TLR4 i que estan donant resultats força esperançadors tant per al seu ús com adjuvants o com agents terapèutics capaços de desencadenar una protecció no específica contra un ampli ventall de bacteris patògens (Dougan i Hormaeche, 2006).

En immunologia, el lípid A s'ha utilitzat també en moltes formulacions de **liposomes** com a adjuvant per a induir l'activitat humoral enfront diversos antigens vehiculats per liposomes. En alguns casos, aquesta resposta humoral no es veu incrementada per la presència de cadascun dels components (lípid A o liposoma) per separat (Verma *et al.*, 1992). En diversos estudis clínics aquestes formulacions amb liposomes que tenen el lípid A com a potent adjuvant i un antigen encapsulat o unit a la superfície han demostrat ser segures, apirògenes i capaces d'induir un nivell molt alt d'anticossos (Alving *et al.*, 1995). Per tant, els liposomes que contenen el lípid A representen una alternativa eficaç i segura com a adjuvants per al desenvolupament de vacunes humanes per diverses patologies (Neidhardt *et al.*, 2004).

#### **1.2.6.2 El nucli del LPS**

El nucli és la regió que uneix el lípid A amb el polisacàrid O. En els bacteris que presenten lipopolisacàrids de tipus S, aquesta regió es divideix alhora en dues regions: el nucli extern, força variable i el nucli intern, que correspon a una regió molt més conservada i que té elements característics, com la presència de residus de Kdo, que és un element comú en la major part de bacteris gramnegatius (veure secció 1.2.4 *El nucli del LPS*).

Considerant l'heterogeneïtat estructural que s'observa en les estructures del nucli extern de diversos bacteris gramnegatius, hom creu que el potencial desenvolupament de nous antibiòtics d'ampli espectre dirigits contra la biosíntesi d'aquesta regió és en principi força limitat, tot i que aquesta regió pugui ser útil com a diana terapèutica per a un específic i reduït grup de bacteris.



Per contra, el nucli intern és una estructura força conservada, fins i tot entre bacteris llunyanament relacionats, que presenta elements estructurals comuns i que a més són essencials per a la majoria de bacteris. Per això, aquesta regió del nucli del LPS ha centrat molt més interès de la comunitat científica tant per al desenvolupament de nous compostos antimicrobians com per a la generació d'antigenes comuns protectors per al desenvolupament de vacunes (Yethon i Whitfield, 2001).

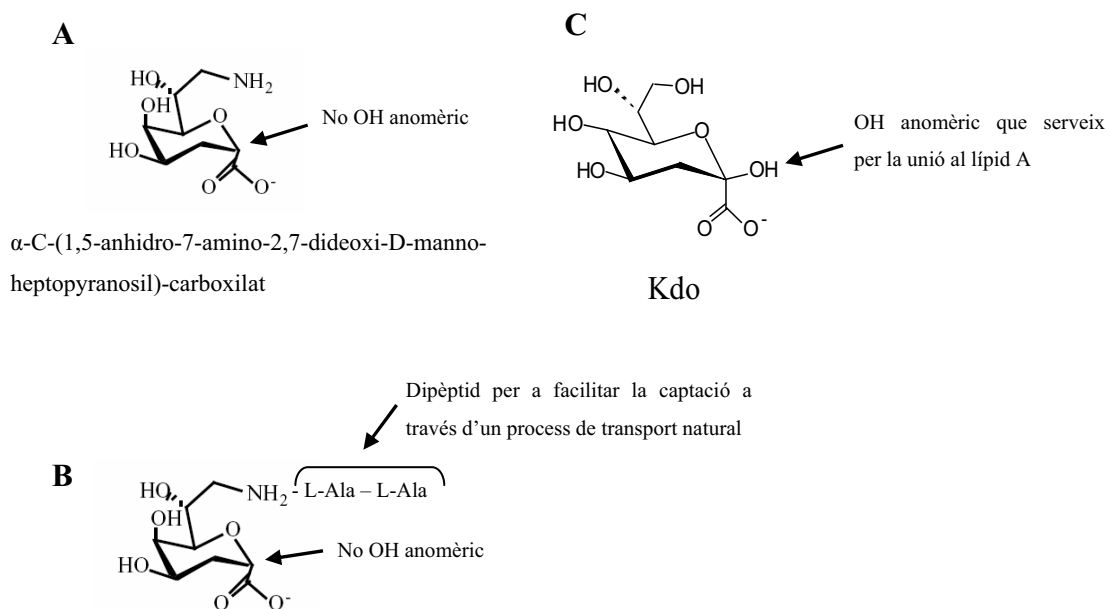
#### *1.2.6.2.1 La biosíntesi del nucli com a diana per al desenvolupament de nous compostos antibacterians*

Com ja s'ha vist anteriorment a la secció *1.2.3.2 Biosíntesi del lípid A*, la biosíntesi del nucli s'intercala amb el final de la biosíntesi del lípid A, ja que, salvant algunes excepcions, l'addició per l'enzim WaaA dels dos primers residus del nucli, que són residus de Kdo, és anterior a l'inici dels passos d'acilació final del lípid A.

Mentre que fins ara no s'han desenvolupat compostos capaços d'interferir directament en l'acció de l'enzim WaaA, sí que s'han produït notables avenços en el disseny de compostos capaços d'inhibir la biosíntesi del precursor nucleotídic del Kdo, que és el compost CMP-Kdo. La ruta biosintètica d'aquest precursor és força coneguda i s'ha descrit prèviament (veure secció *1.2.4.2 Biosíntesi de la regió del nucli*). L'interès terapèutic de buscar inhibidors de la biosíntesi d'aquest precursor recau en el fet que el Kdo és un element clau en la viabilitat bacteriana i al mateix temps, no està present en els mamífers. En efecte, en els últims anys s'han desenvolupat un nombre important d'inhibidors dirigits a bloquejar la biosíntesi del Kdo (Yethon i Whitfield, 2001).

Els primers **inhibidors de la biosíntesi del Kdo** que es varen estudiar foren 2-deoxi anàlegs de  $\beta$ -Kdo (veure Figura 1.22, compost A) que s'utilitzaren com a **inhibidors competitiu de l'enzim CMP-Kdo sintetasa** codificat per l'enzim *kdsB* (Goldman *et al.*, 1987; Hammond *et al.*, 1987). Aquests 2-deoxi anàlegs del Kdo però no podien atravesar de manera eficaç les envoltures cel·lulars dels bacteris. Per tal d'incrementar la seva penetració cap a l'interior de la cèl·lula on hi ha l'enzim diana, aquests compostos originals foren derivatitzats amb pèptids curts (veure Figura 1.22, compost B) a fi de promoure la seva captació per mitjà de permeases d'oligopèptids que es localitzen a la membrana citoplasmàtica. Subseqüentment, el producte derivatitzat amb el pèptid era

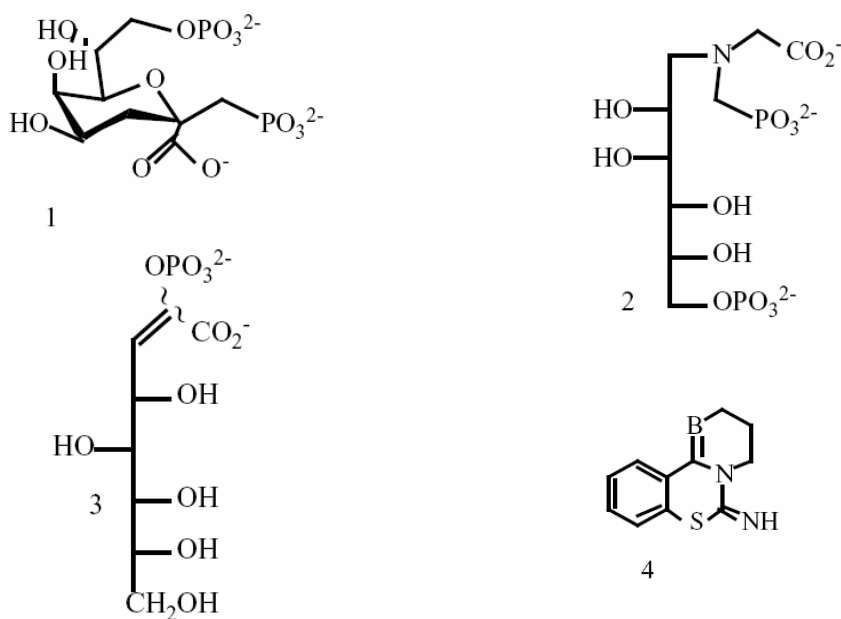
metabolitzat en el citoplasma per les aminopeptidases bacterianes endògenes i així s'alliberava la forma activa de l'inhibidor (Goldman *et al.*, 1987; Hammond *et al.*, 1987). El problema és que aquest mecanisme de captació i processament comportava amb excessiva facilitat mecanismes de resistència (per ex. mutacions en el sistema de transport) i potser per aquesta raó encara no s'ha trobat una aplicació clínica per aquests compostos (Yethon i Whitfield, 2001). Alternativament, per a facilitar l'entrada dels inhibidors de l'enzim CMP-Kdo sintetasa a l'interior de la cèl·lula es va provar d'esterificar-los amb 8-(hidroximetil)-1-naftil metil disulfid. El producte esterificat era capaç d'entrar a l'interior cel·lular i un cop allà, a través de la reducció del grup sulfid es generava un anió tiolat que desencadenava una dealquilació esterolítica intramolecular que comportava l'alliberament de l'inhibidor (Yethon i Whitfield, 2001). Pel que es coneix, no s'han fet progressos en desenvolupament d'aquest tipus d'inhibidors.



**Figura 1.22.** Estructures químiques dels inhibidors de la biosíntesi del Kdo, que inhibeixen l'enzim CMP/Kdo sintetasa  
Compost A: 2-deoxi anàleg del Kdo; Compost B: anàleg dipèptid del Kdo; Compost C: Kdo

Més recentment, s'han desenvolupat inhibidors de la biosíntesi del Kdo dirigits a **bloquejar l'activitat de l'enzim Kdo-8-fosfat (Kdo8P) sintasa**, codificat per l'enzim *kdsA*, que catalitza la reacció de condensació del fosfoenolpiruvat i l'arabinosa 5- fosfat, que és la primera reacció irreversible de la síntesi del Kdo (Yethon i Whitfield, 2001). Els primers inhibidors de l'enzim Kdo8P sintasa es van dissenyar com anàlegs bisubstrat

(compost 2, Figura 1.23) o anàlegs d'estat transicional (compostos 1 i 3, Figura 1.23) en un mecanisme de reacció enzimàtica que inicialment s'assumí que implicava un intermedi cíclic, però que actualment es creu que implica un intermedi lineal. Posteriorment, a partir d'un cribatge realitzat amb una biblioteca de 150.000 compostos, es va identificar el compost PD 404182 (compost 4, Figura 1.23) que presentava una activitat inhibidora molt potent *in vitro* ( $K_i = 240$  pM) i que a diferència dels anteriors inhibidors era un compost estable i relativament hidrofòbic. En contrast però amb la forta activitat inhibidora *in vitro* sobre la Kdo8P sintasa, aquest compost *in vivo* va demostrar una baixa capacitat d'inhibir *in vivo* el creixement bacterià suggerint que o bé presenta una molt baixa biodisponibilitat o bé és metabolitzat o ràpidament exportat de la cèl·lula bacteriana (Birck *et al.*, 2000). Actualment s'estan duent a terme estudis que permetin establir relacions estructura-activitat per aquesta nova classe de compostos que expliquin la reduïda activitat *in vivo* i que permetin millorar la seva capacitat d'inhibir la biosíntesi del Kdo i per extensió, el creixement bacterià.



**Figura 1.23.** Inhibidors de l'enzim Kdo8P sintasa (modificat de Yethon i Whitfield, 2001)  
 Compost 1: Anàleg d'estat transicional suposant un mecanisme de reacció on intervé un intermedi cíclic,  $K_i = 4,9$   $\mu\text{M}$ ; Compost 2: Anàleg bisubstrat,  $K_i = 3,3$   $\mu\text{M}$ ; Compost 3: Anàleg d'estat transicional suposant un mecanisme de reacció on intervé un intermedi lineal, no reportada activitat *in vitro* però baixa activitat *in vivo*; Compost 4: PD 404182 [6H-6-imino-(2,3,4,5-tetrahydropyrimido)[1,2-c]-[1,3]benzothiazine],  $K_i = 240$  pM, excel·lent activitat *in vitro* però pobre activitat *in vivo*

Una altra possible estratègia terapèutica per a inhibir la biosíntesi del nucli intern podria estar dirigida a bloquejar l'actuació seqüencial de les **heptosiltransferases** WaaC i WaaF, que són les responsables d'estendre l'oligosacàrid del nucli a partir de la molècula lípid A-Kdo<sub>2</sub> utilitzant precursors nucleotídics activats. Considerant a) l'àmplia distribució dels enzims WaaC i WaaF entre diferents espècies patògenes, b) l'elevada especificitat de la reacció que catalitzen, c) la importància de la regió de les heptoses per al manteniment de la integritat de la membrana externa d) el millor coneixement d'aquestes rutes biosintètiques adquirit en els últims anys, hom creu que els enzims WaaF i WaaC poden esdevenir potencials dianes per al desenvolupament de compostos inhibidors que puguin donar lloc a una nova classe de compostos antibacterians (Yethon i Whitfield, 2001). De la mateixa manera, la biosíntesi de l'únic precursor nucleotídic per aquestes heptosiltransferases, el compost ADP-L,D-heptosa, també podria ser una bona futura diana terapèutica (Yethon i Whitfield, 2001).

Per últim, un altre camp interessant per a futures aplicacions terapèutiques és la importància dels enzims implicats en les **modificacions del nucli intern**. Molts bacteris com *E. coli* i *Salmonella* tenen grups fosfats a la regió del nucli que són incorporats per l'acció dels enzims WaaP i WaaY (veure secció 1.2.4.2.2 *Formació del nucli intern*). Mutants de *waaP* tenen disminuïda l'estabilitat de la membrana externa, són avirulents i presenten un fenotip *deep-rough*. Fins i tot, en alguns casos com *Pseudomonas aeruginosa* l'efecte de la pèrdua d'activitat de l'enzim WaaP és encara més dramàtic ja que resulta en una pèrdua de la viabilitat del bacteri (Walsh *et al.*, 2000). Totes aquestes dades, per tant, confirmen la validesa d'aquest enzim WaaP com a potencial diana per al desenvolupament de nous antibiòtics. A més, tenint en compte que els potencials inhibidors de l'enzim WaaP desestabilitzarien la membrana externa fent-la més permeable, cal esperar que aquests inhibidors puguin també tenir aplicació terapèutica com a part integrant de còctails d'antibiòtics per tal d'afavorir la penetració d'alguns antibacterians l'ús dels quals està actualment restringit per la seva incapacitat d'atravesar la membrana externa dels bacteris gramnegatius (Yethon i Whitfield, 2001).

#### 1.2.6.2.2 *Desenvolupament de vacunes i anticossos immunoterapèutics*

L'elevada conservació estructural de la regió del nucli intern fa pensar en el seu ús potencial com a diana terapèutica per a la generació **d'anticossos immunoterapèutics** que podrien oferir una alternativa al tractament del xoc sèptic. Des de fa temps es coneix que l'antiserum obtingut després d'una immunització passiva amb LPS és capaç de conferir protecció als ratolins i conills davant d'una subseqüent càrrega de LPS. Lamentablement, aquesta protecció és altament específica per a un determinat O-serovar bacterià i per tant, invalida l'ús d'aquest antiserum per al tractament dels pacients sèptics, on la ràpida evolució de la malaltia evita poder establir el serovar del bacteri causant. En contraposició, la generació d'anticossos dirigits contra uns epítops conservats del nucli del LPS que estiguin presents en un gran nombre de bacteris gramnegatius clínicament rellevants obre les portes a una alternativa terapèutica per a la neutralització del LPS independent del O-serovar (Müller-Loennies *et al.*, 2007). La limitació principal d'aquesta estratègia és la dificultat d'obtenir anticossos que presentin una àmplia reactivitat creuada contra el LPS de diferents bacteris. Així per exemple, l'anticòs monoclonal WN1 222-5, que és capaç d'oferir protecció en models de xoc sèptic provocats per bacteris que tenen diferents tipus de LPS, té elevada reactivitat creuada contra un elevat nombre d'aïllament clínics de *E. coli* i *S. enterica* de diferents serovars, però en canvi no s'uneix als LPS de *Klebsiella* o *Pseudomonas* (Di Padova *et al.*, 1993). La identificació dels determinants estructurals que constitueixen l'epítop al qual s'hi unirà l'anticòs i dels factors que influeixen la unió és la clau per a poder identificar estructures potencialment candidates per al desenvolupament de vacunes conjugades que puguin tenir aplicació clínica en la vacunació en humans (Müller-Loennies *et al.*, 2007).

Inicialment, s'assajaren diverses **vacunes** que utilitzaven nuclis incomplets de cèl·lules bacterianes inactivades per calor de *E. coli* J5 (quimiotip Rc) i de *S. minnesota* 595 (quimiotip Re) com a immunògens actius i per a la generació d'anticossos anti-LPS per a la immunització passiva de pacients. Els resultats d'aquests estudis però donaren resultats clínics contradictoris i els antigens utilitzats no foren capaços d'induir anticossos contra bacteris clínicament rellevants. Posteriorment, es dissenyaren vacunes que utilitzaven nuclis complets de LPS de diferents bacteris incorporats a liposomes per tal d'emascarar la toxicitat del lípid A. En estudis amb conills, aquestes vacunes van

resultar ser no tòxiques, no pirogèniques i altament immunogèniques contra diversos serotips d'un nombre considerable de bacteris patògens entre els quals s'inclouen *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides fragilis* i *B. vulgatus*. Aquests resultats validen aquestes vacunes com a potencial candidates per a la prevenció o reducció de les complicacions associades al LPS en pacients que han de ser operats o amb risc elevat de patir aquest tipus de complicacions (Benett-Guerrero *et al.*, 2000). S'estan també investigant altres nuclis interns del LPS de bacteris com *Pseudomonas aeruginosa* (Stanislavsky i Lam, 1997) i *Neisseria meningitidis* (Plested *et al.*, 2003) per al seu ús com a vacunes. D'altra banda, actualment s'està estudiant en humans una vacuna composta del LPS de *E. coli* J5 detoxificat (J5dLPS) complexat amb la proteïna de membrana externa de *N. meningitidis* grup B per al tractament del xoc sèptic. Aquesta vacuna ha demostrat ser segura i capaç d'induir anticossos anti-J5dLPS en un estudi clínic pilot de fase I (Cross *et al.*, 2003, 2004).

### 1.2.6.3 L'antigen O

Els polisacàrids O específics o antígens O, que estan únicament presents en bacteris que produeixen LPS de tipus S, són polisacàrids formats per repeticions d'una unitat estructural bàsica. L'antigen O és la part més externa del LPS i al mateix temps la més immunogènica i és la regió del LPS que presenta un més alt grau de variabilitat estructural (veure secció 1.2.5 *L'antigen O*).

Tenint en compte el paper de l'antigen O en l'evasió del sistema complement, la biosíntesi de l'antigen O també presenta interessants oportunitats per al desenvolupament de noves estratègies terapèutiques perquè, encara que els antígens O presentin una enorme diversitat estructural, hi ha alguns passos força conservats en la seva ruta biosintètica. Són especialment atractius com a dianes terapèutiques els **passos més conservats de la biosíntesi de l'antigen O** que corresponen a les reaccions d'iniciació o al pas final de lligació de l'antigen O complet al nucli (Yethon i Whitfield, 2001).

Actualment, només es coneixen dues classes diferents d'enzims iniciadors: WecA i homòlegs i la família dels enzims WbaP. Els potencials inhibidors d'aquests dos enzims podrien bloquejar la biosíntesi de l'antigen O i per tant, sensibilitzar el bacteri a l'acció del sistema complement i disminuir la seva virulència. No obstant, l'ús potencial

d'aquests enzims per al disseny de noves estratègies terapèutiques encara no ha estat explorat. El pas final de lligació de l'antigen O al nucli representa també un punt interessant com a potencial diana terapèutica ja que pel que es coneix actualment, l'enzim WaaL és l'únic enzim implicat en aquest pas. Hi ha però forces aspectes del mecanisme d'acció d'aquesta molècula que encara no són prou coneguts. A més, aquests enzims WaaL són força diferents d'una espècie bacteriana a l'altra, bàsicament en la seva seqüència primària. Tots aquests aspectes dificulten, però no impedeixen, el disseny d'inhibidors d'aquests enzims que puguin tenir potencialment aplicació terapèutica en un ampli espectre de bacteris.

La peculiar localització de l'antigen O a la superfície cel·lular fa que se situï a la interfase entre el bacteri i el medi que l'envolta. Per això, l'interès científic en aquesta molècula ha estat en bona part motivat per al seu paper com a factor de virulència bacteriana i per la seva possible aplicació per al **desenvolupament de vacunes**, ja que és l'element més immunogènic del LPS (Raetz i Whitfield, 2002). Des de fa anys s'està estudiant la potencial aplicació clínica de vacunes dissenyades per a induir la producció d'anticossos contra antigens O-seroespecífics per a la prevenció d'infeccions produïdes per certs bacteris gramnegatius. Aquesta aproximació presenta uns quants inconvenients o dificultats que cal superar. En primer lloc, cal tenir en compte l'elevada diversitat química que presenten els diferents O-serovars més representatius d'un determinat bacteri a la qual s'hi ha d'afegir la diversitat existent entre alguns subtipus d'aquests O-serovars representatius, la qual cosa comporta una elevada variabilitat serològica que incrementa la complexitat d'aquestes vacunes O específiques. D'altra banda, aquestes vacunes, a més de no ser tòxiques, han de tenir una eficàcia reproducible i ser suficientment immunogèniques de manera que l'epítot majoritari pugui induir la producció d'anticossos en la població diana (pacients immunocompromesos, pacients d'alt risc...). A més, algunes d'aquestes vacunes donen respostes molt diverses en els models animals que dificulten determinar quina formulació de vacuna pot ser l'òptima (Pier, 2003). Per tal d'augmentar la immunogenicitat de l'O-polisacàrid específic, la majoria d'aquestes vacunes s'estan dissenyant com a **vacunes conjugades** on el polisacàrid corresponent a l'antigen O s'uneix a proteïnes transportadores i/o a adjuvants. A continuació, s'enumeren algunes vacunes conjugades basades en O-polisacàrids específics que estan actualment en desenvolupament clínic:

- *vacuna O157-rEPA* composta del polisacàrid O específic de *E. coli* O157:H7 conjugat a la exotoxina A recombinant de *Pseudomonas aeruginosa* per a la prevenció d'enteritis i del síndrome urèmic hemolític causat per *E. coli* O157:H7. Aquesta vacuna ha demostrat ser segura i immunogènica en un estudi clínic de fase I en adults i en un estudi clínic de fase II en nens de 2 a 5 anys. Actualment està planejat iniciar un estudi de fase III per comprovar l'eficàcia d'aquesta vacuna dins del programa d'immunitzacions establert pels infants (Ahmed *et al.*, 2006).
- *vacunes* per a la prevenció de la febre tifoidea compostes del polisacàrid O específic de *S. enterica* sv. Paratyphi A activat amb tetrafluoroborat de dimetilaminopiridini (CDAP) i unit al toxoide tetànic (TT) utilitzant hidrazida de l'àcid adípic com a lligant (SPA-TT<sub>1</sub>) o bé directament (SPA-TT<sub>2</sub>). Aquestes vacunes han demostrat ser segures i immunogèniques tant en nens com adults en estudis clínics de fase I i II (Konadu *et al.*, 2000), però queda pendent comprovar la seva eficàcia en la prevenció de la febre tifoidea.
- *vacunes conjugades* per a la prevenció de shigel·losis compostes del polisacàrid O específic de *Shigella sonnei* o de *S. flexneri* 2a unit tant a un mutant succinilat de l'exotoxina A de *P. aeruginosa* (*rEPA<sub>succ</sub>*) o a un mutant succinilat o salvatge de la toxina de *Corynebacterium diphtheriae* (CRM9<sub>succ</sub> o CRM9). Aquestes vacunes han demostrat ser segures i immunogèniques tant en adults (Passwell *et al.*, 2001) com en nens (Passwell *et al.*, 2003).

#### 1.2.6.4 Conclusió

El LPS ofereix noves oportunitats terapèutiques tant per al desenvolupament de nous compostos antimicrobians que actuïn per diferents mecanismes d'acció dels existents o bé per al desenvolupament de noves vacunes. Tot i els avenços dels últims anys en l'elucidació de l'estructura i biosíntesi del LPS i en les relacions estructura-activitat, encara queden molts aspectes per resoldre. Es fa per tant necessari concentrar els esforços per a millorar el coneixement sobre aquells aspectes més desconeguts del LPS en diferents bacteris, a fi de poder dissenyar noves estratègies terapèutiques. El present treball hi contribueix millorant el coneixement del LPS en *S. marcescens* N28b.





