

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología



* 5 3 0 9 6 0 7 2 7 4 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES CAPSULARES DE
Streptococcus pneumoniae **SEROTIPO 3**

Memoria que para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas presenta:

CARLOS ARRECUBIETA LARRAÑAGA

Directores de la Tesis

Dr. Ernesto García López

Profesor de Investigación

Dr. Rubens López García

Profesor de Investigación

Departamento de Microbiología Molecular

Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.)



ARCHIVO

Madrid, 1996

A mis padres

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de una u otra manera, me han ayudado en la realización de esta Tesis:

De manera muy especial, quiero agradecer a mis directores de Tesis, los Profesores Ernesto García y Rubens López, la paciencia que han tenido siempre conmigo, su dedicación, la formación, no sólo científica, que de ellos he recibido y la amistad que me han demostrado.

Al Dr. Pedro García su inestimable apoyo y sus valiosos consejos tanto prácticos como teóricos, que me han supuesto una enorme ayuda a la hora de desarrollar este trabajo, así como las innumerables y estimulantes discusiones extracientíficas que hemos compartido, generalmente en bandos contrarios, sobre política, antropología, historia foral, rock'n roll, etc. Destacar también al Dr. José Luis García por ofrecermme desde el principio su ayuda incondicional y por las múltiples "variantes" que siempre encuentra a los experimentos. Asimismo, quiero agradecer a la Dra. Concha Ronda la ayuda recibida y la gran simpatía que me demostró durante el tiempo que coincidí con ella en el laboratorio.

También deseo expresar mi enorme agradecimiento a todos mis compañeros de laboratorio, tanto los que continúan en él como los que no, cuyos nombres formarían una larga lista que os ahorraré, con los que he compartido momentos que espero no olvidar, por su amistad y por la ayuda que he recibido de ellos.

Asimismo, agradecer la excelente asistencia técnica de Eloisa Cano, Manuel Carrasco, Paquita Morante, Aurelio Hurtado, Javier Varela, Asun Díaz, Ricardo Uña, Vicky Muñoz y Mónica Fontenla que ha facilitado enormemente la realización de este trabajo.

Mi agradecimiento a la Dra. Ana Martín del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, por haber facilitado la lectura de esta Tesis y haber aceptado ser ponente de la misma.

Por otra parte, quiero mencionar a todos mis amigos por eso, por ser mis amigos.

También quiero agradecer a D. Bowie, TVU, J.D. Salinger, S. Boom, N. Cave, B. Vian, A. Monterroso, Chemical Brothers, C. Bukowski, y otra mucha gente, el haberme permitido confirmar que no era el único un poco "particular" y hacerme la vida más soportable.

Por último, quiero agradecer a mi familia, y muy especialmente a mi padre y a mi madre, por todo lo que han hecho por mí y por lo que han tenido, y algunos todavía tendrán, que aguantar.

“... Al despertar se encontró rodeado por un grupo de indígenas de rostro impasible que se disponían a sacrificarlo ante un altar, un altar que a Bartolomé le pareció como el lecho en que descansaría, al fin, de sus temores, de su destino, de sí mismo. Tres años en el país la habían conferido un mediano dominio de las lenguas nativas. Intentó algo. Dijo algunas palabras que fueron comprendidas.

Entonces floreció en él una idea que tuvo por digna de su talento y de su cultura universal y de su arduo conocimiento de Aristóteles. Recordó que para ese día se esperaba un eclipse total de sol. Y dispuso, en lo más íntimo, valerse de aquel conocimiento para engañar a sus opresores y salvar la vida.

—Si me matéis —les dijo— puedo hacer que el sol se oscurezca en su altura.

Los indígenas lo miraron fijamente y Bartolomé sorprendió la incredulidad en sus ojos. Vió que se produjo un pequeño consejo, y esperó confiado, no sin cierto desdén.

Dos horas después el corazón de fray Bartolomé Arrazola chorreaba su sangre vehemente sobre la piedra de los sacrificios (brillante bajo la opaca luz de un sol eclipsado), mientras uno de los indígenas recitaba sin ninguna inflexión de voz, sin prisa, una por una, las infinitas fechas en que se producirían eclipses solares y lunares, que los astrónomos de la comunidad maya habían previsto y anotado en sus códices sin la valiosa ayuda de Aristóteles.”

(Augusto Monterroso, “El eclipse”)

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	i
ABREVIATURAS PARA AMINOÁCIDOS.	iii

I.- INTRODUCCIÓN	1
1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE <i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
2. IMPORTANCIA CLÍNICA DE <i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
2.1. El estado de portador	3
2.2. Adhesividad	4
2.3. Factores de virulencia.	5
2.3.1. Polisacárido capsular	5
2.3.2. Autolisinas y pared celular.	8
2.3.3. Otros factores de virulencia	10
3. POLISACÁRIDOS CAPSULARES. GENERALIDADES	13
4. POLISACÁRIDO CAPSULAR.	14
4.1. Estructura química de los polisacáridos capsulares	15
4.2. Función y significado biológico de la encapsulación	16
5. BIOSÍNTESIS DE POLISACÁRIDOS CAPSULARES	19
5.1. Precursores biosintéticos	20
5.2. Formación de la unidad básica y polimerización	20
5.3. Transporte y modificación del polisacárido capsular.	22
5.4. Mecanismos de regulación en la biosíntesis del polisacárido capsular.	23
6. GENÉTICA DE LA BIOSÍNTESIS CAPSULAR.	26
6.1. Organización de los genes capsulares en bacterias Gram-negativas.	27
6.1.1. Relación entre grupos de genes de síntesis polisacarídica no alélicos	29
6.1.2. Bases genéticas de la variabilidad antigénica capsular.	30
6.2. Organización de los genes capsulares en bacterias Gram-positivas	31
7. ESTUDIOS SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE POLISACÁRIDOS CAPSULARES	
EN NEUMOCOCO.	34
7.1. Estudios bioquímicos	35
7.2. Estudios genéticos	38
II.- OBJETIVOS	42

III.- MATERIALES Y MÉTODOS	44
1. ESTIRPES BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS	45
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	45
3. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA	49
4. OBTENCIÓN DE MUTANTES RUGOSOS DE S. PNEUMONIAE.	50
5. SEROTIPADO	50
6. EXTRACCIÓN DE DNA	51
7. EXTRACCIÓN DE RNA	52
8. ELECTROFORESIS DE DNA	52
8.1. Electroforesis convencional	52
8.2. Electroforesis en campo pulsado (PFGE)	53
9. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).	53
10. SECUENCIACIÓN DE DNA	53
11. TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DEL DNA Y RNA	54
11.1. Marcaje de sondas.	54
11.2. Southern-blot.	55
11.3. Dot-blot	55
11.4. Northern-blot.	55
12. TÉCNICA DE ‘PRIMER EXTENSION’, PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS SITIOS DE INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN	55
13. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS (SDS-PAGE)	56
14. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS DE CULTIVOS BACTERIANOS.	57
15. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA N-TERMINAL DE LAS PROTEÍNAS CAP3A, CAP3B Y CAP3C	57
16. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	58
16.1. Ensayo de actividad UDP-Glc DH.	58
16.2. Identificación del producto de reacción de la enzima UDP-Glc DH	59
17. EXTRACCIÓN DE POLISACÁRIDO CAPSULAR DE NEUMOCOCO.	59
18. MISCELÁNEA	59
18.1. Fraccionamiento subcelular de E. coli	59

18.2. Manipulación del DNA con enzimas de uso común en biología molecular	60
18.3. Inmunodifusión doble en gel	60
18.4. Determinación de ácidos urónicos.	60
18.5. Determinación de carbohidratos totales	60
18.6. Determinación de la masa del polisacárido capsular	60
18.7. Preparación del antisuero anti-R (antisomático)	60
 IV.- RESULTADOS	 61
1. CLONACIÓN, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LOS GENES CAPSULARES DEL SEROTIPO 3 DE <i>S. pneumoniae</i>	 62
1.1. Realización de un mapa físico de la región de DNA que contiene el gen <i>cap3A</i>	 63
1.2. Construcción del plásmido recombinante pKER1	64
1.3. Subclonación del inserto contenido en pKER1	64
1.4. Construcción del plásmido recombinante pKER2	66
1.5. Subclonación del inserto contenido en pKER2	66
1.6. Secuencia de los fragmentos de DNA clonados en pKER1 y pKER2	72
1.7. Análisis de la secuencia del fragmento EcoRI de 9704 bp.	72
1.8. Identificación génica preliminar mediante comparación de secuencias	 73
1.9. Análisis comparativo de la secuencia de nucleótidos.	80
2. DISTRIBUCIÓN DE LOS GENES DEL FRAGMENTO <i>EcoRI</i> EN ESTIRPES DE NEUMOCOCO PERTENECIENTES A DISTINTOS SEROTIPOS	 82
3. LOCALIZACIÓN DE GENES EN EL CROMOSOMA DE <i>S. pneumoniae</i>	84
4. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL	88
4.1. Identificación de la unidad transcripcional de los genes capsulares	88
4.2 Identificación del sitio de iniciación de la transcripción del operón <i>cap3</i>	 88
5. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LOS GENES ESPECÍFICOS EN LA BIOSÍNTESIS CAPSULAR DEL SEROTIPO 3	 90
6. ESTUDIO DE MUTACIONES PUNTUALES QUE AFECTAN A LA PRODUCCIÓN	

DE POLISACÁRIDO CAPSULAR DE SEROTIPO 3	92
7. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS PRODUCTOS GÉNICOS DEL OPERÓN <i>CAP3</i>.	95
7.1. Estudio de la proteína Cap3A	97
7.1.1. <i>Construcción de un plásmido recombinante para la expresión del gen</i> <i>cap3A en E. coli</i>	97
7.1.2. <i>Producción de la proteína Cap3A en E. coli</i>	99
7.1.3. <i>Estudio de la actividad in vitro de Cap3A</i>	100
7.2. Estudio de la proteína Cap3B	102
7.2.1. <i>Caracterización de la mutación de la cepa NR3-12</i>	102
7.2.2. <i>Construcción de un plásmido recombinante para el estudio de la expresión</i> <i>del gen cap3B en E. coli</i>	103
7.2.3. <i>Producción de la proteína Cap3B en E. coli</i>	105
7.2.4. <i>Estudio de la producción de polisacárido capsular de serotipo 3 en E. coli</i> <i>que expresa el gen cap3B.</i>	106
7.2.5. <i>Construcción de un plásmido recombinante para la clonación y expresión</i> <i>del gen cap3B en neumococo</i>	108
7.2.6. <i>Obtención de estirpes de neumococo que presentan un fenotipo binario</i> <i>al expresar el gen cap3B</i>	108
7.3. Estudio de la proteína Cap3C	110
7.3.1. <i>Construcción del plásmido pKAL1</i>	110
7.3.2. <i>Complementación de una mutación galU de E. coli por el plásmido pKAL1</i>	112
7.3.3. <i>Construcción del plásmido pTNC41</i>	112
7.3.4. <i>Producción e identificación de la enzima Cap3C en E. coli</i>	114
8. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO <i>EcoRI-BclI</i> SITUADO EN POSICIÓN 3' CON RESPECTO AL GEN <i>cap3C</i>.	116
8.1. <i>Obtención del plásmido pUCEK21</i>	116
8.2. <i>Secuenciación del inserto contenido en el plásmido pUCEK21</i>	117
8.3. <i>Análisis comparativo de la secuencia del inserto de pUCEK21</i>	117
9. ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN EN LA BIOSÍNTESIS CAPSULAR DE LA REGIÓN DE ADN SITUADA EN POSICIÓN 3' RESPECTO DEL GEN <i>lytA</i>	123
V.- DISCUSIÓN.	126
1. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS GENES CAPSULARES.	129

2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES COMUNES.	136
3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES CAPSULARES.	138
VI.- CONCLUSIONES.	146
VII.- BIBLIOGRAFÍA	149

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A_{λ}	: absorbancia a una longitud de onda λ
Ap	: ampicilina
ATP	: adenosina 5'-trifosfato
bp	: par(es) de bases
Bq	: becquerelio
BrEt	: bromuro de etidio
C-terminal	: carboxi-terminal
C ₅₅ -P	: undecaprenol fosfato
CDP	: citidina 5'-difosfato
Ci	: curio
Cm	: cloranfenicol
CRP	: proteína reactiva C
dATP	: desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	: desoxicitidina 5'-trifosfato
dNTP	: desoxinucleósido 5'-trifosfato
DOC	: desoxicolato sódico
ϵ	: coeficiente de extinción molar
EDTA	: ácido etilen-diamino-tetraacético
Ery	: eritromicina
Gal	: galactosa
GalA	: ácido galacturónico
GalNAc	: <i>N</i> -acetil galactosamina
Glc	: glucosa
GlcA	: ácido glucurónico
GlcNAc	: <i>N</i> -acetil glucosamina
IPTG	: isopropil- β - <i>D</i> -tiogalactósido
kb	: kilobases o 1000 bp
kDa	: kilodaltons
LB	: medio de cultivo de Luria y Bertani
Lin	: lincomicina
LPS	: lipopolisacárido
ManNAcA	: ácido <i>N</i> -acetil manosaminurónico
medio C	: medio semisintético para el cultivo de neumococo
medio C + Y	: medio C suplementado con extracto de levadura al 0,08%
M_r	: masa molecular relativa
N	: nefelos (unidad de nefelometría)
N-terminal	: amino-terminal
NAD	: nicotin adenin dinucleótido
NADH	: forma reducida de NAD
NeuNAc	: ácido <i>N</i> -acetil neuramínico
NK	: natural killer
nt	: nucleótido
ORF	: marco abierto de lectura
p/v	: relación peso/volumen
PAGE	: electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	: reacción en cadena de la polimerasa

PFGE	: electroforesis en campo pulsado
PolIk	: fragmento Klenow (grande) de la DNA polimerasa I de <i>E. coli</i>
P-Pi	: pirofosfato
R/S	: resistente/sensible
SDS	: dodecil sulfato sódico
TDP	: timidina 5'-difosfato
Tet	: tetraciclina
Tris	: (hidroximetil)aminometano
U	: unidad de actividad enzimática
UDP	: uridina 5'-difosfato
UFC	: unidad formadora de colonias
UTP	: uridina 5'-trifosfato
v/v	: relación volumen/volumen

ABREVIATURAS PARA AMINOÁCIDOS

Ala	Alanina	A
Arg	Arginina	R
Asn	Asparagina	N
Asp	Ácido aspártico	D
Cys	Cisteína	C
Gln	Glutamina	Q
Glu	Ácido glutámico	E
Gly	Glicina	G
His	Histidina	H
Ile	Isoleucina	I
Leu	Leucina	L
Lys	Lisina	K
Met	Metionina	M
Phe	Fenilalanina	F
Pro	Prolina	P
Ser	Serina	S
Thr	Treonina	T
Trp	Triptófano	W
Tyr	Tirosina	Y
Val	Valina	V

I.- INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae (Chester, 1901), fue denominado en principio *Micrococcus pneumoniae* (Klein, 1884) y, más adelante, *Diplococcus pneumoniae* (Weichselbaum, 1886) debido a su morfología típica de cocos ovals o esféricos, con un tamaño de entre 0,5 y 1,25 μm de longitud, agrupados en parejas, aunque a veces aislados o en cadenas cortas. Cuando se encuentran en parejas, los extremos distales toman una forma lanceolada. Neumococo es un microorganismo inmóvil, no forma esporas y, en aislamientos primarios, generalmente presenta cápsula polisacarídica. Es una bacteria Gram-positiva aunque, en cultivos sometidos a una incubación prolongada, pueden presentar una tinción Gram-negativa.

Neumococo produce un halo de α -hemólisis cuando se incuba en agar-sangre en condiciones de aerobiosis; si la incubación se lleva a cabo en anaerobiosis se produce β -hemólisis por la acción de la neumolisina (Brzin, 1969). Sobre agar-sangre, las colonias formadas por las cepas capsuladas presentan un fenotipo brillante y liso, de aspecto mucoso. Las colonias jóvenes son convexas pero, al ir envejeciendo se hunden en su zona central, debido a la autólisis, tomando un aspecto de cráter, lo cual es un carácter más que permite su diferenciación del resto de estreptococos.

2. IMPORTANCIA CLÍNICA DE *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae es uno de los principales patógenos humanos, especialmente para la población infantil y las personas mayores de 60 años. La neumonía es actualmente la cuarta causa de mortalidad en el mundo según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el neumococo, en concreto, es el agente causante de entre el 10 y el 25% de los casos, produciéndose cada año un millón de fallecimientos entre la población menor de 5 años a causa de la neumonía neumocócica (Sahn, 1990). En Estados Unidos, *S. pneumoniae* es el principal agente etiológico de la neumonía adquirida en la comunidad, y el segundo patógeno productor de meningitis. Además de estas infecciones graves, neumococo es el causante de más de la mitad de las otitis medias en niños y de un porcentaje considerable de sinusitis y conjuntivitis (Mufson, 1990). Se estima que en Estados Unidos se producen cada año entre 200.000 y un millón de casos de neumonía neumocócica, con una tasa de

mortalidad del 1 al 5% (Zigheboim y Tomasz, 1981). En las meningitis producidas por neumococo la tasa de mortalidad llega al 30% (Wenger y cols., 1990).

El uso de antibióticos en el tratamiento de las infecciones producidas por neumococo ha disminuido considerablemente la mortalidad; aun así, la morbilidad de estas enfermedades permanece en un nivel similar al registrado a principios de siglo, por lo que neumococo sigue siendo una de las principales causas de enfermedad en todo el mundo. Este hecho se ha visto agravado en las últimas décadas por la aparición de cepas de neumococos resistentes a los antibióticos, en especial a los β -lactámicos y más concretamente a la penicilina que ha sido el antibiótico de elección para el tratamiento de las enfermedades causadas por *S. pneumoniae* (Neu, 1992; Cohen, 1992). El mecanismo de resistencia a penicilina en neumococo consiste en la producción de PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) con menos afinidad por los antibióticos β -lactámicos. Se ha postulado que estas PBPs alteradas se originan mediante un proceso de recombinación interespecífica que implica el reemplazamiento de segmentos de los genes estructurales de las PBPs por otros que provienen de estreptococos orales resistentes a penicilina (Dowson y cols., 1989; Spratt, 1994). Las primeras estirpes clínicas resistentes se detectaron a finales de los años 60 y, a partir de entonces, su número ha ido en aumento de forma progresiva. Aunque se han extendido por todo el mundo, su incidencia varía considerablemente de unas zonas a otras (Klugman, 1990; Dowson y cols., 1994). En Estados Unidos, estudios realizados entre 1979 y 1987 mostraron que el porcentaje de neumococos resistentes a penicilina era del orden del 5% (Spika y cols., 1991); sin embargo, estudios más recientes han mostrado tasas considerablemente más altas de resistencia, en torno al 17% (Thornsberry y cols., 1992). En España la tasa de resistencia es superior al 40%, lo que representa una de las mayores del mundo (Fenoñ y cols., 1991).

2.1. EL ESTADO DE PORTADOR

S. pneumoniae es un microorganismo parásito obligado que coloniza al hombre y, ocasionalmente, a otros mamíferos. Su hábitat normal es la nasofaringe humana, cuya mucosa es colonizada por este microorganismo desde los primeros días de vida. Se ha estimado que aproximadamente el 60% de la población mundial es portadora y que todo individuo ha estado colonizado por neumococo alguna vez en su vida. Generalmente, el número de portadores es mayor entre la población infantil que entre la adulta. Existen

diferencias en cuanto a la frecuencia con que neumococos de distintos serotipos colonizan el tracto respiratorio superior, siendo unos serotipos más habituales que otros. Algunos datos epidemiológicos sugieren que la infección por neumococo en personas inmunocompetentes se produce por la adquisición de un serotipo capsular al que no había estado expuesto previamente (Austrian, 1986).

2.2. ADHESIVIDAD

Las bacterias que colonizan las superficies de las mucosas producen factores específicos implicados en la adhesión del microorganismo a las células epiteliales. Es lógico suponer, por tanto, que *S. pneumoniae* sintetice sus propios factores que intervienen en el proceso de colonización. Se ha sugerido que neumococo produce una adhesina de naturaleza proteica que actuaría como unión entre la pared celular y un receptor presente en las células epiteliales (Andersson y cols., 1988). Este receptor de la célula del huésped está constituido por glicolípidos que contienen probablemente el disacárido GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal (Andersson y cols., 1983) o GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal (Krivan y cols., 1988). Este último disacárido se encuentra en algunos glicoesfingolípidos, y entre ellos el asialo-GM1 está presente en cantidades considerables en el tejido pulmonar humano (Boulnois, 1992). Recientemente se ha puesto de manifiesto la capacidad de neumococo de adherirse *in vitro* al glicolípido asialo-GM1, así como al lactotriosilceramido, que contiene en su zona polar el disacárido GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal (Sundberg-Kövamees y cols., 1994; Cundell y Tuomanen, 1994).

Existen proteínas neumocócicas que podrían intervenir en la colonización, tales como la neuraminidasa (Krivan y cols., 1988; Sundberg-Kövamees y cols., 1994), la neumolisina y una proteasa específica de las inmunoglobulinas IgA1 (Kilian y Reinholdt, 1987). Estos elementos se consideran factores de virulencia, pero es posible que su papel principal sea promover la colonización, manifestando su implicación en la virulencia sólo cuando el microorganismo tiene acceso a lugares normalmente estériles como la sangre o el líquido cefalorraquídeo (Boulnois, 1992). Además, neumococo produce una proteína de superficie con un M_r de 37.000 (Russell y cols., 1990), cuyo gen ha sido clonado en *E. coli* (Sampson y cols., 1994). Esta proteína, denominada PsaA, puede desempeñar algún papel en la adhesión, ya que su estructura primaria es similar a ciertas adhesinas encontradas en otras especies relacionadas (Lowe y cols., 1995). Por otra parte, recientemente se ha identificado

una proteína de 79 kDa, denominada PcpA, que presenta un dominio de unión a colina y que posee características típicas de las adhesinas (Rodríguez, 1995).

2.3. FACTORES DE VIRULENCIA

El desarrollo de una infección bacteriana implica, en primer lugar, la existencia de interacciones entre las estructuras superficiales de la bacteria y las superficies epiteliales, células del sistema inmunitario y factores humorales del huésped. Los procesos implicados en la translocación de neumococo desde la nasofaringe a otros lugares del huésped son poco conocidos y probablemente dependen de múltiples factores (Johnston, 1991). Neumococo se caracteriza por presentar una cápsula de naturaleza polisacáridica recubriendo la superficie celular; esta estructura es la responsable de gran parte de las interacciones entre el huésped y la bacteria. Además, se sabe que las envueltas celulares más internas, la pared celular y la membrana plasmática, también están implicadas en procesos relacionados con la patogenia (Tomasz, 1981). En la Figura 1 se muestra un esquema de los principales factores de virulencia de neumococo y sus efectos más importantes.

2.3.1. POLISACÁRIDO CAPSULAR

La cápsula de *S. pneumoniae* está constituida por polisacáridos formados por unidades repetitivas de oligosacáridos que, en algunos tipos, están unidos entre sí mediante enlaces fosfodiéster (van Dam y cols., 1990). Generalmente son polímeros lineales, aunque en algunos tipos están ramificados. El polisacárido capsular se encuentra recubriendo de forma homogénea la superficie celular y su espesor varía según la estirpe pudiendo llegar a los 400 nm (Sørensen y cols., 1988). En algunos tipos, el polisacárido capsular está unido covalentemente al peptidoglicano de la pared celular (Sørensen y cols., 1990; Sørensen y Blom, 1992).

Hasta el momento se conocen 90 polisacáridos capsulares diferentes entre sí química e inmunológicamente (Henrichsen, 1995). Los distintos tipos se diferencian tanto por los monosacáridos que forman la unidad de repetición, como por los enlaces entre éstos y entre los monosacáridos que las forman. Esta diversidad constituye la base para su clasificación serológica.

Siguiendo esta clasificación se distinguen 46 serogrupos, según la nomenclatura danesa, designados por números, del 1 al 48 ya que no existen ni el 26 ni el 30. Algunos serogrupos

incluyen varios serotipos, nombrados por letras, debido a un fenómeno de reactividad cruzada por la existencia de determinantes antigénicos comunes (Henrichsen, 1995). Los serotipos se nombran asignando una letra a cada uno en orden alfabético, excepto para el

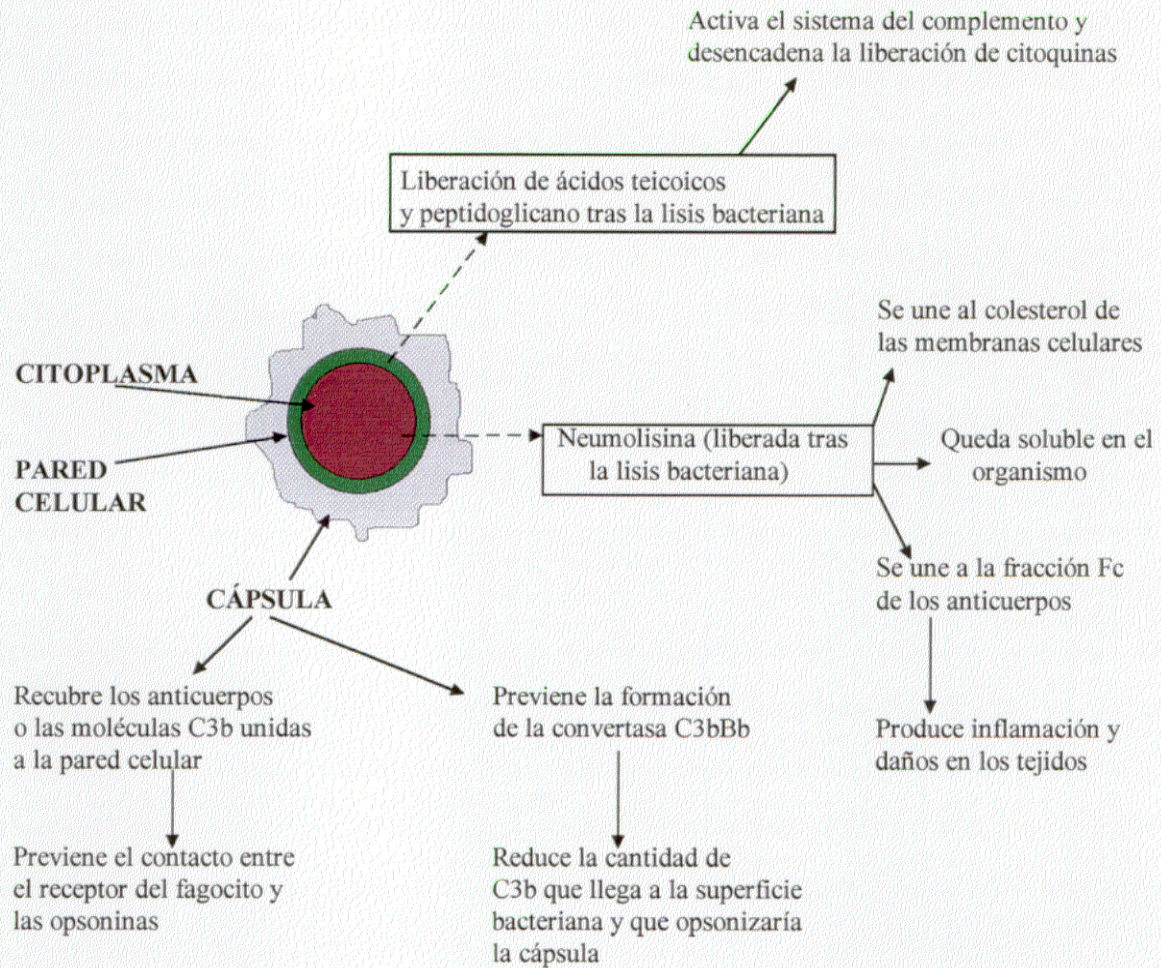


Figura 1. Interacción de la neumolisina y de los componentes de la superficie celular de *S. pneumoniae* con el sistema del complemento.

primero en ser identificado, al que se le asigna la letra F ('First'). Sin embargo, existe una excepción, el serogrupo 9 constituido por los serotipos 9A, 9L ('Lederle'), 9N ('Neufeld'),

y 9V ('Valdemar') (Vammen, 1939). Actualmente se conoce la estructura química de bastantes de estos polisacáridos (van Dam y cols., 1990; Jansson y cols., 1991).

En 1928, Griffith puso de manifiesto que la cápsula de neumococo constituye el principal factor de virulencia en ratones, ya que la administración de células capsuladas producía la muerte, mientras que la inyección de células pertenecientes a una estirpe rugosa derivada de la anteriormente utilizada resultaba inocua. En 1931, Avery y Dubos pusieron de manifiesto que sólo 10 bacterias de algunas estirpes capsuladas eran capaces de producir la muerte en ratones, mientras que se requerían 10^6 bacterias no capsuladas de la misma cepa para obtener el mismo efecto. Esta implicación directa en la virulencia se debe al papel que desempeña la cápsula protegiendo frente a la fagocitosis (Roberts y cols., 1989; Cross, 1990). Existen, además, variaciones en la virulencia dependiendo del serotipo capsular (Knecht y cols., 1970) y así, el serotipo 3 es mucho más invasivo en el hombre que el serotipo 37, aún cuando ambos producen una cápsula muy voluminosa y de un tamaño parecido, sin embargo también se ha observado que en el caso de estirpes de serotipo 3, su virulencia está correlacionada con la cantidad de cápsula producida *in vitro* (MacLeod y Krauss, 1950; 1953). Por otra parte, se ha observado que las estirpes rugosas son virulentas en individuos con agranulocitosis, lo que demuestra las propiedades patogénicas de otras estructuras neumocócicas (Rich y McKee, 1939). Por otra parte, a pesar de que tradicionalmente se ha considerado que los polisacáridos purificados no son tóxicos, recientemente se ha descrito que algunos polisacáridos purificados que poseen grupos cargados son capaces de producir abscesos intra-abdominales (Tzianabos y cols., 1993).

La observación de que la presencia en el suero de anticuerpos frente a un serotipo capsular protege contra una infección posterior por cepas del mismo serotipo o de serotipos con reacción cruzada con éste, y el hecho de que unos serotipos son más frecuentes en los aislados de pacientes con infecciones neumocócicas que otros, llevó al desarrollo de una vacuna antineumocócica (Austrian, 1981). La vacuna actualmente en uso está compuesta por polisacáridos purificados de los 23 serotipos más frecuentes en infecciones graves por neumococo en todo el mundo (Robbins y cols., 1983; Nielsen y Henrichsen, 1992). Esta vacuna parece ser eficaz en poblaciones seleccionadas (Shapiro y cols., 1991); sin embargo, su inmunogenicidad es prácticamente nula en niños menores de dos años así como, en general, en pacientes inmunocomprometidos (Siber, 1994). Además, al ser los polisacáridos antígenos T-independientes, no inducen memoria inmunológica y, por tanto, la

revacunación no conlleva un incremento apreciable en los títulos de anticuerpos (Bruyn y van Furth, 1991). La inmunogenicidad de los polisacáridos se puede aumentar mediante la unión covalente de éstos a una proteína, lo que constituye una vacuna conjugada. La construcción de vacunas antineumocócicas de este tipo es una de las principales líneas de investigación dentro de este campo (Klein, 1995). Mediante el uso de vacunas conjugadas se consigue estimular la respuesta celular debido a que el antígeno es reconocido por las células B del huésped y procesado para su presentación a los linfocitos T-cooperadores creándose, de este modo, una memoria inmunológica contra dicho antígeno de forma que, si existe una infección posterior, se produce una respuesta secundaria rápida. Además, se ha visto que, como en el caso de la vacuna conjugada contra el polisacárido capsular de tipo b de *Haemophilus influenzae* (Hib), estas nuevas vacunas conjugadas también inducen niveles de anticuerpos altos en niños, permaneciendo dichos títulos estables durante un periodo de tiempo considerable (Granoff y cols., 1993; Siber, 1994). Recientemente, la administración en niños de distintas edades de una vacuna constituida por polisacáridos capsulares de cuatro serotipos de neumococo unidos al complejo protéico de la membrana externa (OMPC) de *Neisseria meningitidis*, ha conseguido la inducción de una respuesta significativa tras la primera dosis contra dos de los serotipos y, tras la segunda aplicación, contra los otros dos (Käyhty y cols., 1995). Algunas proteínas de neumococo juegan un papel importante en la patogenia de las infecciones neumocócicas (Paton y cols., 1993) y, por tanto, son buenas candidatas para su utilización en vacunas antineumococo. Recientemente, se ha mostrado la capacidad de inmunización en ratones jóvenes de una vacuna conjugada polisacárido 9V-neumolisina. Asimismo, se ha visto que el tamaño de la fracción polisacáridica es determinante a la hora de conferir inmunidad contra infecciones neumocócicas (Lee y Wang, 1994). Parece, por tanto, que la siguiente generación de vacunas antineumocócicas se basará en la inmunidad anticapsular producida por conjugados proteína-polisacárido.

2.3.2. AUTOLISINAS Y PARED CELULAR

La pared celular de *S. pneumoniae* posee la estructura típica correspondiente a una bacteria Gram-positiva: una capa de peptidoglicano de entre 15 y 40 nm de espesor, de carácter multilaminar, y una serie de polímeros unidos covalentemente a éste, principalmente ácidos teicoicos. La característica más notable de la pared de neumococo es

la presencia de residuos de colina como componentes de los ácidos teicoicos (Fischer y cols., 1993). La presencia de este aminoalcohol se ha demostrado también en otros microorganismos, como *S. oralis* (Kilpper-Bälz y cols., 1985), *S. mitis* (E. García, comunicación personal) o *Clostridium acetobutylicum* (Podvin y cols., 1988; García y cols., 1988), aunque neumococo es auxótrofo para colina (Rane y Subborow, 1940; Tomasz, 1967), característica que no comparten los otros microorganismos. Precisamente, es a estos residuos de colina a los que se une la principal autolisina de neumococo, la *N*-acetilmuramyl-L-alanil amidasa (LytA). Esta enzima hidroliza el enlace amida entre la cadena glicánica y el péptido presentes en el peptidoglicano y requiere de forma absoluta para su actividad la presencia de colina en los ácidos teicoicos de la pared celular (Höltje y Tomasz, 1975c). La amidasa LytA, así como el resto de las enzimas líticas codificadas por los bacteriófagos que infectan a neumococo (López y cols., 1992; 1993), posee una estructura modular: la zona C-terminal confiere a la proteína la capacidad de reconocimiento y unión a los residuos de colina (Sánchez-Puelles y cols., 1990), mientras que la zona N-terminal es la responsable de la actividad enzimática (Sanz y cols., 1992). El principal papel *in vitro* de la amidasa LytA parece ser el de intervenir en la separación de las células hijas durante la división celular, como se deduce de la tendencia de mutantes deficientes en autolisina a formar cadenas cortas durante el crecimiento en lugar de agruparse formando diplococos (Sánchez-Puelles y cols., 1986b; López y cols., 1986; Ronda y cols., 1987). La enzima parece estar permanentemente unida a los residuos de colina de los ácidos lipoteicoicos (Briese y Hakenbeck, 1985; Fischer y cols., 1993); en esta forma, la autolisina es inactiva, lo cual representa un mecanismo de regulación de la actividad enzimática, evitando así la autólisis de la bacteria. Esta unión se rompe al llegar el microorganismo a la fase estacionaria de crecimiento con lo cual la enzima se vuelve activa produciéndose la muerte celular por lisis del microorganismo (Höltje y Tomasz, 1975a, b). Este mismo efecto se puede observar al añadir penicilina o desoxicolato sódico (DOC) al cultivo.

La pared celular desempeña un papel importante en la virulencia al liberarse sus componentes tras la lisis de la bacteria, siendo responsables de la reacción inflamatoria que se produce en los tejidos infectados (Tuomanen y cols., 1985a, b). Además, los productos de degradación de la pared celular aumentan la permeabilidad del endotelio cerebral y del epitelio de los alvéolos pulmonares, estimulan la producción de citoquinas y del factor

activador, alteran el flujo sanguíneo cerebral y activan el reclutamiento de leucocitos en el pulmón y en el espacio subaracnoideo (Tuomanen y cols., 1995).

Los ácidos teicoicos, denominados también polisacárido C, son los responsables de la inmunogenicidad de la pared celular y de la capacidad de ésta para activar la vía alternativa del sistema del complemento del huésped (Winkelstein y Tomasz, 1978).

La amidasa LytA parece contribuir de manera importante a la virulencia de ciertas cepas, ya que estirpes deficientes en autolisina derivadas de cepas patógenas muestran una virulencia considerablemente menor (Canvin y cols., 1995). Se ha sugerido que la intervención de la autolisina LytA en la virulencia no se debe a la interferencia de ésta en la actividad antineumocócica del huésped, sino a su implicación en el proceso de autólisis y la consiguiente liberación de factores intracelulares citotóxicos (Berry y cols., 1989b; 1992), como la neumolisina y las neuraminidasas, además del peptidoglicano y los ácidos teicoicos, los cuales se ha comprobado que median en la inflamación meníngea en conejos (Tuomanen y cols., 1985b; 1995).

2.3.3. OTROS FACTORES DE VIRULENCIA

Se han caracterizado varias proteínas citoplásmicas que intervienen de forma relevante en diferentes procesos de las infecciones neumocócicas (Paton y cols., 1993). Una de estas proteínas es la neumolisina, una citotoxina no secretable que pertenece al grupo de las citolisinas activadas por tiol (Smyth y Duncan, 1978) aunque es de localización citoplásmica (Johnson, 1977), mientras que las del resto de la familia son secretadas al medio. Las toxinas de esta familia actúan insertándose en la membrana de las células del huésped como consecuencia de la interacción de la proteína con el colesterol de la membrana de la célula diana. La neumolisina actúa principalmente sobre eritrocitos, aunque puede hacerlo sobre cualquier célula animal que posea colesterol en su membrana. Posteriormente a la inserción en la membrana se produce una oligomerización que implica a entre 20 y 80 moléculas, formándose un poro transmembranal, y produciéndose la lisis celular (Bhakdi y Tranum-Jensen, 1986). Muy recientemente, las zonas biológicamente significativas de la neumolisina han sido estudiadas mediante anticuerpos monoclonales (de los Toyos y cols., 1996). Se ha demostrado que, *in vitro*, la neumolisina rompe la integridad del epitelio respiratorio humano, por lo que podría intervenir en los primeros pasos de la patogénesis de la neumonía neumocócica (Steinfort y cols., 1989; Feldman y cols., 1990). Recientemente se

ha observado que los neumococos deficientes en neumolisina son menos eficientes en el desarrollo de neumonía y septicemia en el ratón, que las cepas parentales productoras de la enzima (Berry y cols., 1989a; 1992; Canvin y cols., 1995). Además, se ha visto que la ausencia de neumolisina retarda la aparición de neumococos en la sangre (Canvin y cols., 1995), debido posiblemente a la implicación de esta proteína en la producción de daños en el endotelio de los vasos sanguíneos. Sin embargo, se ha observado también que, aunque la neumolisina puede estimular la cascada inflamatoria en el sistema nervioso central, no es necesaria para la patogénesis de la meningitis (Friedland y cols., 1995). Otra observación importante acerca del papel desempeñado por la neumolisina en la virulencia del neumococo, es el hecho de que aumenta el tiempo de supervivencia de la bacteria *in vivo*, probablemente debido a su capacidad para inhibir la capacidad bactericida de los fagocitos o para degradar los componentes del sistema del complemento (Mitchell y cols., 1991). Se ha descrito la capacidad de la neumolisina de activar el sistema del complemento (Paton y cols., 1984), relacionada con la afinidad que posee para unirse a la porción Fc de la inmunoglobulina humana IgG, y con la observación de que tiene ciertas similitudes en estructura primaria en determinadas zonas con la proteína C reactiva (CRP) humana (Mitchell y cols., 1991); de este modo, la neumolisina podría actuar *in vivo* como un análogo de la CRP, y suprimiría así el efecto de ésta, activando el complemento en células del huésped en lugar de en la superficie de la bacteria (Paton y cols., 1993).

Otra proteína que parece también estar implicada en la virulencia del neumococo es la neuraminidasa. Esta enzima libera residuos de ácido siálico, cuando se hallan en posición terminal, de una gran variedad de glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos situados en superficies celulares o en fluidos corporales. Debido a esta actividad, la neuraminidasa puede poner al descubierto receptores celulares para las adhesinas neumocócicas (Krivan y cols., 1988), además de causar daños a los tejidos sobre los que actúa. Se ha observado que, en pacientes con meningitis neumocócica, se produce bacteriemia y se llega al estado de coma más a menudo cuando existen concentraciones elevadas de ácido *N*-acetil neuramínico (NeuAc) en el líquido cefalorraquídeo (O'Toole y cols., 1971), probablemente debidas a la acción de la neuraminidasa. Aunque se ha demostrado la toxicidad de esta enzima en ratones, la protección que proporciona la inmunización con ella frente a neumococos virulentos es considerablemente menor que la que se obtiene con la neumolisina (Lock y cols., 1988). Hasta el momento se han descrito dos genes codificantes

de neuraminidasas en *S. pneumoniae* (Berry y cols., 1988; Cámara y cols., 1991), coexistiendo ambos en el cromosoma de neumococos de distintos serotipos. En uno de estos genes, parecen existir dos posibles sitios de iniciación de la traducción, ambos con su correspondiente sitio de unión al ribosoma, además de dos posibles promotores; de este modo resultarían dos secuencias polipeptídicas, una de las cuales incluiría un péptido señal en su extremo N-terminal. En el extremo C-terminal de ambas proteínas existe un motivo de anclaje en membrana, compartido por todas las proteínas de superficie de bacterias Gram positivas (Paton y cols., 1993).

Se han descrito varias proteínas de la superficie del neumococo que podrían intervenir en la patogénesis. Una de estas es la proteína de superficie (PspA), unida a la pared celular y con capacidad antigénica. Aunque se ha encontrado en todas las estirpes de neumococo estudiadas, su variabilidad antigénica es considerable. Hasta ahora no se ha podido determinar su función precisa, aunque se ha comprobado que su presencia en la superficie bacteriana de estirpes no capsuladas (rugosas o R) inoculadas a ratones, les confiere protección inmunológica contra cepas de distintos serotipos (McDaniel y cols., 1991). La clonación del gen que codifica para la PspA ha permitido deducir la secuencia de aminoácidos de ésta; así, se ha observado que la región N-terminal posee cierta homología con la proteína M de los estreptococos del grupo A, mientras que la zona C-terminal presenta una similitud considerable con la misma región de la autolisina LytA (Yother y Briles, 1992). Este hecho sugiere que ambas proteínas podrían tener un receptor común, que serían los residuos de colina de los ácidos teicoicos y/o lipoteicoicos.

Desde hace décadas se conoce la capacidad de neumococo de producir una hialuronidasa (Humphrey, 1944), que es secretada al medio durante la fase exponencial de crecimiento *in vitro*. Su sustrato es el ácido hialurónico, el cual rompe liberando los monosacáridos que lo componen, ácido glucurónico (GlcA) y *N*-acetilglucosamina (GlcNAc). Por lo tanto, la hialuronidasa podría desempeñar un papel en la patogénesis neumocócica permitiendo el acceso de la bacteria a los tejidos del huésped para su colonización, y facilitando la dispersión del microorganismo entre distintos tejidos (Paton y cols., 1993).

S. pneumoniae produce una proteasa que rompe las inmunoglobulinas IgA1 humanas en un punto determinado de la zona bisagra, liberando así los fragmentos Fab y Fc (Male, 1979; Plaut, 1983). Los fragmentos Fab mantienen la especificidad por el antígeno, uniéndose a éste y, de este modo, bloquean la unión de las IgA1 intactas, protegiendo a la

bacteria de la acción del sistema inmune del huésped (Mallet y cols., 1984; Mansa y Kilian, 1986). Esta proteasa de IgA1 podría cumplir una misión importante a la hora de anular la inmunidad local en la mucosa del huésped, principalmente desempeñada por inmunoglobulinas de la clase A, facilitando, por tanto, la colonización de la nasofaringe por la bacteria.

Existen, además, otros factores de patogenicidad: 1) neumococo secreta varias enzimas con actividad serín-proteasa que degradan el tejido conjuntivo del huésped (Courtney, 1991), 2) posee una o varias proteasas de superficie con capacidad para degradar las subunidades α y β del factor C3 del complemento (Angel y cols., 1994), 3) el peróxido de hidrógeno producido por el metabolismo de neumococo resulta tóxico para las células del epitelio alveolar (Duane y cols., 1993), 4) neumococos con un mayor nivel de actividad aldolasa-proteasa son más patógenos, 5) un mutante incapaz de utilizar hemina como fuente de hierro es menos patógeno en animales (Tai y cols., 1993), y 6) el factor de opacidad puede estar implicado en procesos de patogénesis (Saluja y Weiser, 1995).

3. POLISACÁRIDOS EXTRACELULARES. GENERALIDADES

Bajo la denominación de polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos se agrupan una gran variedad de homo o heteropolisacáridos que son activamente secretados al exterior de la célula microbiana. Dentro de este grupo existen grandes diferencias, no siempre fáciles de reconocer, que proporcionan criterios para su clasificación.

La mayoría de los polisacáridos bacterianos muestra una alta especificidad inmunológica, y son producidos únicamente por un tipo, un grupo, o un especie bacteriana, estando generalmente compuestos por unidades repetitivas de oligosacáridos. Por otro lado, existen polisacáridos que son elaborados por bacterias pertenecientes a distintos grupos o familias, y que normalmente tienen una estructura menos regular. Los polisacáridos pueden estar unidos, de forma covalente o no, a la superficie de la célula, lo que les confiere una apariencia más o menos regular alrededor de la bacteria, o carecer de esta unión, con lo que el polisacárido aparece de forma irregular, recibiendo entonces el nombre de capa mucosa o mucílago.

Además de los polisacáridos propiamente dichos, existen en los microorganismos otros polímeros cuyo principal, pero no único, constituyente son carbohidratos. Así, en la

superficie de las bacterias Gram-negativas se encuentran los lipopolisacáridos (LPS), constituidos por una parte lipídica que se inserta en la membrana externa, una región central compuesta por un oligosacárido que incluye dos azúcares poco frecuentes, y una parte polisacarídica, la cadena O, responsable de la variabilidad antigénica, mucho más larga que la zona central y formada por unidades repetitivas de tetra o pentasacáridos. Otro ejemplo, es el peptidoglicano de la pared celular, en el cual las cadenas polisacarídicas están unidas entre sí mediante cadenas peptídicas cortas (Kenne y Lindberg, 1983).

Cuando el polisacárido se encuentra recubriendo de forma regular a la célula, pudiendo estar unido covalentemente o no a la pared celular, constituyendo la parte más externa de la superficie de la bacteria, se denomina cápsula *sensu stricto* (Roberts, 1995); frecuentemente, la capa mucosa e incluso estructuras de las envueltas celulares de bacterias Gram-negativas como el LPS, son también considerados como estructuras capsulares en sentido laxo (Orskov y Orskov, 1990). Por otro lado, en ciertos casos, la cápsula se presenta en forma de estructuras filamentosas ancladas en la pared celular denominándose glicocáliz (Nester y cols., 1995).

4. POLISACÁRIDO CAPSULAR

El término cápsula se aplica habitualmente al exopolisacárido que forma una capa que permanece adherida a la superficie celular, formando un revestimiento de una extensión limitada, aunque a veces se disponga de forma más dispersa. Las variaciones en la forma de la cápsula se dan principalmente por la cantidad de polisacárido que se sintetiza y por su grado de solubilidad en el medio. La cápsula no es una estructura esencial para la viabilidad del microorganismo, al menos cuando se cultiva en el laboratorio, ya que existen muchas bacterias que no la producen, y aquellas que lo hacen pueden perderla mediante mutaciones, sin que ello tenga ningún efecto sobre el crecimiento (Stanier y cols., 1988). A pesar de este hecho, la cápsula desempeña diversas funciones importantes, siendo, por ejemplo, el principal factor de virulencia de gran parte de los microorganismos patógenos como ya se señaló anteriormente. El polisacárido capsular es, además, responsable de la variabilidad antigénica de muchas especies bacterianas.

4.1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS POLISACÁRIDOS CAPSULARES

Los polisacáridos capsulares poseen, generalmente, una estructura compleja y presentan una gran variabilidad, debida tanto a los azúcares que la componen, como a los enlaces que los unen. Del mismo modo, el polisacárido puede encontrarse unido a la superficie bacteriana. Esta unión puede ser covalente o no, permitiendo el anclaje a la pared celular, en el caso de bacterias Gram-positivas; así se ha demostrado la existencia de una unión covalente en el caso del serotipo 6A de neumococo (Sørensen y Blom, 1992) y en estreptococos de grupo B de serotipo III (Yeung y Mattingly, 1986) o a la membrana externa cuando se trata de microorganismos Gram-negativos. En este último caso, la unión puede realizarse mediante varios tipos de moléculas de anclaje (Whitfield y Valvano, 1993), lo que constituye uno de los criterios de clasificación de los polisacáridos capsulares de bacterias Gram-negativas. La variabilidad se manifiesta tanto en microorganismos Gram-negativos como en Gram-positivos. Esta variabilidad, sin embargo, no se presenta en todos los microorganismos capsulados; así, se conocen hasta el momento 6 serotipos distintos en *H. influenzae* (Kenne y Lindberg, 1983), 12 en *N. meningitidis* (Jennings, 1990), 5 en *S. agalactiae* (Jennings, 1983; Wessels y cols., 1987), y 1 en *S. pyogenes* (Wessels y cols., 1991). Por otro lado, los distintos tipos capsulares, varían en cuanto a su capacidad inmunogénica; así, existen polisacáridos cuya estructura es idéntica o muy similar a ciertos poli u oligosacáridos de la superficie celular, de la matriz extracelular del huésped, o de fluidos corporales como la sangre, el líquido sinovial, o el líquido cefalorraquídeo (Hoffmann y cols., 1982; Navia y cols., 1983), como en el caso de *S. pyogenes* cuya cápsula de ácido hialurónico le confiere la capacidad de mimetizarse cuando infecta al hombre, ya que es químicamente indistinguible del presente en el tejido conjuntivo de éste (Kendall y cols., 1937). Es interesante señalar que la patogenicidad de una especie bacteriana varía en función del serotipo y del huésped que dicha especie colonice, y así unos tipos capsulares son más frecuentes en aislados clínicos que otros. En el caso de neumococo, existen notables diferencias respecto a la frecuencia de los serotipos encontrados en aislados clínicos entre pacientes adultos o niños (Robbins, 1978; Austrian, 1985; Nielsen y Henrichsen, 1992) y entre aislados de distintos países (Fenoll y cols., 1991; Jennings, 1990; Lee, 1987). Del mismo modo, existe variación cuando se estudia las frecuencias de serotipos de un país o zona geográfica a lo largo del tiempo. En el caso de estreptococos del grupo B, las estirpes de serotipo III son mucho más virulentas que las del resto de

serotipos (Ia, Ib, II y IV) siendo las responsables del 66% de todas las infecciones causadas por estos microorganismos; es más, si se consideran sólo las meningitis, el serotipo III es el causante de entre el 80 y el 90% de los casos (Baker y Kasper, 1985). Asimismo, de los 6 serotipos capsulares que se han descrito en *H. influenzae* (a, b, c, d, e, f) el serotipo b es el causante principal de las meningitis en niños menores de 5 años, con una tasa de mortalidad de entre el 5 y el 10% (Jennings, 1990).

4.2. FUNCIÓN Y SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LA ENCAPSULACIÓN

Hasta el momento se han atribuidos dos funciones principales a los polisacáridos capsulares:

a) Facilitar la adsorción o adherencia de la bacteria a diferentes superficies del huésped, como epitelios, raíces, o dientes. Este fenómeno tiene gran importancia en enfermedades bacterianas, fundamentalmente en las causadas por bacterias que colonizan mucosas, ya que constituye uno de los primeros pasos de la entrada del microorganismo en el huésped. Se ha observado que los polisacáridos de la superficie bacteriana están frecuentemente implicados en las interacciones bacteria-huésped. Los receptores de la célula del huésped que reconocen residuos del polisacárido capsular pertenecen a una familia de proteínas denominadas lectinas, que se definen como proteínas no enzimáticas ni de tipo inmunoglobulina que poseen, al menos, un dominio de unión a carbohidratos (Mandrell y cols., 1994). Así, se ha postulado que los polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* serotipo 14 y de estreptococos del grupo B, tras una reacción de eliminación de un residuo de ácido siálico, serían receptores potenciales para lectinas presentes en células epiteliales. La desialización puede producirse en condiciones ácidas o por la acción de las neuraminidasas del huésped (Mandrell y cols., 1994).

b) Proteger al microorganismo de la acción bactericida del sistema inmunológico del huésped. La cápsula, cuando existe en un microorganismo, representa el primer punto de contacto entre la bacteria y las células o los componentes solubles del sistema inmunológico y, por tanto, debe jugar un papel importante en las interacciones que dan como resultado la muerte o la inmunidad frente a la bacteria en el organismo huésped. El sistema inmunológico humano dispone de dos mecanismos principales para la eliminación de microorganismos: 1) la inmunidad innata o inespecífica, llevada a cabo por fagocitos, el

sistema del complemento, células agresoras naturales (NK de 'Natural Killer') y diversas proteínas solubles, presentes en el suero, como la CRP, y 2) la inmunidad adquirida, basada en la especificidad de los linfocitos y los anticuerpos por un determinado antígeno, en la que intervienen, además, el sistema del complemento y los macrófagos (fagocitos) (Roitt y cols., 1986). Debe tenerse en cuenta que estos dos sistemas no actúan de forma independiente. Así, los anticuerpos producidos por los linfocitos opsonizan el antígeno, permitiendo que los fagocitos lo reconozcan y eliminen. Por otro lado, los macrófagos procesan y presentan determinados epítomos del antígeno a los linfocitos para su reconocimiento y éstos estimulan a los macrófagos, mediante la producción de linfoquinas, a combatir la infección.

La capacidad de los anticuerpos para inactivar los elementos extraños al organismo depende de la colaboración de otro factor, el complemento. Éste consiste en una serie de proteínas presentes en el suero, que actúan de forma inespecífica complementando la acción específica del anticuerpo. En los microorganismos Gram-negativos, el complemento desencadena una serie de reacciones que conducen a la formación de poros en la membrana externa, lo que desemboca en la lisis bacteriana, por acción de la lisozima presente en la sangre (Stanier y cols., 1988). Por otra parte, en las bacterias Gram-positivas, la gruesa capa de peptidoglicano impide el acceso de las proteínas formadoras de los poros a la membrana produciéndose, no la lisis del microorganismo, sino la opsonización de éste y permitiendo de este modo la acción de macrófagos y leucocitos polimorfonucleares sobre él (Brown, 1985). Aunque son muchos los factores que pueden actuar como opsoninas, el factor fundamental es C3b, producido por la rotura específica del tercer factor del complemento (C3), especialmente contra infecciones causadas por bacterias capsuladas (Winkelstein, 1981). Para la ejecución de ambas acciones del sistema del complemento se requiere un paso común, la activación del componente C3, dando lugar a C3b, que se une entonces a la superficie de la bacteria. La activación de C3 puede producirse por dos vías: si hay presentes anticuerpos contra estructuras de la superficie bacteriana, se desencadena la vía clásica o específica, mientras que si el organismo no dispone de dichos anticuerpos, se desencadena la vía alternativa o inespecífica (Roitt y cols., 1986). La actividad de C3b está modulada positivamente por el factor B, el cual activa el sistema completo; por otro lado, los factores H e I modulan negativamente dicha actividad (Cross, 1990). En ausencia de anticuerpos específicos contra la estirpe que invade el organismo, como puede suceder entre la población infantil o durante el primer contacto con el microorganismo, C3b se une en

pequeñas cantidades a la superficie de las bacterias. Este fenómeno se amplifica por la acción del factor B, lo cual desencadena la cascada de reacciones que llevan a la lisis o fagocitosis de la bacteria. Además, C3b expone ciertos dominios que pueden interactuar con linfocitos y promover la producción de anticuerpos y linfoquinas, tales como las interleuquinas (IL) 5 y 6, que estimulan la diferenciación de las células B a células de memoria (Moxon y Kroll, 1990; Liles y van Voorhis, 1995). Por el contrario, en presencia de anticuerpos específicos, la unión de éstos al antígeno desencadena las reacciones de la vía clásica produciendo la activación de C3, que se une a la pared celular y desencadena la serie de reacciones que desembocan en la formación de complejos de ataque a la membrana, o en la opsonización de la bacteria y la consiguiente fagocitosis. Las estructuras bacterianas con capacidad de activar la vía alternativa del complemento, mediante su interacción con C3b, son principalmente el LPS de bacterias Gram-negativas (Cross, 1990), el peptidoglicano (Wilkinson y cols., 1979), los ácidos teicoicos (Winkelstein y Tomasz, 1978) y ciertos polisacáridos capsulares (Winkelstein y cols., 1976; Brown, 1985) en bacterias Gram-positivas.

La acción de los polisacáridos capsulares sobre el sistema inmunológico tiene lugar de dos maneras: impidiendo la unión de los anticuerpos, dirigidos principalmente hacia los componentes de la pared celular, o la fijación de los componentes del sistema del complemento a la superficie celular (Cross, 1990). Estas dos formas de bloquear el sistema inmune se pueden producir mediante la intervención del polisacárido capsular en diversos pasos del proceso de eliminación del agente infeccioso.

Como se ha comentado anteriormente, en la naturaleza se producen polisacáridos capsulares poco inmunogénicos, es decir, que producen una respuesta de anticuerpos muy baja o nula, debido principalmente a su estructura, esto es, al hecho de presentar grandes similitudes con componentes de tejidos del huésped (Moxon y Kroll, 1990; Cross, 1990). Otros polisacáridos pueden interactuar con las células del sistema inmunológico, como en el caso de la cápsula de *Klebsiella pneumoniae* tipo 2, que modula la actividad de las células B en la producción de anticuerpos (Batshon y cols., 1963). Por otra parte, hay que resaltar que muchos de los polisacáridos capsulares son hidrofílicos y confieren carga negativa a la superficie bacteriana, lo que origina una disminución de la tensión superficial de la interfase entre el fagocito y la bacteria, disminuyendo así la capacidad del macrófago de fagocitar y eliminar al microorganismo (Ponder, 1928; van Oss y Gillman, 1973).

Además, puesto que la carga neta de la superficie del fagocito también es negativa, se produce una repulsión mutua. Parece pues claro que la fagocitosis de una bacteria capsulada requiere algún factor que facilite el contacto entre la bacteria y el fagocito. Los factores implicados en este fenómeno son los anticuerpos y algunos elementos del sistema del complemento, principalmente C3b.

Se han descrito multitud de fenómenos en los que la cápsula bacteriana interacciona con estos factores facilitadores de la fagocitosis o los modifica, alterando significativamente su actividad. La cápsula de *E. coli* K1 (Stevens y cols., 1978), así como la de estreptococos grupo B de serotipo III (Edwards y cols., 1982), incrementan la afinidad de C3b unido a la pared celular por el factor H. Del mismo modo, las cápsulas de neumococo pertenecientes a los serotipos 7 y 12 tienen una baja afinidad por el factor B, lo cual da lugar a un aumento relativo de la afinidad por el factor H (Joiner y cols., 1984). Por otra parte, se ha observado en neumococo que, cuando C3b se une a la pared celular bacteriana, la cápsula, si es voluminosa o posee una carga neta negativa considerable, actúa como una barrera que impide a los macrófagos acceder al complejo C3b-pared celular, lo que resulta en una incapacidad de éstos para eliminar el microorganismo (Brown, 1985). Asimismo, se ha visto que cuando una estirpe capsulada de neumococo activa la vía alternativa, el polisacárido no está implicado en este proceso; por tanto, la práctica totalidad de las moléculas de C3b se encuentran unidas a la pared celular y no al polisacárido capsular (Winkelstein y cols., 1976). C3b se encuentra unido a la cápsula únicamente cuando se ha producido la activación de C3 por la vía clásica, es decir, la mediada por la unión al polisacárido de anticuerpos específicos contra éste (Brown y cols., 1983). De este modo, los macrófagos pueden interaccionar de forma no covalente con un dominio presente en C3b y llevar a cabo la fagocitosis de forma eficiente (Isenman y cols., 1981).

5. BIOSÍNTESIS DE POLISACÁRIDOS CAPSULARES

La expresión de polisacáridos capsulares en la célula bacteriana es un proceso bioquímico complejo que incluye una serie de etapas asociadas a distintos compartimentos celulares. En el caso de los microorganismos Gram-negativos, gran parte de estas etapas se encuentran bien caracterizados mientras que, en bacterias Gram-positivas, se conoce relativamente poco sobre estas rutas metabólicas.

Aunque los procesos implicados en la biosíntesis de la cápsula deben ser notablemente diferentes entre organismos Gram-positivos y Gram- negativos, como consecuencia de la gran diferencia estructural existente entre sus respectivas envueltas celulares, existen no obstante ciertos procesos metabólicos que cumplen unas normas comunes.

5.1. PRECURSORES BIOSINTÉTICOS

La primera etapa en la biosíntesis de los polisacáridos capsulares bacterianos consiste en la formación de los precursores o moléculas donadoras de los monosacáridos que formarán la unidad repetitiva; éstos son frecuentemente ésteres glicosídicos de nucleótidos (Shibaev, 1986).

En bacterias Gram-positivas, la parte nucleotídica de estos precursores ha sido identificada generalmente como UDP. Así, en neumococo se conoce desde hace varias décadas la acumulación de varios compuestos de este tipo durante la fase estacionaria de crecimiento, como UDP-glucosa (UDP-Glc), UDP-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) o UDP-galactosa (UDP-Gal). En algunos serotipos de neumococo, sin embargo, pueden encontrarse también otros nucleótidos formando parte de los precursores; así, por ejemplo, en el serotipo 2 existen derivados de TDP y, tanto en el serotipo 6 como en el 34, se encuentran derivados de CDP (Mills y Smith, 1965).

5.2. FORMACIÓN DE LA UNIDAD BÁSICA Y POLIMERIZACIÓN

Tras la formación de los precursores tiene lugar la síntesis de las unidades repetitivas de las que constará el polisacárido y la posterior polimerización de éstas. Se han descrito dos mecanismos de síntesis de polisacáridos en bacterias Gram-negativas diferenciándose, básicamente, en la forma en que se produce la elongación de la cadena del polisacárido (Figura 2). En ambos mecanismos los residuos glicosídicos se unen mediante un ataque nucleofílico a un derivado de un alcohol poliisoprenoide, lo que le confiere carácter hidrofóbico, obteniéndose de este modo dos precursores, las formas mono o difosfato del azúcar unido al intermediario lipídico (Shibaev, 1986; Whitfield y Valvano, 1993). Generalmente, la molécula aceptora del residuo glicosídico es el undecaprenol fosfato (C₅₅-P), también implicado en la biosíntesis del peptidoglicano de la pared celular.

En la primera modalidad de síntesis, la polimerización consiste en que las unidades repetitivas, unidas cada una a un intermediario lipídico, se unen de forma que la última

unidad en incorporarse a la cadena en crecimiento quede a su vez unida al intermediario lipídico; es decir, el crecimiento se produce por la 'cabeza' de la molécula (crecimiento

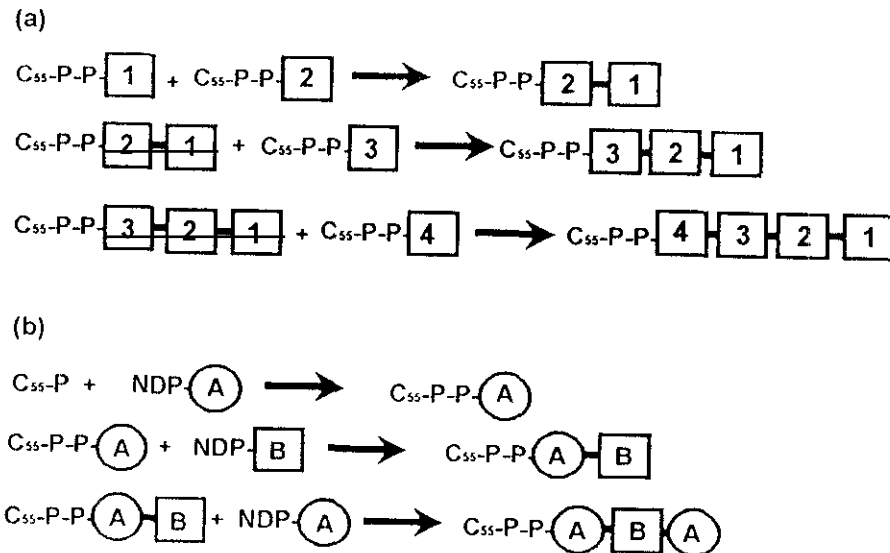


Figura 2. Esquema de los mecanismos de crecimiento de la cadena polisacáridica en bacterias Gram-negativas. (a), crecimiento capital, los números representan unidades repetitivas previamente sintetizadas; (b), crecimiento caudal, las letras A y B representan los monosacáridos que componen la unidad repetitiva.

'capital'), según la terminología sugerida por F. Lipmann en 1968 (citado en Markovitz, 1977). La segunda modalidad tiene lugar mediante la incorporación sucesiva de monosacáridos, a partir de los precursores en forma de derivados de nucleótidos, a una cadena en crecimiento anclada al intermediario lipídico (crecimiento 'caudal') (Whitfield y Valvano, 1993). En cuanto a los microorganismos Gram-positivos en los que los mecanismos que utilizan para la biosíntesis capsular son casi desconocidos, tampoco se ha podido identificar ningún intermediario de la síntesis a pesar de que, a partir de extractos de *S. pyogenes*, se consiguió por primera vez la síntesis de un polisacárido capsular (Markovitz y cols., 1959).

Tanto la activación de los monosacáridos como su polimerización posterior se producen de forma asociada a la membrana citoplasmática, gracias al carácter altamente hidrofóbico del intermediario C₅₅-P (Whitfield y Valvano, 1993). Por otra parte, en algunos microorganismos Gram-positivos, como *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*, se ha demostrado que la síntesis del polisacárido capsular está asociada a la fracción particulada de las células (Markovitz y Dorfman, 1962; Smith y cols., 1961b). Esto indicaría que las enzimas que intervienen en el proceso de polimerización se encontrarían ancladas a la membrana bacteriana. Al contrario de lo que sucede con *S. pyogenes*, en el caso de neumococo todo parece indicar que existe un intermediario aceptor de los monosacáridos, aunque no se conoce su naturaleza química (Mills y Smith, 1965).

5.3. TRANSPORTE Y MODIFICACIÓN DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR

El siguiente paso en la síntesis del polisacárido capsular implica su transporte desde el citoplasma al exterior, en el caso de bacterias Gram-positivas, o al periplasma, si se trata de Gram-negativas. Hasta el momento se han descrito dos mecanismos para llevar a cabo este proceso, mostrados en la Figura 3. Durante la síntesis del LPS de *Salmonella enterica*, y posiblemente también de algunos polisacáridos capsulares, este proceso lo realiza el intermediario lipídico C₅₅-P. Por otro lado, durante la síntesis de los polisacáridos capsulares del grupo II, como los que poseen los serotipos K1 y K5, el transporte se lleva a cabo mediante sistemas especializados que requieren energía (Whitfield y Valvano, 1993), denominados transportadores 'ABC' (por 'ATP-Binding Cassette') (Fath y Kolter, 1993). Recientemente, se han identificado en *E. coli* dos proteínas, KpsM y KpsT, implicadas en el transporte del polisacárido capsular de los serotipos K1 y K5 (Smith y cols., 1990) que poseen un alto grado de similitud con transportadores 'ABC' ya descritos; así, KpsT es una proteína probablemente asociada a la superficie citoplásmica de la membrana interna (Pavelka y cols., 1994) que es capaz de unir ATP *in vitro* (Silver y cols., 1992), mientras que KpsM es una proteína de membrana que posee varios dominios transmembranales (Pavelka y cols., 1991). De este modo, KpsM es la encargada de realizar el transporte valiéndose de la energía obtenida mediante la hidrólisis de ATP llevada a cabo por KpsT.

Mientras que en otras bacterias Gram-negativas, como *H. influenzae* serotipo b y *N. meningitidis* grupo C, se han encontrado sistemas de transporte homólogos al de *E. coli*

(Kroll y cols., 1990; Frosch y cols., 1991) hasta el momento no se han identificado proteínas que ejerzan funciones similares en microorganismos Gram-positivos.

En el caso de bacterias Gram-negativas, es necesario el paso del polisacárido desde el espacio periplásmico hasta la superficie celular, a través de la membrana externa. Este proceso es poco conocido, habiéndose identificado hasta ahora en *E. coli* sólo una proteína periplásmica, KpsD, implicada en el proceso, aunque se sabe que no es la única (Silver y cols., 1987). Por otro lado, existe actualmente una gran controversia sobre la implicación de algunas proteínas de la membrana externa y otras estructuras, como las uniones de Bayer, en el proceso de translocación del polisacárido al exterior celular.

En general, los polisacáridos capsulares presentan una estructura bastante regular, sin embargo, en determinados casos, se observa la existencia de cadenas laterales de forma irregular. Estos sustituyentes pueden ser de diversa naturaleza, aunque lo habitual es que se trate también de carbohidratos. Aunque los mecanismos por los que se produce este fenómeno son variados, en todos los casos descritos hasta el momento, las reacciones de modificación del polisacárido tienen lugar a nivel del oligosacárido unido al intermediario lipídico (Whitfield y Valvano, 1993).

5.4. MECANISMOS DE REGULACIÓN EN LA BIOSÍNTESIS DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR

Durante el cultivo de microorganismos capsulados en el laboratorio se ha observado que, en muchos casos, la producción de cápsula varía según las condiciones de cultivo. Así, en muchas cepas de *E. coli* productoras de ácido colánico, su incubación a 37°C conlleva una disminución en la cantidad de polisacárido producido. Por otra parte, la biosíntesis de este polisacárido puede ser activada variando la composición del medio de cultivo (Markovitz, 1977). Es evidente, por tanto, que deben existir sistemas de regulación de la biosíntesis capsular, que permitan a los microorganismos adaptarse a las diferentes condiciones que se presentan en sus hábitats naturales. La regulación puede producirse a diferentes niveles como la transcripción, la traducción, o mediante reguladores alostéricos.

Se ha descrito un sistema de regulación para la producción de ácido colánico en *E. coli* que consiste en una serie de proteínas que ejercen la función de recibir determinadas señales ambientales y promover cambios intracelulares que conllevan la activación o inhibición de la transcripción de los genes responsables de la síntesis de ácido colánico (Stout y Gottesman, 1990; Gottesman y Stout, 1991; Jayaratne y cols., 1993). Es interesante señalar que algunos

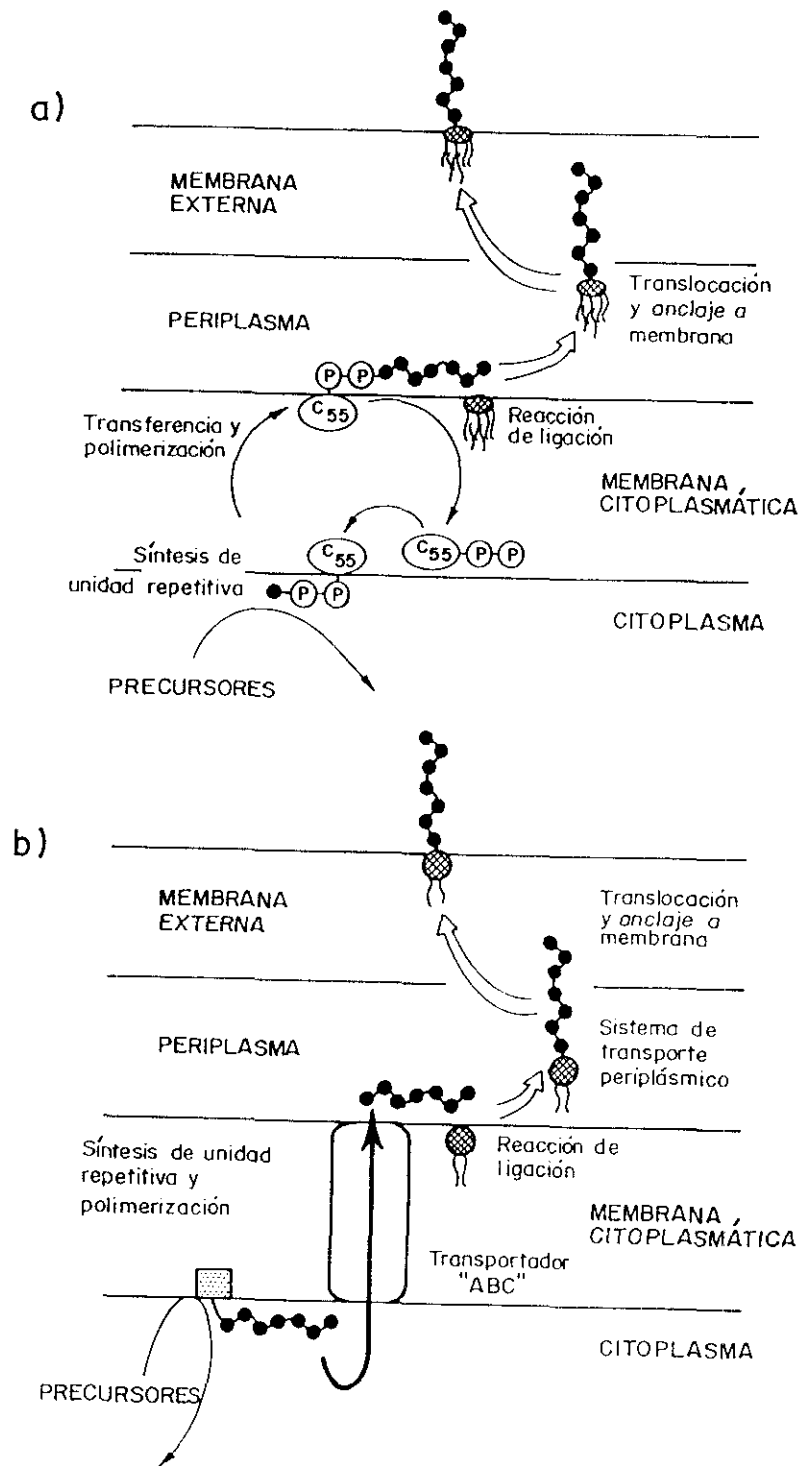


Figura 3. Esquema de los dos modelos de transporte de polisacáridos capsulares a través de las membranas celulares de bacterias Gram-negativas. a) transporte mediado por el undecaprenol fosfato; b) transporte mediado por transportadores ABC. Los círculos negros representan unidades repetitivas de los polisacáridos. C₅₅ y P representan el undecaprenol y el grupo fosfato, respectivamente. Tomado de Whitfield y Valvano, 1991.

componentes de este sistema están implicados también en la regulación de la expresión de otros genes que cumplen diversos papeles en procesos tan importantes como la división celular (Gervais y cols., 1992; Gervais y Drapeau, 1992). Se han descrito sistemas similares a éste en otros microorganismos productores de polisacáridos capsulares. Uno de estos microorganismos es *Pseudomonas aeruginosa* (Whitfield y Valvano, 1993), que produce una cápsula de alginato característica en estirpes aisladas de pulmón de pacientes con fibrosis quística. En este sistema se ha descrito la intervención, además, de otras proteínas que contribuyen a la regulación de la biosíntesis, facilitando la acción de las proteínas efectoras (Deretic y cols., 1991; DeVault y cols., 1991; Boucher y cols., 1996). Se han encontrado asimismo otras formas de regulación, como la activación alostérica de la síntesis, o la inhibición de determinadas actividades enzimáticas por el producto final de éstas (Whitfield y Valvano, 1993).

Por otra parte, en algunos microorganismos cuya síntesis de polisacárido capsular es relativamente inestable, se han descrito varios mecanismos que pueden ser la causa de este fenómeno. El caso mejor estudiado es el de *H. influenzae* serotipo b, que muestra una frecuencia de aparición de mutantes rugosos (no capsulados) que oscila entre el 0,1 y el 0,5%. Esta inestabilidad es el resultado de la estructura del locus *cap*, responsable de la síntesis del polisacárido capsular. Este locus contiene un fragmento de DNA de 18 kb duplicado, estando ambos dispuestos en tándem; sin embargo, una de las copias contiene un gen, el *bexA*, deleciónado, con lo que sólo hay una copia intacta del gen, situada entre ambas repeticiones (Hoiseith y cols., 1986). La alta frecuencia de pérdida de la capacidad de biosíntesis capsular se ha atribuido a un reordenamiento del DNA, mediante recombinación, que puede producir la eliminación total o parcial de la copia funcional de *bexA* del cromosoma bacteriano. Este hecho conlleva la acumulación de polisacárido capsular dentro de la célula, ya que el gen *bexA* está implicado en el transporte del polisacárido al exterior (Kroll y cols., 1988). Por otra parte, la duplicación está flanqueada por secuencias de inserción (*IS1016*), lo que provoca frecuentes amplificaciones del locus *cap* (Kroll y cols., 1991). De este modo, al aumentar el número de copias de los genes implicados en la biosíntesis capsular, se incrementa la cantidad de polisacárido sintetizado (Kroll y Moxon, 1988). Se ha postulado que el aumento en la cantidad de polisacárido secretado se correlaciona con un aumento de la virulencia de la estirpe (Kroll y cols., 1991) aunque, como contrapartida, la disminución o la pérdida de la cápsula puede facilitar la adhesión de

la bacteria al epitelio y por tanto posibilitar la colonización de las mucosas (Hoiseth y cols., 1986). Recientemente se ha observado que, de un total de 66 aislados invasivos de *H. influenzae* tipo b, 23 contenían el locus *cap* amplificado, en algunos casos hasta 5 veces. Además, se comprobó que una estirpe con 5 copias produce seis veces más cantidad de polisacárido que otra que posee 2 copias (Corn y cols., 1993). Estos autores postulan que la disposición en forma duplicada supone una ventaja adaptativa por la capacidad que conlleva de amplificar con rapidez los genes capsulares bajo condiciones en que la producción de más cápsula supone una ventaja como, por ejemplo, cuando el microorganismo debe evadir la respuesta inmune del huésped.

Más recientemente se ha descrito un sistema de regulación de la expresión de genes capsulares en *N. meningitidis*, mediante la inactivación reversible de un gen esencial para la síntesis de ácido siálico, por inserción o excisión de la secuencia de inserción IS1301. Este hecho ocasiona la conversión de una cepa capsulada en no capsulada, lo que permite la adherencia del meningococo al epitelio mucoso, y la posterior invasión del tejido (Hammerschmidt y cols., 1996).

6. GENÉTICA DE LA BIOSÍNTESIS CAPSULAR

Los experimentos genéticos relacionados con la biosíntesis de los polisacáridos capsulares constituyen la base de la biología molecular, ya que fueron los estudios llevados a cabo por Griffith en los años 20 sobre la transformación genética en neumococo (Griffith, 1928) los que permitieron, casi dos décadas más tarde, a Avery y colaboradores identificar al DNA como la base química de la herencia genética (Avery y cols., 1944). A pesar de estos precedentes, y del conocimiento de la implicación de la cápsula bacteriana en la virulencia, conviene señalar que hasta muy recientemente no se han aplicado las técnicas de biología molecular al estudio de los genes que intervienen en la biosíntesis de los polisacáridos capsulares, especialmente en el caso de microorganismos Gram-positivos. Fué en 1981, cuando Silver y su grupo clonaron un fragmento de DNA de 17 kb, perteneciente a una estirpe de *E. coli* K1, que dirigía la síntesis de cápsula de este serotipo en una cepa de serotipo K12 (Silver y cols., 1981). A partir de este momento se produjo un creciente interés en la investigación de las cápsulas bacterianas, aunque en el caso de bacterias Gram-positivas, hubo que esperar hasta 1992 para comenzar a conocer la estructura y

organización de los genes capsulares en bacterias de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus*.

6.1. ORGANIZACIÓN DE LOS GENES CAPSULARES EN BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

Los genes capsulares se localizan en el cromosoma bacteriano y están generalmente dispuestos en grupos, constituyendo una o varias unidades transcripcionales. Contienen la información necesaria para la síntesis de las formas activadas de los monosacáridos, así como para la polimerización de éstos y su posterior translocación a la superficie celular. A su vez, los genes encargados de la regulación de la biosíntesis se disponen generalmente en otros *loci*, habitualmente alejados del grupo de genes biosintéticos. Por otra parte, en determinados casos existen genes del metabolismo general de la célula implicados en la formación de los precursores, y esto sucede cuando dichos genes forman parte de rutas metabólicas generales.

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios en microorganismos Gram-negativos, principalmente en *E. coli*, *N. meningitidis* y *H. influenzae*, que han puesto de manifiesto que la organización de los genes capsulares es común a todos ellos. Según esta disposición, los genes se organizan en tres regiones: una de ellas contiene la información para la biosíntesis de las unidades que componen el polisacárido y su polimerización, mientras que las otras dos contienen los genes encargados de su transporte desde el citoplasma a la superficie bacteriana. De este modo, la primera región es la que determina el serotipo y por tanto difiere entre estirpes de distinta especificidad antigénica, siendo más parecida entre cepas que produzcan cápsulas similares desde el punto de vista químico e inmunológico (Boulnois y Roberts, 1990). Las otras dos regiones están implicadas en funciones comunes a todos los serotipos de una misma especie bacteriana y por tanto, se encuentran conservadas entre los diferentes tipos capsulares (Roberts y cols., 1986, 1988b).

En *E. coli* los genes capsulares se encuentran en dos *loci* distintos, según codifiquen para la síntesis de cápsulas grupo I o II. El locus capsular presente en las estirpes del grupo II, denominado *kps*, se encuentra junto a *serA* (Bachmann, 1990) en el cromosoma de *E. coli* (Ørskov y Nyman, 1974) y está dispuesto en tres regiones funcionales adyacentes (Boulnois y cols., 1987) (Figura 4). La región 2, central, codifica para las funciones de formación de los precursores, su ensamblaje y polimerización y así, cuando se obtienen mutaciones por inserción de transposones en esta región, las estirpes mutantes son incapaces de producir

polisacárido. De este modo, la región 2 refleja la complejidad estructural y química del polisacárido (Boulnois y Jann, 1989). En efecto, la región 2 del locus *kps* en el serotipo K4 es la más grande encontrada hasta el momento, 14 kb, y su unidad repetitiva está constituida por tres monosacáridos diferentes (Drake y cols., 1990), mientras que la misma región en

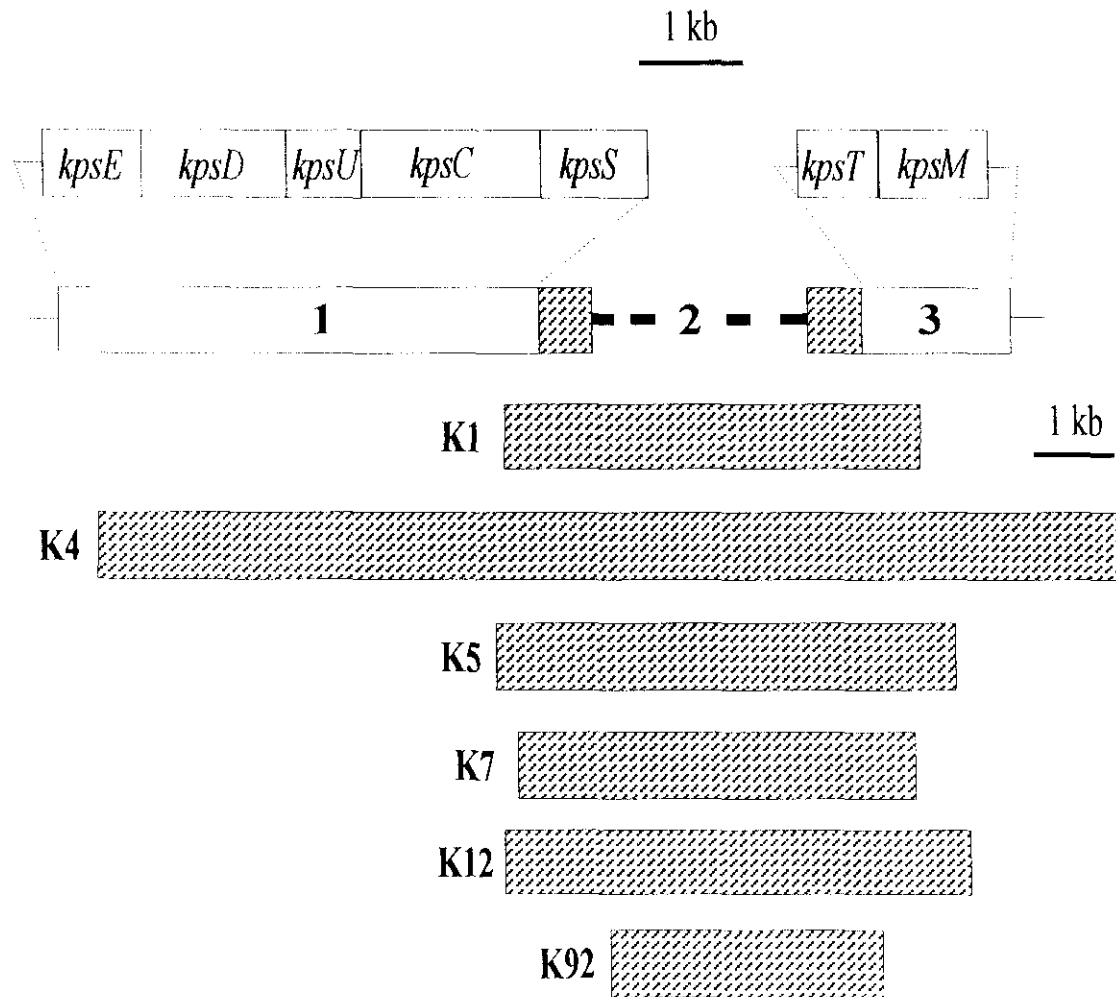


Figura 4. Esquema de organización del locus II de síntesis del polisacárido capsular de *E. coli*. Las zonas sombreadas corresponden a las regiones 2, serotipo-específicas, de varios serotipos, indicados a la izquierda de la figura. En la parte superior se indican los genes contenidos en las regiones 1 y 3.

las estirpes K1, cuyo polisacárido está constituido por un solo tipo de monosacárido, el ácido *N*-acetil neuramínico (NeuNAc), tiene un tamaño de 5 kb (Boulnois y cols., 1987). Recientemente se ha secuenciado la región 2 de una cepa K5, viéndose que contiene cuatro genes dispuestos en tres unidades de transcripción. Dos de éstos se han identificado como una glicosil transferasa, enzima encargada de la incorporación de los monómeros al polisacárido, y una UDP-Glc deshidrogenasa (UDP-GlcDH), que cataliza la formación de ácido UDP-GlcA a partir de UDP-Glc (Petit y cols., 1995; Sieberth y cols., 1995). La región 1 contiene cinco genes (Silver y cols., 1984; Roberts y cols., 1986; Pazzani y cols., 1993), implicados en el transporte del polisacárido desde el periplasma hasta la superficie celular (Echarti y cols., 1983; Timmis y cols., 1985; Boulnois y cols., 1987; Roberts y cols., 1988a; Pazzani y cols., 1993), ya que mutantes en esta región presentan en el periplasma un polisacárido química e inmunológicamente indistinguible del original. La región 3 contiene dos genes, caracterizados en los serotipos K1 y K5 (Smith y cols., 1990; Pavelka y cols., 1991; Pavelka y cols., 1994), denominados *kpsM* y *kpsT*. Cuando estos genes se inactivan por mutación, las estirpes resultantes presentan el polisacárido capsular en el citoplasma, demostrándose así su implicación en el transporte a través de la membrana citoplasmática.

En otros microorganismos se han propuesto modelos similares, como en *N. meningitidis* (Frosch y cols., 1991) y en *H. influenzae* (Kroll y cols., 1990), aunque en este último caso existen ciertas características especiales comentadas en la sección 5.5. Además, en las estirpes de *E. coli* productoras de cápsula grupo I, la organización de sus genes es similar a la de los pertenecientes a serotipos de grupo II (Whitfield y Valvano, 1993), a pesar de que ambos grupos no son alélicos, sino que los de grupo I están localizados junto al locus *his*, adyacentes al *rfb* (Schmidt y cols., 1977; Laakso y cols., 1988; Whitfield y cols., 1989).

6.1.1. RELACIÓN ENTRE GRUPOS DE GENES DE SÍNTESIS POLISACARÍDICA NO ALÉLICOS

Muchas especies bacterianas sintetizan varios polisacáridos de superficie diferentes y por tanto poseen varios grupos de genes para dirigir su biosíntesis. Si entre estos procesos biosintéticos existen intermediarios comunes a varias reacciones, esto puede suponer que existan actividades enzimáticas duplicadas. Así, al inactivarse uno de los genes que dirigen dicha actividad, otro presente en un grupo distinto y situado a cierta distancia en el cromosoma bacteriano puede suplir la falta del primero con lo que la biosíntesis de ambos polisacáridos no se ve afectada (Jayaratne y cols., 1994). Esto ocurre, por ejemplo, cuando

se inactivan los genes *rffD* o *rffE* del grupo de genes de la biosíntesis del antígeno común enterobacteriano (ECA) (Kuhn y cols., 1988), encargados de la síntesis de ácido *N*-acetilmanosaminurónico (ManNAcA), en una estirpe en la que se ha clonado los genes para la biosíntesis de polisacárido capsular K7, que contiene este azúcar en su estructura (Meier-Dieter y cols., 1990). Sin embargo, en algunos casos no existe tal duplicación de la actividad y la mutación del gen responsable de ella conlleva la pérdida de la producción de ambos polisacáridos (Whitfield y Valvano, 1993).

6.1.2. BASES GENÉTICAS DE LA VARIABILIDAD ANTIGÉNICA CAPSULAR

Uno de los principales problemas que surgen a la hora de abordar un tratamiento que bloquee la acción patógena generada por la cápsula de microorganismos virulentos es la gran variabilidad antigénica que presentan los polisacáridos capsulares. Esta variabilidad podría ser el resultado de la presión selectiva que ejercen los mecanismos de defensa del huésped en sus hábitats naturales. En los últimos años, con la aplicación de las técnicas de biología molecular al estudio de los genes capsulares se empieza a comprender la base molecular de esta diversidad. Así, por ejemplo, se ha postulado la evolución, desde un progenitor común, de los distintos loci *kps* pertenecientes a serotipos de *E. coli* de grupo II, debido a la gran similitud existente entre estos grupos de genes (Boulnois y Jann, 1989). Además, se piensa que la evolución de estos loci ha podido tener lugar independientemente de la región cromosómica que ocupa actualmente, habiéndose integrado más tarde en ésta. Sin embargo, se desconoce por el momento si esta evolución se ha producido en otras regiones del cromosoma de *E. coli*, o en elementos genéticos móviles (transposones, plásmidos o bacteriófagos) (Vimr, 1991). Por otra parte, se ha descrito un tercer tipo de grupo capsular, denominado I/II (Finke y cols., 1990) ya que posee características de ambos grupos. Se ha visto que las estirpes productoras de polisacáridos del grupo I/II no poseen los genes de grupo II, sino otro grupo de genes productores de polisacárido aunque situados en la misma región que los del grupo II, es decir, ligados al locus *serA*. Por otra parte, en las cepas de grupo I no existen genes capsulares en esa posición del cromosoma. Además, la zona que flanquea la región I de una estirpe de grupo II se encuentra en la mayoría de las cepas estudiadas independientemente de su serotipo y, en las de los grupo II y I/II, está repetida varias veces a lo largo del cromosoma (Drake y cols., 1993).

La variabilidad antigénica en el caso de *H. influenzae* ha sido explicada por la incorporación de genes mediante transposición. Estas transposiciones estarían facilitadas por la existencia de secuencias de inserción IS1016 flanqueando los genes del locus *cap* en algunas estirpes (Kroll y cols., 1991) como se ha comentado anteriormente (ver sección 5.5). *H. influenzae* es un microorganismo que desarrolla transformación genética de forma natural y, en consecuencia, mediante la incorporación de DNA exógeno y una posterior recombinación con zonas de la región 2 (serotipo-específicas) podría dar lugar a la aparición de nuevos serotipos. Esta incorporación de DNA al cromosoma bacteriano estaría posibilitada por las secuencias de inserción encontradas a ambos lados del locus *cap* (Kroll, 1992).

6.2. ORGANIZACIÓN DE LOS GENES CAPSULARES EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS.

La organización de los genes capsulares descrita para microorganismos Gram-negativos no ha podido ser aún confirmada para el caso de los Gram-positivos; es más, los estudios realizados hasta el momento parecen indicar que, tal vez, ambos sistemas se diferencian de forma significativa. Esto no es extraño, si tenemos en cuenta que en bacterias Gram-positivas, durante el proceso de transporte del polisacárido capsular, éste solamente debe atravesar la membrana citoplásmica. Recientemente, se han clonado los genes responsables de la síntesis de la cápsula de *S. aureus* serotipo 1 (Lee, 1992; Lin y cols., 1994). Es interesante señalar que, dada la alta frecuencia de obtención de mutantes rugosos (no capsulados) en este microorganismo (1,3% a 37°C y hasta 40% a 43°C) se había sugerido que los genes capsulares residirían en elementos genéticos móviles, como plásmidos o bacteriófagos. Sin embargo, se comprobó que la eliminación de dichos elementos no afectaba a la capacidad de producción de cápsula. Los 13 genes capsulares que se encuentran en un fragmento de DNA de 14,6 kb están implicados en la biosíntesis de la cápsula de tipo 1. Ésta se compone de taurina, 2-acetamido-2-desoxi-fucosa y ácido 2-acetamido-2-desoxi-galacturónico en proporción molar 1:2:4. Hasta el momento no existen evidencias claras acerca de la organización transcripcional de estos genes, aunque algunos experimentos parecen indicar que están agrupados en varios operones. Por otro lado, se desconoce la función que ejercen las proteínas codificadas por estos genes aunque, la comparación de las secuencias deducidas de aminoácidos con las presentes en los bancos de datos, muestran ciertas similitudes entre tres proteínas (CapI, CapL y CapM) y otras tantas

pertenecientes al *locus vip* de *S. typhi*, responsable de la síntesis del antígeno Vi (Hashimoto y cols., 1993), compuesto en parte por ácido 2-acetamido-2-desoxi-galacturónico. Parece, por tanto, que estas tres proteínas están implicadas en la síntesis de este azúcar. Además, otra proteína (CapG) posee una similitud notable con la secuencia consenso de una familia de acetiltransferasas procarióticas, por lo que se cree que podría desempeñar esta función (Lin y cols., 1994). Recientemente se ha observado que estos genes forman parte de un elemento genético discreto, específico de las estirpes de serotipo 1, de un tamaño que oscila entre 33,3 y 35, 8 kb. Además, se ha sugerido la posibilidad de que se trate de un bacteriófago defectivo y/o un plásmido integrado en el cromosoma de la bacteria (Lee, 1995).

Por otra parte, se han clonado algunos genes implicados en la síntesis del polisacárido capsular de estreptococos del grupo B de tipo III (*S. agalactiae*), compuesto por cadenas lineales cuya unidad repetitiva es $\rightarrow 4$)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 6)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow , y cadenas laterales de α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal, unidas al C-4 de cada residuo de GlNAc (Kenne y Lindberg, 1983). Así, en un fragmento de DNA de 3,7 kb se han identificado 4 genes completos, denominados *cpsA*, *B*, *C*, *D*; de éstos, únicamente el gen *cpsD* posee cierto parecido con otras proteínas conocidas, encontrándose una notable similitud con la proteína codificada por el gen *rfbP* (Jiang y cols., 1991) que posee actividad galactosiltransferasa, esto es, que cataliza la transferencia de residuos de galactosa al undecaprenol fosfato (Rubens y cols., 1993). La función de los genes *cpsABC* no ha podido ser determinada aún. Muy recientemente, se han identificado, además, dos genes situados en posición 3' respecto de los genes *cpsABCD*, denominados *cpsE* y *cpsF*, encontrándose que la proteína CpsF es una CMP-NeuNAc sintetasa, es decir, la enzima encargada de sintetizar uno de los precursores de la biosíntesis capsular de este microorganismo (Haft y cols., 1996).

Otro de los microorganismos Gram-positivos donde se han identificado los genes que dirigen la biosíntesis de la cápsula es *S. pyogenes*. Como se ha comentado anteriormente, este microorganismo, perteneciente al grupo A de estreptococos, produce un único tipo de polisacárido capsular compuesto de ácido hialurónico, cuya unidad repetitiva es $\rightarrow 4$)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow (Kenne y Lindberg, 1983). De manera prácticamente simultánea, dos grupos de investigación han clonado recientemente los genes necesarios para la producción de cápsula, denominados *hasA* y *hasB* (Dougherty y van de Rijn, 1992,

1993, 1994, DeAngelis y cols., 1993a, b), y se ha caracterizado la función de las proteínas codificadas por ellos (Dougherty y van de Rijn, 1993, DeAngelis y cols., 1993a). Así, HasA es una hialuronan sintasa, una enzima probablemente anclada en la membrana, encargada de la polimerización del ácido hialurónico, mientras que HasB es una UDP-GlcDH. Mediante mutación por inserción con el transposón Tn916 se comprobó que ambos genes son indispensables para la producción de cápsula en *S. pyogenes*, y que forman parte de la misma unidad transcripcional (Dougherty y van de Rijn, 1994). Por otra parte, se demostró que un plásmido que contiene aparentemente sólo estos dos genes era capaz de producir ácido hialurónico en *E. coli* y en *Enterococcus faecalis*, un microorganismo al que nunca se ha descrito como capsulado (DeAngelis y cols., 1993a). Asimismo, HasA es bastante similar a la proteína NodC de *Rhizobium*, implicada en la síntesis de oligómeros de quitina [β -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc]; así, parece que HasA actuaría como una β -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc transferasa. Ya que la síntesis de hialuronato requiere además una actividad β -(1 \rightarrow 3)-GlcA transferasa, parecería necesaria la presencia de otra enzima con esta actividad (Dougherty y van de Rijn, 1994). Sin embargo, se ha sugerido que HasA podría llevar a cabo ambas reacciones (DeAngelis y cols., 1993b). Es más, estos mismos autores han demostrado que, en estirpes de *E. coli* K5 que sintetizan UDP-GlcA para la producción de su propio polisacárido capsular, sólo es necesaria la presencia del gen *hasA* para que se sintetice ácido hialurónico. Por otro lado, se ha observado que la estructura primaria de la enzima HasA se encuentra altamente conservada entre distintas estirpes de estreptococos del grupo A, mientras que otro factor de virulencia, la proteína M, varía considerablemente entre estas cepas (DeAngelis y cols., 1994). Además, se ha purificado la enzima HasA mediante el uso de anticuerpos monoclonales y se ha comprobado su capacidad para producir *in vitro* un polímero de alto peso molecular (DeAngelis y Weigel, 1994). Por otra parte, partiendo de la observación de la pérdida de la cápsula, al llegar a la fase estacionaria del crecimiento (van de Rijn, 1983), mediante estudios de transcripción del operón *has*, se ha observado que la regulación de la producción de ácido hialurónico en *S. pyogenes* tiene lugar a nivel transcripcional (Crater y van de Rijn, 1995). En el operón *has* se incluye un tercer y último gen, denominado *hasC* (Dougherty y van de Rijn, 1993), que codifica para una enzima con actividad UDP-Glc pirofosforilasa, esto es, que sintetiza UDP-Glc a partir de glucosa-1-fosfato (Glc-1-P) y UTP (Crater y cols., 1995).

7. ESTUDIOS SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE POLISACÁRIDOS CAPSULARES EN NEUMOCOCCO

Como ya se ha comentado anteriormente, hasta el momento se han descrito 90 serotipos capsulares en neumococo, química e inmunológicamente diferentes entre sí. Las tablas 1 y 2 muestran, en aquellos casos bien conocidos, los monosacáridos que componen cada serotipo, así como los que se encuentran más frecuentemente en aislados clínicos, respectivamente. Durante dos décadas, entre los años 1950 y 1970, se llevaron a cabo numerosos estudios acerca de los procesos bioquímicos que tienen lugar durante la biosíntesis capsular, así como sobre los factores genéticos subyacentes. Uno de los casos mejor estudiados es el del serotipo 3, debido a que la estructura química de su polisacárido es muy sencilla, estando constituida por unidades repetidas de ácido celobiurónico [$\rightarrow 4$]- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow)] (Reeves y Goebel, 1941).

Tabla 1. Estructura química de algunos polisacáridos capsulares de neumococo

1	$\rightarrow 3$)- α -Sugp-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow) ^a
2	$\rightarrow 4$)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- β -L-Rhap-(1 \rightarrow 2 ↑ 1 α -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp
3	$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow)
5	$\rightarrow 4$)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -L-FucpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -Sugp-(1 \rightarrow) ^b 3 ↑ 1 α -L-PnepNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcpA
8	$\rightarrow 4$)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Galp-(1 \rightarrow)
14	$\rightarrow 6$)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4 ↑ 1 β -D-Galp
19F	$\rightarrow 4$)- β -D-ManpNAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1-PO ₄ ⁻ \rightarrow)

^a Sugp, 2-acetamido-4-amino-2, 4, 6, trideoxy-D-galactosa; ^b Sugp, 2-acetamido-2, 6-dideoxi-D-xylohexos-4-ulosa; Rha, ramnosa; FucpNAc, N-acetil fucosamina; Man, Manosa; ManpNAc, N-acetil manosamina; PnepNAc, 2-acetamido-2, 6-dideoxi-L-talosa.

7.1. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

Los estudios acerca de la biosíntesis del polisacárido capsular de neumococo revelaron ciertos principios que parecen poder aplicarse a muchos otros sistemas de síntesis de polisacáridos. Así, se describió que fracciones particuladas de células rotas de *S. pneumoniae* catalizaban la incorporación de las formas activadas de azúcares a moléculas serológicamente reactivas (Smith y cols., 1960b). En el caso del serotipo 3, estas formas activadas son UDP-Glc y UDP-GlcA. Por otra parte, este tipo de compuestos se acumulan en el citoplasma de neumococo, cuando se cultiva en el laboratorio, hasta la fase estacionaria del crecimiento (Smith y cols., 1957a, b; 1959b). Algunos monosacáridos se encuentran en todas las estirpes, independientemente del serotipo al que pertenezcan. Éstos, por tanto, deben formar parte de rutas metabólicas generales y, en ciertos casos, también en la síntesis del polisacárido capsular. Otros, tales como UDP-GlcA y UDP-GalA, sólo se detectan en células de serotipos en los que el azúcar o algún derivado suyo formen parte del polisacárido capsular. Estos nucleótidos, por tanto, son serotipo-específicos (Mäkelä y Stocker, 1969). Se han identificado, además, algunas de las enzimas que catalizan la conversión de estos nucleótidos; así, las que intervienen en la conversión hacia precursores serotipo-específicos son a su vez específicas (Smith y cols., 1957a; 1958a, b; 1959b; 1960a; 1961a). Según los estudios realizados, se concluyó que la Glc-1-P es el precursor central para la síntesis de todas las unidades glicosílicas de los polisacáridos de neumococo (Smith y cols., 1965).

Otras conclusiones extraídas de esta serie de estudios es que los pasos implicados en la síntesis capsular son:

- 1) La formación de los precursores de los azúcares que formarán el polisacárido capsular, mediante la acción de enzimas, algunas comunes y otras serotipo-específicas.
- 2) La transferencia de los azúcares desde las moléculas donadoras hasta el polisacárido, mediante la acción de enzimas con actividad glicosiltransferasas serotipo-específicas.

En el caso concreto del serotipo 3, estas enzimas han sido bien estudiadas bioquímicamente. Se han detectado dos enzimas implicadas directamente en la síntesis del polisacárido capsular de tipo 3, una de ellas presenta actividad UDP-GlcDH y requiere la reducción de NAD a NADH en una relación estequiométrica de 1:2 (UDP-GlcA:NADH).

Tabla 2. Distribución de serotipos o serogrupos en aislados clínicos de *S. pneumoniae*

	1950		1960	
	Nivel mundial	España	Nivel mundial	España
1	3 (9,1)	3 (14)	14 (13,3)	6 (16)
2	1 (8,9)	9 (9)	6B (10,7)	23 (14)
3	14 (7,9)	19 (9)	18C (8,2)	19 (13)
4	7F (7,8)	23 (7)	19F (7,0)	14 (8)
5	4 (6,6)	6 (7)	1 (7,0)	1 (6,5)
6	6 [A+B] (6,3)	7 (6)	7F (6,9)	5 (6,5)
7	8 (5,1)		23F (6,3)	
8	23F (4,4)		19A (4,9)	
9	9V (3,6)		6A (4,8)	
10	19F (3,6)		4 (3,4)	

Las cifras entre paréntesis indican el porcentaje de los aislados que pertenecen a ese serotipo o serogrupo. ¹ Nielsen y Henrichsen (1992); ² Fenoll y cols. (1991).

Su presencia se ha detectado únicamente en aquellas estirpes cuyo polisacárido incluye UDP-GlcA o compuestos sintetizados a partir de éste (Smith y cols., 1957b; 1958a, b; 1960a). Del mismo modo, se describieron las condiciones de actuación de la enzima; así, se encontró que su pH óptimo era 8,4 y que se activaba por Mg^{2+} ; del mismo modo se describió que en su actividad estaba implicado algún residuo sulfhidrilo (-SH) ya que la enzima se inactivaba rápidamente por la acción del peróxido de hidrógeno, evitándose este efecto mediante agentes como el tioglicolato potásico (Mills, 1960).

Por otra parte, se describió la acción de un sistema enzimático con actividad glicosiltransferasa, encargado de transferir los azúcares al polisacárido capsular de serotipo 3 (Smith y cols., 1960b). Se vio que este sistema se encuentra presente en la fracción particulada de extractos celulares de neumococo, y que para su actividad óptima requería Mg^{2+} , pH 8,4 y una temperatura de 32°C. Además, se describió la dependencia de la actividad glicosiltransferasa, de la presencia de cierta cantidad de polisacárido tipo 3 que funcionaría como iniciador y al que se iría añadiendo el polisacárido sintetizado *de novo* (Smith y cols., 1961b; Smith y Mills, 1966).

Por otro lado, se estudió la síntesis *in vitro* de polisacárido capsular de serotipo 14 a partir de los UDP-derivados de los monosacáridos que lo componen y se describió así, la síntesis simultánea de dos compuestos de naturaleza glicolípida. El papel desempeñado por estos compuestos durante la biosíntesis capsular se desconoce, aunque se sugirió que podrían intervenir como iniciadores de la síntesis, es decir, como aceptores iniciales de los monosacáridos, o como intermediarios lipídicos del proceso biosintético (Distler y Roseman, 1964; Distler y cols., 1966).

En general, mediante el análisis de los nucleótidos presentes en el citoplasma de células de neumococo de distintos serotipos, se encontró que el mecanismo de formación de los distintos compuestos precursores de la síntesis de los polisacáridos capsulares era similar al descrito en hígado de mamíferos (Mills y cols., 1958). Así, para las estirpes capsuladas de serotipos 1 y 3 se propuso el mecanismo mostrado en la Figura 5.

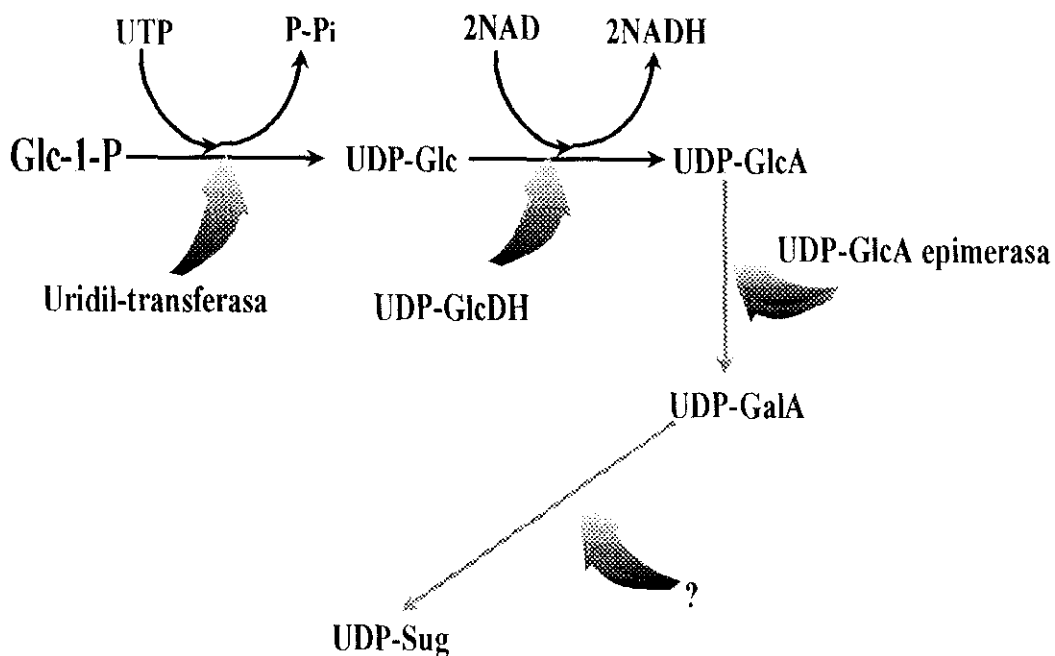


Figura 5. Ruta de síntesis de los precursores de los polisacáridos capsulares de los serotipos 1 y 3 de *S. pneumoniae*. Las flechas grandes indican las enzimas que catalizan los diferentes procesos bioquímicos, representados mediante flechas finas. Las reacciones específicas del serotipo 1 se representan mediante flechas finas sombreadas y las comunes a ambos serotipos están indicadas por flechas finas negras. UDP-Sug, 2-acetamido-4-amino-2, 4, 6, trideoxy-D-galactosa. ?, indica un proceso bioquímico no caracterizado.

7.2. ESTUDIOS GENÉTICOS

Mediante el análisis de mutantes rugosos espontáneos se obtuvieron numerosos datos acerca de los elementos genéticos que dirigen la biosíntesis capsular en *S. pneumoniae*. Por un lado, se estudiaron las deficiencias bioquímicas ocasionadas por las mutaciones y por otro, mediante experimentos de transformación genética, las relaciones entre los distintos genes responsables de la biosíntesis capsular. Así, a partir de cepas capsuladas de serotipo 3 se obtuvieron mutantes rugosos deficientes en UDP-GlcDH que no sintetizan UDP-GlcA; sin embargo, extractos obtenidos de estos mutantes incubados con UDP-Glc y UDP-GlcA todavía eran capaces de sintetizar polisacárido de serotipo 3, lo cual demostraba que el sistema glicosiltransferasa se encontraba intacto en dichos mutantes (Smith y cols., 1960b; 1961a). Sin embargo, los mutantes obtenidos a partir de una estirpe de serotipo 1 fueron de tres clases, en función de su defecto bioquímico: 1) deficientes en UDP-GlcDH, 2) deficientes en UDP-GlcA epimerasa (enzima que convierte UDP-GlcA en UDP-GalA), y 3) deficientes en el sistema glicosiltransferasa (MacLeod y Krauss, 1947; Jackson, 1962).

Por otro lado, se realizaron transformaciones genéticas 'intratipo', es decir, experimentos en los que mutantes no capsulados eran transformados con DNA extraído de estirpes capsuladas del serotipo original de dichos mutantes, con lo cual se obtienen estirpes transformantes que han recuperado el fenotipo capsulado. Además se hicieron transformaciones utilizando, como donador, DNA extraído de mutantes no capsulados distintos de la estirpe receptora, pudiéndose determinar de este modo que la mayor parte de las mutaciones obtenidas partiendo de cepas de serotipo 3 se encontraban próximas en el cromosoma (Ephrussi-Taylor, 1951b). En concreto, se analizaron 21 mutantes R espontáneos aislados independientemente, de tal modo que todas las combinaciones en parejas de cepas donador-receptor de 20 de ellas, producían transformantes capsulados; asimismo se comprobó que la cepa restante contenía un defecto adicional en alguna otra enzima implicada en la síntesis capsular y podría ser un mutante de delección (Bernheimer y cols., 1968). Por otra parte, se observó que las cepas capsuladas podían ser transformadas con DNA extraído de cepas rugosas obteniéndose así transformantes no capsulados, aunque con baja frecuencia, ya que las cepas capsuladas poseen una eficiencia de transformación notablemente reducida (Ravin, 1959; Ephrussi-Taylor, 1951a, b). A este respecto cabe decir que, en una mayoría sustancial de los casos, las cepas capsuladas que no se transforman poseen algún tipo de defecto en la producción del factor de competencia o activador, que

puede ser revertido mediante la adición de dicho activador al medio de cultivo (Yother y cols., 1986; Håvarstein y cols., 1995).

Del mismo modo, se hicieron experimentos de transformación genética 'intertipo'. En algunos casos ello supone que el nuevo polisacárido sintetizado contenga azúcares no presentes en el polisacárido original, lo cual supondría la adquisición de nuevos genes. Estas transformaciones implican la pérdida de determinadas actividades enzimáticas y, por tanto, de sus genes correspondientes (Austrian y cols., 1959). Por tanto, la transformación 'intertipo' habitual consiste en el cambio de un grupo de genes por otro y puesto que algunas veces estos grupos son muy distintos, al implicar la existencia de un proceso de recombinación homóloga, los puntos de sinapsis deben incluir regiones homólogas situadas a ambos lados del grupo de genes serotipo-específicos (Mäkelä y Stocker, 1969). Además, algunas veces, cuando se transforma una estirpe rugosa con DNA de una cepa capsulada de serotipo distinto al original del receptor, se obtienen individuos capsulados del serotipo de la cepa donadora, así como otros del mismo serotipo que el original del receptor. Este hecho se debe a que el grupo de genes del DNA donador posee un gen homólogo al gen mutado en la cepa receptora con lo cual, se puede producir una recombinación que afecta únicamente al gen mutado restaurándose así su actividad (Hayes, 1966).

Otro fenómeno que ha permitido obtener datos de gran interés acerca de la disposición de los genes capsulares fue observado por Austrian y Bernheimer (1959) cuando, al transformar algunas estirpes rugosas de serotipo 3, deficientes en UDP-GlcDH, utilizando un DNA donador extraído de una estirpe capsulada de serotipo 1 obtuvieron, además de transformantes de serotipo 1, individuos que reaccionaban con antisueros frente al polisacárido de tipo 3 (suero anti-S3) y también, aunque de forma más débil, con suero anti-S1. A estos individuos se les denominó 'binarios' 1-3, ya que sintetizaban ambos tipos de polisacáridos. Mediante análisis genéticos se comprobó que estos individuos contenían el grupo de genes parentales (serotipo 3-específicos) mutado, así como el grupo de genes donador (serotipo 1-específicos). En éste se encuentra un gen que codifica para la UDP-GlcDH del serotipo 1, la cual suple la deficiencia en esta enzima del grupo de genes de tipo 3. De este modo, el UDP-GlcA sintetizado por la enzima de serotipo 1 es utilizado para la síntesis de ambos tipos de polisacáridos. En estos individuos binarios, el grupo de genes donadores se habría insertado en el cromosoma, en una región distinta a la que habitualmente contiene los genes capsulares (Austrian y cols., 1959). Cuando el DNA de

una estirpe 'binaria' se utiliza como donador en un experimento de transformación en el que la cepa receptora no capsulada proviene de un serotipo distinto al 1 ó al 3, se obtienen transformantes de tres clases:

I) no capsulados con un genotipo capsular de tipo 3; II) capsulados de serotipo 1, y III) capsulados con fenotipo 'binario'. Estos últimos se dan con una frecuencia muy baja, por lo que podrían ser atribuidos a una transformación doble más que a la transformación con un fragmento de DNA conteniendo ambos grupos de genes. Por tanto, estos dos grupos de genes no se encuentran próximos en el cromosoma de *S. pneumoniae* y la obtención de estirpes 'binarias', está supeditada a la existencia de intermediarios comunes a ambas rutas biosintéticas capsulares y de genes comunes o fragmentos de éstos repetidos en otras zonas del cromosoma bacteriano (Austrian y cols., 1959).

En resumen, los resultados de los estudios citados indicaban que los genes para la síntesis del polisacárido capsular se encuentran ligados y pueden transferirse formando un elemento único durante la transformación genética (Ephrussi-Taylor, 1949). Asimismo, se propuso el modelo por el cual los genes capsulares serotipo-específicos forman una agrupación tipo casete, intercambiable mediante transformación, dando lugar así al cambio de serotipo en la cepa receptora; esta casete ocuparía la misma región del cromosoma en todos los neumococos, independientemente del serotipo, y estaría flanqueada por regiones altamente conservadas en todos los serotipos que contendrían, posiblemente, genes capsulares implicados en funciones comunes de la síntesis del polisacárido (Ephrussi-Taylor, 1951b; Austrian y cols., 1959; Bernheimer y Wermundsen, 1972). Sin embargo, una excepción al modelo de la casete de genes capsulares la constituyen las estirpes 'binarias'; en este caso no se produce un intercambio de casetes capsulares, sino que ambas permanecen en el cromosoma en regiones distintas y alejadas entre sí, presumiblemente como resultado de un proceso de recombinación no homóloga.

Por otra parte, hace muy pocos años se ha comenzado a aplicar las técnicas de biología molecular al estudio de los genes capsulares. En efecto, en nuestro laboratorio se clonó y secuenció por vez primera un fragmento de un gen capsular de neumococo, denominado *cap3-1*, implicado en la síntesis del polisacárido capsular de tipo 3. Se vió además que la región situada a un lado de éste gen estaba presente en todos los serotipos analizados mediante experimentos de hibridación (García y cols., 1993). Algún tiempo después y durante el desarrollo de esta tesis, Dillard y Yother clonaron algunos fragmentos de DNA

situados en torno al gen *cap3-1*, que ellos denominaron *cpsA*, con los que transformaban ciertos mutantes rugosos de tipo 3, restaurando de este modo el fenotipo capsulado (Dillard y Yother, 1994). Más recientemente, estos mismos investigadores han encontrado otros genes implicados probablemente en la síntesis de la cápsula de tipo 3 y han sugerido las posibles funciones que las proteínas codificadas por ellos podrían tener en este proceso, aunque estas proteínas no han sido expresadas en ningún sistema heterólogo y su función no ha podido ser determinada de manera directa (Dillard y cols., 1995).

Asimismo, también muy recientemente, se han clonado algunos genes implicados en la síntesis del polisacárido capsular del serotipo 19F de neumococo. Así, mediante la inserción en el cromosoma de plásmidos incapaces de replicar en neumococo, de su posterior rescate y del empleo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han identificado seis genes completos (denominados *cps19fA-F*) y uno incompleto (*cps19fG*) constituyendo lo que parece ser una única unidad transcripcional. Mediante la inactivación de cada uno de estos genes por inserción-duplicación (Morrison y cols., 1984) se ha propuesto que todos ellos están implicados en la biosíntesis capsular, aunque no se pudo excluir la existencia de efectos polares. Además, se ha comprobado que los genes *cps19fA* y *cps19fB* hibridaban con DNAs pertenecientes a todos los serotipos de neumococo, los dos siguientes genes del operón (*cps19fC* y *D*) lo hacen sólo con algunos serotipos, mientras que los genes *cps19fE*, *cps19fF* y *cps19fG* parecen estar presentes únicamente en el DNA de estirpes del serotipo 19F (Guidolin y cols., 1994).

En resumen, la organización de los genes capsulares en bacterias Gram-positivas, y concretamente en *S. pneumoniae*, no se ha dilucidado aún, aunque todo parece indicar que, si bien no es igual en su conjunto a la disposición encontrada en Gram-negativas, los genes serotipo-específicos se encuentran agrupados y flanqueados por regiones de DNA altamente conservadas, las cuales podrían estar implicadas en la biosíntesis capsular.

II.- OBJETIVOS

Como hemos indicado en la Introducción de esta Tesis, en los últimos años se está produciendo, un aumento espectacular de las resistencias de neumococo a los antibióticos, especialmente a los β -lactámicos y más concretamente a la penicilina. A raíz de este hecho, se hace necesario un mayor conocimiento de los factores de patogenicidad de este microorganismo, y principalmente de la cápsula polisacáridica, que constituye el principal factor de virulencia de *S. pneumoniae*. Por ello, el estudio de los procesos bioquímicos que dan lugar a la biosíntesis de la cápsula de neumococo así como de la genética que subyace a dichos procesos, puede resultar de gran utilidad a la hora de desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento y prevención de las infecciones causadas por dicho microorganismo. A pesar de que los procesos genéticos de la síntesis capsular de *S. pneumoniae* han sido objeto de investigación durante varias décadas, habiendo dado lugar a descubrimientos trascendentales para el desarrollo de la biología moderna, las técnicas del DNA recombinante no se han aplicado al análisis de los factores que controlan la formación de la cápsula hasta hace muy poco tiempo y, por tanto, se tienen pocos datos moleculares acerca de los genes que dirigen la síntesis capsular así como de las proteínas codificadas por los mismos.

Tomando como punto de partida lo anteriormente expuesto, los Objetivos de la presente Tesis son los siguientes:

- A) Clonación, identificación y análisis molecular de los genes que dirigen la biosíntesis del polisacárido capsular de serotipo 3 de *S. pneumoniae*.**

- B) Caracterización de las funciones desempeñadas durante la biosíntesis capsular de *S. pneumoniae* por las proteínas codificadas por los genes capsulares.**

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTIRPES BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las estirpes bacterianas y los plásmidos que se detallan en la Tabla 3, y los oligonucleótidos sintéticos descritos en la Tabla 4.

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas se conservaron congeladas a -70°C en medio de cultivo al que se añadió glicerol al 10% (v/v) (concentración final). En el momento de sembrar las cepas, se descongelaron, incubándose en los medios correspondientes a 37°C , a menos que se indique lo contrario, con agitación cuando se trataba de cepas de *E. coli* y sin agitación para las de *S. pneumoniae*.

Los cultivos de *E. coli* se sembraron en medio LB (Sambrook y cols., 1989), añadiendo agar al 1,5% (p/v) para cultivos en medio sólido. La concentración de antibiótico añadida al medio LB para el cultivo de cepas resistentes fue, salvo que se indique lo contrario, de $100\ \mu\text{g ml}^{-1}$ para la ampicilina (Ap), $10\ \mu\text{g ml}^{-1}$ para la tetraciclina (Tet), $0,5\ \text{mg ml}^{-1}$ para la eritromicina (Ery) ó $20\ \mu\text{g ml}^{-1}$ para el cloranfenicol (Cm). El crecimiento de los cultivos de *E. coli* se siguió por turbidimetría a $600\ \text{nm}$ (A_{600}) con un espectrofotómetro Shimadzu UV-260.

Para el cultivo de *S. pneumoniae* se utilizó el medio C+Y: CpH8 (Tomasz, 1970) suplementado con extracto de levadura 0,08% (p/v) (Difco). Para cultivos en medio sólido, se añadió al medio anterior agar al 1,5% (p/v) y catalasa ($250\ \text{unidades ml}^{-1}$) (Boehringer Mannheim) aunque, en otros casos, se utilizaron placas de agar-sangre [Agar de soja tripticaseína (Hispanlab), suplementado con 5% de sangre desfibrinada de carnero]. Las cepas de neumococo que contienen derivados de pLSE1 (Ronda y cols., 1988) se seleccionaron suplementado el medio correspondiente con $1\ \mu\text{g ml}^{-1}$ de lincomicina (Lin). La multiplicación de este microorganismo se siguió por nefelometría con el empleo de un nefelómetro Coleman modelo 9, calibrado para el recuento de células viables donde $1\ \text{N} = 7,5 \times 10^5$ unidades formadoras de colonias (UFC) ml^{-1} .

Tabla 3. Estirpes bacterianas y plásmidos

Estirpe/plásmido	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia/origen
<i>E. coli</i>		
TG-1	F ⁺ (<i>lacI^h lacZΔM15</i>)	Gibson, 1984
DH1	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Low, 1968
DH5α	($\phi 80lacZ\Delta M15$) <i>endA1 recA1, hsdR17 (r_K⁻ m_K⁻) supE44 ΔlacU169</i>	Hanahan, 1983
C600	<i>thi-1, leuB, thr-1</i>	Appleyard, 1954
DH10B	F ⁺ <i>mcrA Δ(mrr hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL endA1 mupG</i>	Life Technologies
JM109(DE3) ^a	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (r_K⁺ m_K⁻) relA1 supE44 λ⁻ Δ(lac-proAB)</i> [F ⁺ <i>traD36 proAB lacI^hZΔM15</i>]	Promega
BL21(DE3) ^a	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻)</i>	Studier, 1991
MC4100	F ⁻ <i>araD139 Δ(argF lac)U169 rpsL.150 (Str^r) relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Silhavy y cols., 1984
FF4001	MC4100 <i>galU95</i>	Giæver y cols., 1988
<i>S. pneumoniae</i>		
R6	S2 ⁻	Ottolenghi y Hotchkiss, 1962
M23	Δ <i>lytA32</i> S3 ⁻	García y cols., 1993
M24	Δ <i>lytA32</i> S3 ⁻	"
M11	S2 ⁻	Sánchez-Puelles y cols., 1986
M31	Δ <i>lytA</i> S2 ⁻	"
M32	Δ <i>lytA32</i> S2 ⁻	López y cols., 1986
406 ^b	S3 ⁻	J. Casal
A66R2	S3 ⁻	Austrian y cols., 1959
NS3-1 ^c	Δ <i>lytA32</i> S3 ⁻	Esta tesis
NR3-1 ^d	LytA ⁻ S3 ⁻	"

Estirpe/plásmido	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia/origen
NR3-2 ^e	LytA ⁻ S3 ⁻	"
NR3-4 a NR3-16 ^e	LytA ⁻ S3 ⁻	"
M25 ^f	Δ lytA32 S1 ⁻	M. Mollerach
13868 ^b	S1 ⁻	A. Fenoll
15783/94 ^h	S2 ⁻	"
49450 ^b	S3 ⁻	"
13888 ^b	S4 ⁻	"
12065 ^b	S5 ⁻	"
8595/95 ^b	S5 ⁻	"
12928 ^b	S6 ⁻	"
13587 ^b	S7 ⁻	"
13583 ^b	S8 ⁻	"
6028 ^b	S8 ⁻	"
13805 ^b	S9 ⁻	"
13783 ^b	S14 ⁻	"
8249 ^b	S19A ⁻	Liu y Tomasz, 1985
12950 ^b	S23 ⁻	A. Fenoll
13548 ^b	S33 ⁻	"
<i>S. oralis</i>		
NCTC 11427 (cepa tipo)		Kilpper-Bälz y cols., 1985
Plásmidos		
pUC18	Ap ^R	Vieira y Messing, 1982
pUC19	Ap ^R	Yanisch-Perron y cols., 1985
pFB9	erm ^C	Barany y cols., 1982

Estirpe/plásmido	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia/origen
pLSE1	<i>ermC</i> , Tc ^R	Ronda y cols., 1988
pUCE191	<i>ermC</i> , Tc ^R	Esta tesis
pLysS	Cm ^R	Studier, 1991
pT7-4	Ap ^R	Tabor, 1990
pT7-7	Ap ^R	Tabor, 1990
pBR325	Ap ^R , Cm ^R , Tc ^R	Bolivar, 1978
pGL40	Ap ^R Tc ^R	Sánchez-Puelles y cols., 1986
pGL65	Ap ^R	"
pXF405	<i>recP</i>	Rhee y Morrison, 1988

^a Estas cepas llevan integrado en su cromosoma el bacteriófago λ DE3, que porta el gen que codifica para la RNA polimerasa del bacteriófago T7 de *E. coli*.

^b Aislado clínico del serogrupo o serotipo indicado.

^c Estirpe construida mediante transformación de M32 con DNA de la cepa 406.

^d Mutante rugoso espontáneo de la estirpe M23.

^e Mutante rugoso espontáneo de la estirpe NS3-1.

^f Estirpe construida por transformación de M24 con DNA de la cepa 13868.

^g Resistencia constitutiva.

Tabla 4. Oligonucleótidos sintéticos.

Nombre	Secuencia 5'→3'
CAP3APR1	TAGCACCGCTAAAGACAGTCC
PCAP3	CGAGGTCATTGGTCAGCAGAAAGTA
PCAP3B	CTATACACGCGATT CATATGGCAGAG
PCAP6	CTCTGCTTCATTAAGCAACAACC
PCAP7	CCGCCCAACGAATAAGAATAAAGAC
PCAP10	GATTGAAAACACCCTAGCTCAAGAAG
PCAP11	GAAGTCGCATTTAAACGATTGGTCAG
PCAP12	TAAAGCAGCTATACAGGATGTGATG
PCAP13	CCATAAAGCTCTGAATAGTTGCAATAC
PCAP20	GAAAGAGGACTGTAGT CATATGAAAATTG
PCAP21	GTGTGCCAGCCCTGCAGC
PCAP22	TATAACCGCCCA TGCATA AGAATAAAGAC

Las secuencias subrayadas indican dianas de restricción creadas por los oligonucleótidos durante la amplificación mediante PCR y en las que los nucleótidos en negrita corresponden a los que no coinciden con la secuencia mostrada en la figura 10.

3. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

E. coli se transformó utilizando el método con RbCl (Hanahan, 1983) o bien mediante electroporación (Dower y cols., 1988).

La preparación de cepas competentes de neumococo ha sido descrita por Tomasz (1970). Los cultivos de neumococo poseen competencia natural en una determinada etapa del crecimiento (a una concentración celular comprendida entre 280 y 300 N). Una vez que el cultivo alcanza esta concentración celular, se le añade glicerol al 10% y se congela rápidamente en una mezcla frigorífica de etanol y nieve carbónica. Las células conservadas a -70°C mantienen la competencia sin pérdida apreciable durante largos periodos de tiempo. El método de transformación utilizado fue esencialmente el descrito por Barany y Tomasz (1980), excepto que la incubación con el DNA transformante se realizó a 30°C durante 30

minutos en medio CpH8 suplementado con seroalbúmina bovina al 0,08% (p/v). Después, los cultivos se incubaron a 37°C durante 90-120 minutos en medio C+Y suplementado con seroalbúmina bovina al 0,08% (fase de expresión), antes de ser inoculados a 37°C en el medio sólido adecuado. Cuando fue necesario aumentar la proporción de células capsuladas en la suspensión, se favoreció la aglutinación y sedimentación de las células rugosas mediante la adición al medio de expresión de antisuero anti-R (0,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$).

4. OBTENCIÓN DE MUTANTES RUGOSOS DE *S. pneumoniae*

Los mutantes espontáneos no capsulados de neumococo se aislaron mediante subcultivos repetidos de la estirpe parental capsulada en medio C+Y o en agar-sangre, tal y como se describió anteriormente (García y cols., 1993). Asimismo se aislaron mutantes rugosos de neumococo utilizando la técnica de inserción-duplicación (Morrison y cols., 1984), con las siguientes modificaciones: un fragmento interno de cada gen se clonó en el plásmido pUCE191 y el plásmido recombinante así obtenido se utilizó para transformar la estirpe M23 de neumococo. A continuación, se seleccionaron los transformantes Lin^R y se observó su fenotipo capsulado o rugoso, que fue posteriormente confirmado mediante la técnica de 'Quellung' (ver más adelante).

5. SEROTIPADO

La presencia de cápsula en neumococo se puso de manifiesto mediante la reacción de 'Quellung'. Para ello se extendió una gota de una suspensión de neumococo sobre un portaobjetos y se secó al aire. A continuación se depositó una gota de antisuero anti-neumococo al que se le había añadido una gota de azul de metileno y al cabo de unos minutos, se examinó la preparación al microscopio con objetivo de inmersión. La cápsula parece de este modo estar hinchada y se visualiza como un halo claro rodeando a la bacteria; este efecto se produce como consecuencia de un aumento en el índice de refracción del polisacárido al reaccionar con los anticuerpos. Los antisueños usados fueron suministrados por el Staten Seruminstitut de Copenhague, Dinamarca.

6. EXTRACCIÓN DE DNA

Para la extracción de DNA cromosómico en pequeña escala a partir de cepas de neumococo LytA⁻, se utilizaron 10 ml de un cultivo en medio C+Y a una concentración aproximada de 800 N. Este cultivo se centrifugó a $10.000 \times g$, durante 5 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en 0,4 ml de tampón fosfato sódico 20 mM, pH 6,9 y se añadieron 25 μ l de una solución 0,5 M de EDTA (pH 8,0). A continuación se añadieron entre 5 y 10 μ g de amidasa LytA (García y cols., 1987) y se incubó a 37°C durante 20 minutos, tras lo cual se trató la suspensión con 50 μ l de una solución de desoxicolato sódico (DOC) al 10% y se incubó a 37°C hasta observar la lisis total de la suspensión. A continuación, se añadieron 5 μ l de una solución de RNasa a 10 mg ml⁻¹ y se incubó una hora a 37°C. Después se agregó *Proteinasa K* (concentración final 150 μ g ml⁻¹) y se incubó una hora a 37°C. A continuación, se añadieron 0,5 ml de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 15 minutos a temperatura ambiente, desechando la fase orgánica. A la fase acuosa se agregaron 50 μ l de una solución 3M de acetato potásico (pH 4,8) y 1 ml de etanol absoluto, enfriando la mezcla durante 20 minutos a -20°C, tras lo cual se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 5 minutos. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se secó al vacío durante 10 minutos. El DNA así precipitado se disolvió a temperatura ambiente en 0,5 ml de TE [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA].

Cuando se purificó el DNA de una cepa de neumococo LytA⁻, las células se resuspendieron en 0,4 ml de una solución compuesta de 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 30 mM EDTA, 0,4% sarkosyl y 0,1% Triton X-100 (Morrison, 1978) y se incubaron a 37°C hasta producirse la lisis total. El resto del proceso se llevó a cabo de la manera descrita anteriormente, omitiendo la adición de acetato potásico antes de precipitar el DNA.

La extracción de DNA a gran escala de cepas LytA⁻ de neumococo se realizó siguiendo el método descrito por Fenoll y cols. (1994). En el caso de cepas LytA⁻ se partió de 400 ml de cultivo y se efectuó de manera similar a la descrita para la preparación en pequeña escala aumentando 40 veces las cantidades de los reactivos usados. Tras la lisis de las células se procedió siguiendo el método descrito para las cepas LytA⁻.

La preparación de plásmidos a partir de las cepas de *E. coli* se realizó utilizando el método de Birnboim y Doly (1979) tal y como lo describen Sambrook y cols. (1989). En

ocasiones, los plásmidos se purificaron en gradientes de CsCl-bromuro de etidio según se describe en Sambrook y cols. (1989).

La concentración de DNA se estimó a partir de la absorbancia de la solución a 260 nm (A_{260}). Una solución de DNA de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ posee una A_{260} de 1, cuando se utilizan cubetas de 1 cm de paso óptico.

7. EXTRACCIÓN DE RNA

La cepa 406 de *S. pneumoniae* se incubó en medio C+Y (30 ml) hasta unos 500 N. Las muestras se centrifugaron y lavaron con TEC (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA). Las células se lisaron con 0,4 ml de TEC conteniendo 0,1% de DOC, congelándose dos veces en nitrógeno líquido. Posteriormente, se añadieron 50 μl de SDS al 10% y 50 μl de acetato sódico 2 M pH 4,0. A continuación, se añadieron 500 μl de fenol equilibrado con agua (fenol fundido conteniendo hidroxiquinoleína al 0,1% (p/p) y equilibrado con tres volúmenes de agua) a 60°C, se mezcló enérgicamente y se incubó a 60°C durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron recuperándose la fase acuosa y extrayéndose el RNA mediante dos tratamientos a 60°C con 400 μl de fenol equilibrado con agua y precipitándose posteriormente con etanol absoluto. El RNA se disolvió en el volumen adecuado de TEC. El DNA presente en las muestras se eliminó mediante tratamiento a 37°C durante una hora con DNAsa I libre de RNasa (Pharmacia) en presencia de un inhibidor de RNasas (RNAsine de Boehringer). La concentración de RNA se estimó sabiendo que una unidad de A_{260} equivale a una concentración de $40 \mu\text{g ml}^{-1}$. Para determinar la pureza del RNA, las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 1% y se almacenaron a -70°C.

8. ELECTROFORESIS DE DNA

8.1. ELECTROFORESIS CONVENCIONAL

Se utilizaron geles de agarosa al 0,7 ó al 1% en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8,1), utilizando el mismo tampón como electrolito. A las muestras se les añadió 1/4 de su volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 al 30% (p/v), azul de bromofenol al 0,2% (p/v), xilencianol al 0,2% y EDTA 40 mM pH 8,0. La electroforesis se realizó a 100-150 V durante 60-90 minutos y, una vez finalizada, los geles

se tiñeron con bromuro de etidio ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) y los fragmentos de DNA se visibilizaron con radiación ultravioleta. Como marcadores de tamaño, se utilizaron el DNA del fago λ digerido con la enzima de restricción *Bst*EI (Amersham), y la forma replicativa (RF) del DNA del fago ϕ X174 digerido con *Hae*III (New England Biolabs).

8.2. ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE)

La preparación del DNA de *S. pneumoniae* y *S. oralis*, embebido en bloques de agarosa, se llevó a cabo según describieron Gasc y cols. (1991). El DNA se digirió con las enzimas de restricción adecuadas en cada caso. Para la electroforesis se utilizaron geles de agarosa al 1% en TBE-SG (Tris 75 mM, ácido bórico 25 mM, EDTA 0,1 mM) (Stiblitiz y Garletts, 1992). La electroforesis se llevó a cabo a 9°C en este mismo tampón, a 200 V con una rampa ascendente de pulsos de 1 a 40,2 segundos durante 24 horas, utilizando un aparato CHEF-DRII (Bio-Rad). A continuación los geles se tiñeron durante 20 minutos en bromuro de etidio ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$), previamente a su examen bajo radiación ultravioleta. Los marcadores de tamaño utilizados fueron moléculas concatenadas de λ cI857Sam7 (Bio-Rad) y cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Rad).

9. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para llevar a cabo la amplificación se empleó un equipo 'Gene ATAQ Controller' (Pharmacia-LKB) y las enzimas *Pfu* DNA polimerasa (Stratagene) o ReplithermTM DNA polimerasa termoestable (Epicentre) de acuerdo con las instrucciones de los proveedores. Las condiciones de amplificación se especificarán en cada caso. Los productos amplificados se purificaron utilizando β -Agarasa (New England Biolabs) o con el 'kit' GeneClean (Bio 101).

10. SECUENCIACIÓN DE DNA

La secuenciación manual de DNA se realizó según el método de Sanger y cols. (1977). Para la reacción de secuenciación se utilizó el 'T7 SequencingTM Kit' (Pharmacia) y como nucleótido marcado radiactivamente, $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ ($3,7 \times 10^{13}$ Bq mmol^{-1}) (Amersham), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Durante la última parte de esta tesis, la secuenciación se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático modelo Abi Prism 377™ (Applied Biosystems). Para la reacción de secuenciación se utilizó el 'Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit' de Applied Biosystems, y la DNA polimerasa AmpliTaq FS, siguiendo las recomendaciones de los suministradores. Las reacciones se llevaron a cabo mediante la técnica de PCR con un termociclador 'Gene Amp PCR System 2400' de Perkin-Elmer.

La secuenciación directa de los productos de la técnica de PCR se llevó a cabo con el 'fmol DNA Sequencing System' de Promega, de acuerdo con las indicaciones de los proveedores.

Para el análisis de las secuencias de DNA se utilizó el paquete de programas del 'Winsconsin Genetics Computer Group' (Madison, Winsconsin, USA) (Devereux y cols., 1984). Las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de la de nucleótidos se compararon con las existentes en las bases de datos Swissprot y PIR, así como con las secuencias deducidas de las incluidas en las bases de datos GenBank y EMBL.

11. TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE DNA y RNA

11.1. MARCAJE DE SONDAS

Los fragmentos de DNA marcados radiactivamente (sondas) se obtuvieron mediante la técnica del 'random-primer' utilizando [α -³²P]dCTP ($14,8 \times 10^{12}$ Bq mmol⁻¹, $3,7 \times 10^5$ Bq μ l⁻¹) (Amersham), el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (PolIk), la solución de iniciadores ('primers') y los dNTPs (Pharmacia), según se indica en Sambrook y cols. (1989).

El marcaje de oligonucleótidos sintéticos se llevó a cabo mediante la utilización de la polinucleótido quinasa del bacteriófago T4, utilizando [γ -³²P]ATP ($18,5 \times 10^{13}$ Bq mmol⁻¹, $3,7 \times 10^5$ Bq μ l⁻¹), siguiendo las indicaciones de Sambrooks y cols. (1989).

Los fragmentos de DNA marcados con biotina se obtuvieron mediante la utilización del sistema 'PolarPlex Chemiluminiscent Blotting Kit' (Millipore) de acuerdo con las instrucciones de los proveedores.

11.2. 'SOUTHERN-BLOT'

La hibridación por la técnica de Southern se realizó según el protocolo descrito por Sambrook y cols. (1989). El DNA se transfirió a membranas de nylon 'Immobilon-S' (Millipore) y la hibridación se llevó a cabo a 65°C, con sondas marcadas con biotina de acuerdo con las indicaciones de los proveedores.

11.3. 'DOT-BLOT'

El DNA (aproximadamente 1 µg) fue desnaturalizado por tratamiento durante 10 minutos a 37°C en NaOH 0,5 M; a continuación, se depositó sobre una membrana 'Immobilon-S' (Millipore) utilizando un aparato de 'dot-blot' (Bio-Rad). La membrana se sumergió en solución desnaturalizante (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) durante 1 minuto, se transfirió después a una solución neutralizante [Tris-HCl 0,5 M (pH 7,2); NaCl 1,5 M; EDTA 1 mM] durante 1 minuto y se secó al aire. El DNA se unió covalentemente a la membrana mediante irradiación ultravioleta durante 10 minutos. La hibridación con la sonda marcada con biotina se realizó a 65°C siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la técnica de 'Southern-blot'.

11.4. 'NORTHERN-BLOT'

Tras el aislamiento de RNA, tal como se indicó en el apartado 7 de Materiales y Métodos, las muestras se cargaron en geles de 1% de agarosa conteniendo 2,2 M de formaldehído y se sometieron a electroforesis a 9 V cm⁻¹ durante unas 18 horas. El gel se lavó varias veces contra agua y se trató según describen Sambrook y cols. (1989). La transferencia de RNA se realizó mediante vacío utilizando 20×SCS (SCS 1×: NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM). La membrana se secó durante 30 minutos a 65°C y, posteriormente, se fijó el RNA con radiación ultravioleta (10 minutos). La hibridación con la sonda de DNA marcada con [α -³²P]dCTP, se realizó a 65 °C durante 14 horas.

12. TÉCNICA DE 'PRIMER EXTENSION' PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS SITIOS DE INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

El RNA (20 µg) y el oligonucleótido marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P]ATP (10⁶ cpm) se precipitaron conjuntamente, resuspendiéndose el sedimento en 30

μl de buffer de hibridación [PIPES (*N,N'*-bis[ácido 2-etanosulfónico]-piperazina) 40 mM pH 6.4; EDTA 1 mM; NaCl 0,4 M y 50% formamida], desnaturalizando a 85°C durante 10 minutos e incubando 12 horas a 30°C. El híbrido RNA-oligonucleótido se precipitó con etanol y se disolvió en 10 μl de la mezcla de reacción de la transcriptasa inversa [tampón AMV (1×) (Promega); dNTPs 0,9 mM, pH 7; 0,4 U de RNAsine, y 3 U de enzima (virus de la mieloblastosis aviar, Promega)]. La reacción de extensión transcurre durante una hora a 42°C y se detiene con NaOH a una concentración final de 0,4 M, manteniéndose 12 horas a temperatura ambiente para desnaturalizar los ácidos nucleicos. Posteriormente se neutralizó la mezcla con ácido acético 0,4 M, los ácidos nucleicos se precipitaron con dos volúmenes de etanol absoluto, y se disolvieron en una solución que contiene azul de bromofenol al 0,15%, xilencianol al 0,15%, EDTA 5 mM (pH 7,5) y 48,75% de formamida desionizada. La determinación del sitio de iniciación de la transcripción se llevó a cabo mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% conteniendo 8 M de urea y autorradiografía posterior. Como referencia se utilizó una reacción de secuenciación del plásmido que contiene la zona promotora objeto de estudio.

13. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS (SDS-PAGE)

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en todos los casos en condiciones desnaturalizantes en presencia de SDS. La técnica descrita fue la utilizada por Laemmli (1970) utilizando geles de poliacrilamida en placa (160 mm × 100 mm × 2 mm) a una concentración de entre el 8 y el 15%. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos en presencia del tampón de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; SDS al 2%, β-mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0,005%). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y a 50 mA (corriente constante), utilizando un electrolito que contenía Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M y SDS al 0,1%. Las proteínas de los geles se visualizaron con azul brillante de Coomassie R-250, según se describe en Swank y Munkress (1971). Las proteínas empleadas como marcadores de tamaño molecular se adquirieron de Bio-Rad: fosforilasa b (92,5 kDa), seroalbúmina bovina (66,2 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa) e inhibidor de tripsina (21,5 kDa).

14. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS DE CULTIVOS BACTERIANOS

Para obtener extractos de *E. coli* se cultivaron las células en el medio adecuado a 37°C durante 16 horas (fase estacionaria de crecimiento). A continuación, se diluyó 1/75 (v/v) el cultivo en medio fresco (volumen final 100 ml) y se continuó la incubación el tiempo adecuado a cada caso, tras lo cual se añadió Isopropil β -D-tiogalactósido (IPTG) (0,5 mM, concentración final). La incubación se prolongó el tiempo indicado en cada caso. A continuación, se enfriaron los cultivos a 4°C, se centrifugaron a 6.000 \times g durante 10 minutos y se resuspendieron las células en 5 ml de tampón fosfato sódico 50 mM pH 7,0. Una vez homogeneizada la suspensión, las células se rompieron mediante 3 tratamientos de ultrasonidos de 10 segundos de duración cada uno, empleándose un sonicador MSE modelo MK2 y manteniendo siempre la muestra a 4°C. En determinados casos, la suspensión se centrifugó a 16.000 \times g durante 10 minutos a 4°C para separar la fracción soluble de la particulada, tras lo cual se valoró la fracción proteica de ambas muestras mediante el método de Bradford (1976) y se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE.

Para la obtención de extractos celulares de estirpes de *S. pneumoniae*, éstas se cultivaron en 10 ml de medio C+Y durante unas 6 horas y al alcanzar la fase exponencial tardía de crecimiento, se transfirieron a 100 ml de medio fresco continuándose la incubación hasta alcanzar una turbidez de 500 N. A continuación se enfrió el cultivo a 4°C y se centrifugó a 10.000 \times g durante 20 minutos a esta misma temperatura. Las células se resuspendieron en 3 ml de tampón fosfato sódico 50 mM pH 7 y se sometió la muestra a tres tratamientos de ultrasonidos de 10 segundos cada uno utilizando un sonicador MSE modelo MK2 y manteniendo las células en todo momento a 4°C. El polisacárido capsular presente en el lisado celular obtenido se analizó por inmunodifusión doble en gel.

15. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA N-TERMINAL DE LAS PROTEÍNAS CAP3A, CAP3B Y CAP3C.

La preparación de las muestras se realizó siguiendo exactamente el método descrito por Speicher (1994) y se determinó la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de

las proteínas Cap3A, Cap3B y Cap3C, mediante el método de degradación de Edman. Para ello se utilizó un secuenciador automático modelo 477A (Applied Biosystems).

16. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

16.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD UDP-GLCDH

El ensayo se realizó según el método descrito por Schiller y cols. (1973) modificado de acuerdo a ciertas características de la enzima de *S. pneumoniae* descritas por Mills (1960). La estirpe de *E. coli* conteniendo el gen *cap3A* clonado, se cultivó en 10 ml de LB suplementado con 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ampicilina durante una noche; a continuación se diluyó 1/100 en 100 ml de medio fresco y se continuó la incubación hasta alcanzar una A_{600} de 0,6. A continuación, el cultivo se incubó durante 30 minutos a 30°C, tras lo cual se suplementó con IPTG (0,5 mM, concentración final) la incubación se prolongó durante 75-90 minutos a 30°C, se enfrió el cultivo a 4°C y se centrifugó a esta misma temperatura a 6.000 $\times g$ durante 10 minutos. Las células se lavaron con 50 ml de tampón de ensayo [100 mM Tris-HCl (pH 9,0), 10 mM tioglicolato potásico, 5 mM MgCl_2] y se resuspendieron finalmente en 3 ml del mismo tampón. Las células se rompieron mediante tres tratamientos de ultrasonidos de 10 segundos cada uno, manteniendo la muestra siempre a 4°C. A continuación, se centrifugó el lisado celular a 16.000 $\times g$, durante 15 minutos a 0°C, tras lo cual se recogió el sobrenadante que sirvió como extracto enzimático para el ensayo posterior. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (1976) utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

El ensayo se realizó a 30°C en una cubeta de espectrofotómetro con un volumen total de 1 ml de tampón de ensayo suplementado con 1 mM de UDP-Glc y 2 mM de NAD; la reacción comenzó añadiendo cantidades variables de extracto enzimático. La oxidación de NAD a NADH se determinó midiendo el aumento de A_{340} en un espectrofotómetro Shimadzu UV-260. Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 2 μmoles de NADH por minuto, a 30°C. La relación entre aumento de A_{340} y μmoles de NADH producidos se realizó mediante la aplicación de la ley de Lambert-Beer, cuya ecuación es: $A_{340} = b \times M \times \epsilon$; donde b es la longitud del paso óptico (1 cm), M es la concentración molar de NADH y ϵ es el coeficiente de extinción molar, en el caso del NADH, $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

16.2. IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE REACCIÓN DE LA ENZIMA UDP-GLCDH

Los productos de la reacción se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó un procedimiento modificado del descrito por Holstege y cols. (1982). Tras llevar a cabo la reacción enzimática durante 1 hora en presencia de 250 nCi de UDP-[U-¹⁴C]glucosa ($1,14 \times 10^{10}$ Bq mmol⁻¹), se analizaron 100 µl de la reacción en un equipo de HPLC (Gilson) provisto de una columna de intercambio aniónico Spherisorb-10-SAX (4,6 × 150 mm) (Spherisorb). La elución de la columna se llevó a cabo mediante un gradiente de concentración de fosfato monopotásico. El eluyente A consistió en KH₂PO₄ 20 mM pH 4,1 mientras que el eluyente B contenía KH₂PO₄ 500 mM pH 4,6. El eluyente de alta concentración se añadió al de baja mediante dos gradientes lineales, alcanzando el 6% (v/v) en el minuto 6, y el 100% en el 36. El flujo se mantuvo constante a 1,5 ml min⁻¹. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y se determinó la radiactividad de las mismas con un contador de centelleo 1219 Rackbeta (LKB Wallack).

17. EXTRACCIÓN DE POLISACÁRIDO CAPSULAR DE NEUMOCOCO

El método empleado es una modificación del descrito por Lund y Henrichsen (1978). Esta modificación consiste en la inclusión de, al menos, dos procesos de eliminación de proteínas por tratamiento con cloroformo/alcohol isoamílico (24/1) (v/v). Asimismo, si la estirpe utilizada es un mutante *lytA* se incluyó un paso previo a la lisis con DOC, en el que se trataron las células durante 30 minutos a 37°C, con 5 µg ml⁻¹ de amidasa LytA purificada.

18. MISCELÁNEA

18.1. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE *E. coli*

La preparación de esferoplastos y el fraccionamiento de las células de *E. coli* se realizó según el método descrito por Osborn y cols. (1972). La lisis de los esferoplastos se efectuó mediante resuspensión en agua. De este modo se obtuvieron tres fracciones: a) citoplasmática, b) membranosa, y c) periplásmica. La presencia de polisacárido capsular de serotipo 3 de neumococo en estas fracciones se determinó mediante inmunodifusión doble en gel (ver más adelante).

18.2. MANIPULACIÓN DEL DNA CON ENZIMAS DE USO COMÚN EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Las endonucleasas de restricción se obtuvieron de Boehringer Mannheim, Amersham, Pharmacia o New England Biolabs. La fosfatasa alcalina de intestino de ternera se obtuvo de Boehringer Mannheim, así como la DNA ligasa, Pollk y la polinucleótido quinasa del fago T4. Las enzimas y sus tampones correspondientes se utilizaron siguiendo, en cada caso, las indicaciones recomendadas por las casas comerciales correspondientes.

18.3. INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL

Se siguió el procedimiento descrito por Ouchterlony y Nilson (1973). Sobre un portaobjetos se extendió una capa de agarosa al 1%. Se hicieron unos pocillos en los que se cargaron distintas cantidades de extractos celulares, así como de antisueros serotipo-específicos, y se incubó durante 12-18 horas a 37°C en atmósfera húmeda, tras lo cual se aprecian las bandas de inmunoprecipitación.

18.4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS URÓNICOS

La determinación del contenido en ácidos urónicos del polisacárido purificado y de los ensayos enzimáticos se realizó mediante el test del carbazol (Bitter y Muir, 1962). Para la realización de la gráfica patrón se utilizaron soluciones estándar de ácido glucurónico.

18.5. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES

La determinación de los carbohidratos totales presentes en una muestra se realizó mediante el test de la Antrona (Loewus, 1952).

18.6. DETERMINACIÓN DE LA MASA DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR

Se realizó mediante filtración en gel (Howard y cols., 1971), utilizando Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech).

18.7. PREPARACIÓN DEL ANTISUERO ANTI-R (ANTISOMÁTICO)

El antisuero anti-R se preparó según el método descrito por Ravin (1959) utilizando células pertenecientes a la estirpe R6.

IV.- RESULTADOS

1. CLONACIÓN, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LOS GENES CAPSULARES DEL SEROTIPO 3 DE *S. pneumoniae*

Previamente a la realización de esta tesis, en nuestro laboratorio se había clonado en *E. coli* DH1 un plásmido, denominado pLGL1, que contenía un fragmento de DNA de la cepa 406 de neumococo, que aparentemente englobaba un gen, *cap3-1* (denominado *cap3A* a partir de ahora), implicado en la síntesis del polisacárido capsular de serotipo 3 de neumococo (García y cols., 1993). Además, se había construido una serie de subclones de este plásmido mostrados en la Figura 6. Sin embargo, observamos que al hibridar DNA de la cepa 406 digerido con la enzima *ScaI*, con el plásmido pLGL1, obteníamos dos bandas de hibridación correspondientes a fragmentos de DNA de unos tamaños aproximados de 2,5 y 2,2 kb. Por otra parte, cuando hibridamos este mismo DNA con el plásmido pLGL9, obtuvimos una única banda de hibridación que correspondía al fragmento de 2,5 kb anterior, mientras que cuando utilizamos como sonda el plásmido pLGL10, observamos que la única banda de hibridación obtenida, correspondía al fragmento de 2,2 kb que hibridaba con pLGL1. Por tanto concluimos que durante la clonación de pLGL1 se había producido una fusión de dos fragmentos *ScaI* de DNA, perdiéndose posiblemente un fragmento de DNA de pequeño tamaño en la zona de unión. Además, encontramos que la hibridación del mismo DNA con el plásmido pLGL5 producía las mismas bandas obtenidas con pLGL1, lo cual indicaba que la fusión se había producido en la zona contenida en pLGL5. Por otro lado, mediante un experimento de Southern-blot similar a los anteriores, utilizando como sonda el plásmido pLGL15 (García y cols., 1993), encontramos que la región de DNA implicado en la síntesis capsular, se encontraba en el fragmento *ScaI* de 2,5 kb.

Por otra parte, aislamos varios mutantes no capsulados (rugosos) espontáneos tal y como se indica en el apartado 4 de Materiales y Métodos; dichos mutantes se encuentran descritos en la Tabla 3. Utilizando el plásmido pLGL1 como DNA donador, se realizaron experimentos de transformación de todos estos mutantes rugosos, exceptuando la cepa M24, la cual se había utilizado durante la clonación de pLGL1; en ningún caso se encontraron transformantes capsulados, por lo que se concluyó que las mutaciones presentes en estas estirpes se localizaban en otras regiones del DNA de la estirpe 406.

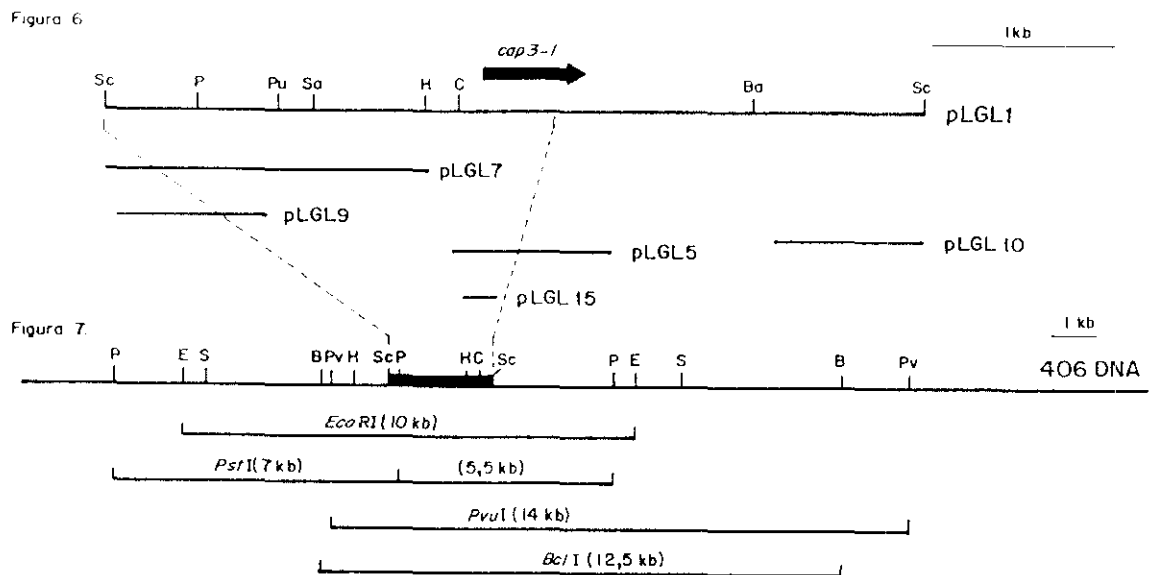


Figura 6. Mapa físico de la región de DNA de neumococo contenida en pLGL1. Ba, *Bam*HI; C, *Cl*aI; H, *H*indIII; P, *P*stI; Pu, *P*vuII; Sa, *S*acII; Sc, *S*caI. La flecha representa la posición del gen *cap3A*. Debajo se muestran los insertos contenidos en algunos plásmidos recombinantes, contruidos a partir de pLGL1, utilizados en este trabajo.

Figura 7. Mapa físico de la región de DNA de la cepa 406 situada alrededor del inserto de pLGL1. La barra negra indica el fragmento *Sc*aI de 2,5 kb contenido en pLGL1 que contiene la región implicada en la biosíntesis capsular. Debajo se representan los fragmentos obtenidos con algunas endonucleasas de restricción y sus tamaños aproximados. P, *P*stI; E, *E*coRI; S, *S*naBI; B, *B*clI; Pv, *P*vuI; H, *H*indIII; Sc, *S*caI; C, *C*laI.

1.1. REALIZACIÓN DE UN MAPA FÍSICO DE LA REGIÓN DE DNA QUE CONTIENE EL GEN *CAP3A*.

Como paso previo a la clonación de esta región, procedimos a realizar un mapa físico de la zona en la que se encontraba el fragmento *Sc*aI de 2,5 kb. Dicho mapa fue elaborado mediante experimentos de Southern-blot hibridando fragmentos de restricción de DNA de la cepa 406 con diversos subclones del plásmido pLGL1, se muestra en la Figura 7.

1.2. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE pKER1

Tal y como se observa en la Figura 7, la endonucleasa *EcoRI* libera un fragmento de DNA de la cepa 406 de un tamaño aproximado de 10 kb, que contiene el fragmento *ScaI* de 2,5 kb donde se encuentra una región implicada en la síntesis capsular. Utilizando el fragmento *EcoRI* como DNA donador en experimentos de transformación genética de los mutantes rugosos espontáneos obtenidos en el laboratorio (Tabla 3), observamos que este fragmento era capaz de producir transformantes capsulados a partir de todos ellos.

Para clonar este fragmento, digerimos DNA de la cepa 406 con *EcoRI* y separamos los fragmentos producidos mediante electroforesis en geles de agarosa, tras lo cual purificamos los fragmentos de aproximadamente 10 kb y los ligamos a pBR325 previamente digerido con *EcoRI* y tratado con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP); utilizamos la mezcla de ligación para transformar *E. coli* DH1, seleccionamos los transformantes Ap^R Cm^S, purificamos los plásmidos contenidos en dichos transformantes y probamos su capacidad para transformar el mutante M24 al fenotipo capsulado. De este modo obtuvimos un plásmido recombinante, denominado pKER1, que contenía un fragmento de DNA de la cepa 406 de aproximadamente 6,5 kb, según se pudo comprobar mediante digestión con distintas endonucleasas de restricción (Figura 8). Por tanto, el fragmento *EcoRI* de 10 kb había sufrido una deleción de aproximadamente 3,5 kb en uno de sus extremos, concretamente en la región donde se encontraba el gen *cap3A*. Mediante transformación de los mutantes rugosos de serotipo 3 con pKER1 comprobamos que, si bien este plásmido contenía un fragmento de DNA capaz de transformar al fenotipo capsulado a varios de ellos, entre los que se encontraba el mutante M24, otros mutantes no se transformaban con pKER1, lo cual indicaba que la deleción incluía regiones de DNA implicadas en la síntesis capsular (ver apartado 6 de esta sección).

1.3. SUBCLONACIÓN DEL INSERTO CONTENIDO EN pKER1

Para facilitar el proceso de secuenciación del fragmento de DNA clonado en pKER1, construimos varios plásmidos recombinantes que contenían diferentes fragmentos del inserto correspondiente (Figura 8). La construcción de estos plásmidos se detalla en la Tabla 5.

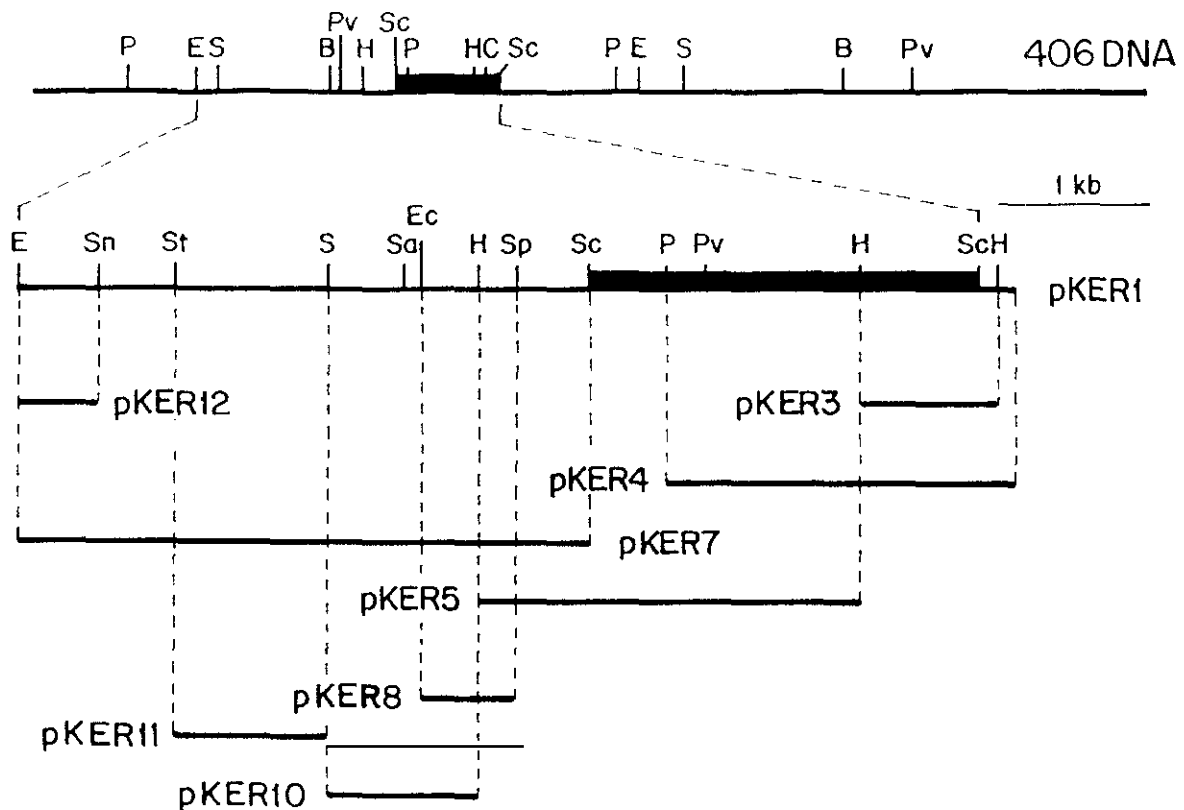


Figura 8. Fragmento de DNA de neumococo contenido en el plásmido pKER1. Sobre el fragmento contenido en pKER1 se muestra la región de DNA situada a ambos lados de este inserto. La barra negra representa el fragmento de 2,5 kb contenido en pLGL1 (Fig. 7). En la parte inferior se indican los insertos de los plásmidos recombinantes construidos a partir de pKER1. E, *EcoRI*; P, *PstI*; S, *SnaBI*; B, *BclI*; Pv, *PvuI*; Sp, *SphI*; H, *HindIII*; Sc, *Scal*; C, *Clal*; St, *StuI*; S, *Sall*; Ec, *Eco47III*; Sa, *SacI*.

Tabla 5. Construcción de plásmidos a partir de pKER1

Plásmido	Inserto de DNA (endonucleasas utilizadas /tamaño)	Vector/endonucleasas utilizadas
pKER3	<i>HindIII</i> /0,9 kb	pUC18/ <i>HindIII</i>
pKER4	<i>PstI</i> /3,2 kb (incluye un fragmento de pBR325)	pUC18/ <i>PstI</i>
pKER5	<i>HindIII</i> /2,5 kb	pUC18/ <i>HindIII</i>
pKER7	<i>EcoRI</i> + <i>Scal</i> /3,5 kb	pUC18/ <i>EcoRI</i> + <i>SmaI</i>
pKER8	<i>Eco47III</i> + <i>SphI</i> /0,7 kb	pUC18/ <i>SmaI</i> + <i>SphI</i>
pKER10	<i>Sall</i> + <i>HindIII</i> /2,1 kb	pUC18/ <i>Sall</i> + <i>HindIII</i>
pKER11	<i>StuI</i> + <i>Sall</i> /1 kb	pUC18/ <i>SmaI</i> + <i>Sall</i>
pKER12	<i>EcoRI</i> + <i>SnaBI</i> /0,5 kb	pUC18/ <i>EcoRI</i> + <i>SmaI</i>

1.4. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE pKER2

Como ya se indicó anteriormente, habíamos comprobado que el fragmento *EcoRI* de 10 kb había sufrido una deleción durante el proceso de clonación. Debido a que la zona delecionada incluía regiones implicadas en la biosíntesis capsular, abordamos su clonación digiriendo los fragmentos *EcoRI* de 10 kb del DNA de la cepa 406, purificados mediante GeneClean tras la electroforesis en un gel de agarosa, con la endonucleasa *ScaI* y los ligamos a pUC18 previamente digerido con *EcoRI* y *SmaI*. Esta mezcla de ligación la utilizamos para transformar *E. coli* DH1, tras lo cual purificamos los plásmidos contenidos en los transformantes Ap^R y probamos su capacidad para transformar el mutante rugoso NR3-6, no transformable con pKER1, al fenotipo capsulado. De este modo obtuvimos el plásmido recombinante pKER2 y se comprobó que era capaz de transformar igualmente al resto de los mutantes rugosos que no eran transformados por pKER1, así como a aquellos que también se transformaban con éste, excepto M24 (ver apartado 6 de esta sección). Mediante el análisis con diferentes endonucleasas de restricción, realizamos un mapa físico del inserto contenido en pKER2 (Figura 9), observándose que contenía un fragmento de DNA de la cepa 406 de neumococo de un tamaño aproximado de 3,5 kb, que contenía el extremo *EcoRI* del fragmento de 10 kb ya aludido.

1.5. SUBCLONACIÓN DEL INSERTO CONTENIDO EN pKER2

Puesto que la mayoría de las mutaciones espontáneas que habíamos seleccionado se localizaban en la región de DNA correspondiente a la incluida en pKER2, procedimos a construir varios plásmidos que contuvieran fragmentos de esta región, para localizar de forma más precisa dichas mutaciones. Por otra parte, estos plásmidos serían de gran utilidad a la hora de secuenciar el fragmento de DNA. Estos plásmidos recombinantes se muestran en la Figura 9 y su construcción se detalla en la Tabla 6. Al igual que en el apartado 3, los fragmentos de DNA obtenidos mediante tratamiento de pKER2 con endonucleasas de restricción fueron purificados por GeneClean y los plásmidos de los transformantes Ap^R, analizados mediante el uso de endonucleasas de restricción.

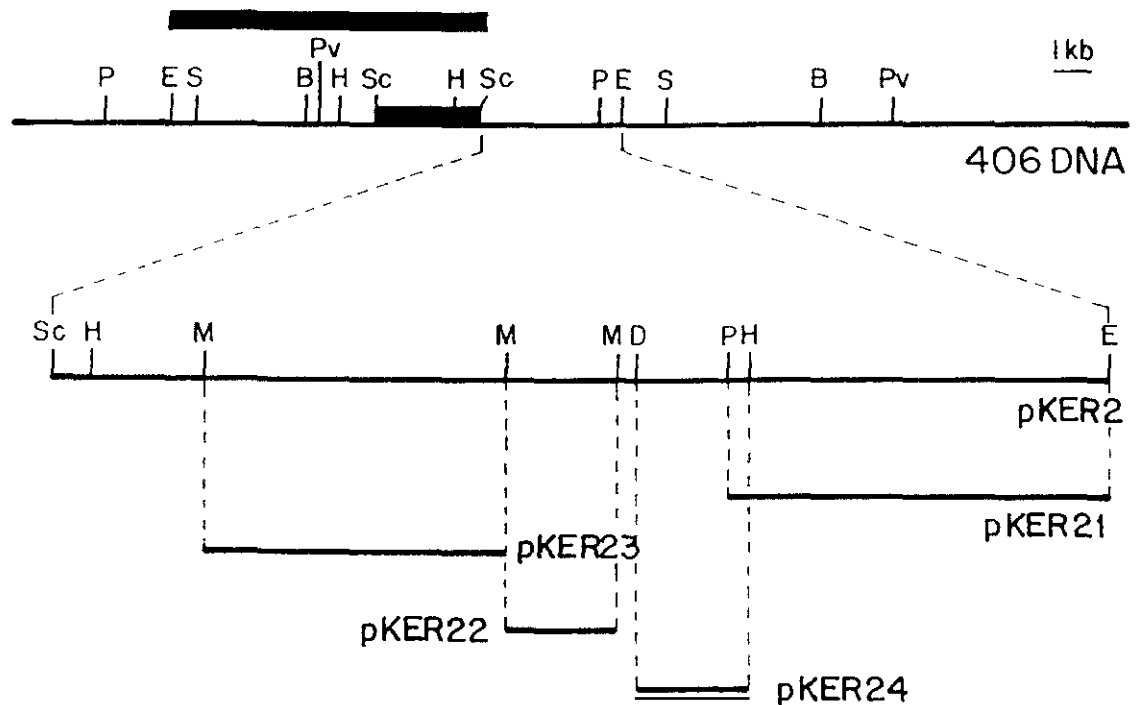


Figura 9. Fragmento de DNA de neumococo contenido en el plásmido pKER2. Sobre el fragmento contenido en pKER2 se muestra la región de DNA situada a ambos lados de este inserto. La barra negra grande indica la posición del inserto de pKER1 (Fig. 8) y la barra pequeña representa la posición del inserto de pLGL1 (Fig. 6). En la parte inferior se muestran los insertos de los plásmidos recombinantes construidos a partir de pKER2. P, *PstI*; E, *EcoRI*; S, *SnaBI*; B, *BclI*; Pv, *PvuI*; H, *HindIII*; Sc, *Scal*; M, *MunI*; D, *DraI*.

Tabla 6. Construcción de plásmidos a partir de pKER2

Plásmido	Inserto de DNA (endonucleasas utilizadas/tamaño)	Vector/endonucleasas utilizadas
pKER21 ^a	<i>PstI</i>	
pKER22	<i>MunI</i> /0,4 kb	pUC18/ <i>EcoRI</i>
pKER23	<i>MunI</i> /1,1 kb	pUC18/ <i>EcoRI</i>
pKER24	<i>DraI</i> + <i>HindIII</i> /0,5 kb	pUC18/ <i>SmaI</i> + <i>HindIII</i>

^a Plásmido construido mediante autoligación de pKER2 digerido previamente con *PstI*.

1498	→	AGTCTTATAGCAAGCACTGGAGCTGATATGAAAAATATTCAAAAATCTACTAGTNSATATC TCAACCTTGGGGGCTGAGCTGACTATTACTTTTATAAGCTTTAATGATCGACTATAG	1920
1499	→	NSLFWNNHDLPRIVSIWGN GAATTCCTGTTTAAACAAACCAAGCACTCACTGCAATTTGGGAAATTA CTTAAAGCAAGCACTTTTCTTCTTCTGAGTACGATTAACAGAGTTAGACCCCTTACT	1980
1500	→	AAATGAAATAGATTTGAGCGTGGACAGAGGTCGTCTTCTTACCAAGAG TCTGCTTTTATGCTTAAAGTGGCAGCTGCTCTCAAGAGAAATGGAGCGAGCTTTTC	2040
1501	→	EYREKESKAKAFAILLHLMR CAAGCAATCAAGAAAATTTCAAAASCTTTTAACTTTACTTCAATCTCAATAGAGG CTTTCTTAACTTCTTTTAACTTTTGGAAAGCTTAGAATGAAGTACCTCTCC	2100
1502	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATACAGAACTTTTCTAGTACCT	2160
1503	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	2220
1504	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	2280
1505	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	2340
1506	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	2400
1507	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	2460
1508	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	2520
1509	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	2580
1510	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	2640
1511	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	2700
1512	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	2760
1513	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	2820
1514	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	2880
1515	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	2940
1516	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3000
1517	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3060
1518	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3120
1519	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3180
1520	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3240
1521	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3300
1522	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3360
1523	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3420
1524	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3480
1525	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3540
1526	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3600
1527	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3660
1528	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3720
1529	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3780
1530	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3840
1531	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3900
1532	→	TCATGATGAGCTTACAGCAAGCTTAAAGCAAGCTTAACTTAAATAGTCTTTTAAATATCATCGA AGCAAGCTGCACTGCTTCTGCTTACAGCAAGCTTTATAGATCAATCACTCTTA	3960

I I L S Q D V L E E V I S O L K L D L T	104		
ATTATGCTTAAGAGAGATTTTGGAGAAATTTTCTGATTTGAAACTAGATTTCAGG	3960		
ATAAGAGATAGAGAGATTTTGGAGAAATTTTCTGATTTGAAACTAGATTTCAGG			
P K G L A N K I K V T V P V D T R I V S	124		
GCRAAATGTTTGGATTAATAAATAAAGTAAACAGTAAACAGTAAACAGTAAACAGT	4020		
GCRAAATGTTTGGATTAATAAATAAAGTAAACAGTAAACAGTAAACAGTAAACAGT			
V S V N D R V P E E A S R I A N S L R E	144		
GTTTCAATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGASAGAA	4090		
GTTTCAATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGASAGAA			
V A A Q K I I S I T R V S D V A T L E E	164		
GTAGTCTGCAAAAATAATACAGTATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTC	4140		
GTAGTCTGCAAAAATAATACAGTATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTC			
A R P A I S P F S P N I K R N T L I G F	184		
GTAGAGAGGCTATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	4200		
GTAGAGAGGCTATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
L A G G I G T S V I V L L L E L L D T H	204		
TTGGAGAGGCTATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	4260		
TTGGAGAGGCTATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
V K R P E D I E D T L Q M T L L G V V P	224		
GTGAAAGCTGAGAGAGATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTG	4320		
GTGAAAGCTGAGAGAGATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTG			
N L G K L K * 230	9		
AACCTGGGTAATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	4380		
AACCTGGGTAATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
L E F I K K A E E Y Y A L C T N I Q L	29		
CTGGAGTTTAAAGAGAGAGATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTG	4440		
CTGGAGTTTAAAGAGAGAGATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTG			
S G D K L K V I S V T S V N P G E G K T	49		
AGGGAGTTTAAAGAGAGATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTG	4500		
AGGGAGTTTAAAGAGAGATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTG			
T T S V N I A R S F A R A G Y K T L L I	69		
ACTGAGTTTAAAGAGAGATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTG	4560		
ACTGAGTTTAAAGAGAGATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTG			
D G D T R N S V M S G F E K S R E K I T	89		
GATGAGTTTAAAGAGAGATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTG	4620		
GATGAGTTTAAAGAGAGATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTG			
E L T E F L S G L D S H G L C D T N	109		
GAGCTGAGAGATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	4680		
GAGCTGAGAGATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
I E N L E V V S V S V S P N T A L L	129		
ATTGAAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	4740		
ATTGAAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
Q S K N F V M V K I F S K E V S I L S	149		
QRAAGTAAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	4800		
QRAAGTAAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
W K R * 153	4860		
TTTGGAGAGATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
TTTGGAGAGATTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
P K I I D I V C Y D P R I G S Y N N	250		
CCGAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	6660		
CCGAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
P S F G Y G G Y C L P K D T K O L K A	270		
CCGAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	6720		
CCGAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
F R D V P E N L I T A V V Q S N K R T	290		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	6780		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
D Y I A G A I L A K O P S A V K G V M R	310		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	6840		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
I M K S D S D N F R S S A V K G V M R	330		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	6900		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
L D N Y G K E I V I Y E P T I E C D T F	350		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	6960		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
M G Y R V I K S L D E F K N I S D I V V	370		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	7020		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
A N R M N D D L R D I Q E K L Y T R D L	390		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	7080		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
F G R * 394	10		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	7140		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
F Q N E D F E F F M L E V F I L R	30		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	7200		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			
W A V I Y F E A V R Y K S Y S C S V S D	50		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS	7260		
TTAGCAATTTAAGATCAATTTGCTGAGAGAGAAAGGCTATTCCTAATCTTTGAS			

1.6. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE DNA CLONADOS EN PKER1 Y PKER2

Para llevar a cabo la secuenciación de ambos fragmentos, utilizamos los plásmidos descritos en las Tablas 5 y 6. Además, cuando fue necesario, se emplearon oligonucleótidos sintéticos. En la Figura 10 se muestra la secuencia de nucleótidos completa del fragmento *EcoRI* (nucleótidos 1 a 9704), además de la del fragmento *EcoRI-BclI* adyacente (véase apartado 9.2 de esta sección).

1.7. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL FRAGMENTO *ECORI* DE 9704 BP

El análisis de la secuencia de nucleótidos del fragmento *EcoRI* reveló la existencia de cinco marcos abiertos de lectura (ORF de Open Reading Frame) completos y uno incompleto (Figs. 10 y 11). Este último correspondería a un gen que comenzaría antes del sitio *EcoRI*, llegando hasta el nt 697. En posición 3' de este gen se encuentran dos ORFs, ORF1 (desde el nt 3649 hasta el 4341) y ORF2 (desde el nt 4351 hasta el 4815); cada una de éstas, está precedida por un sitio consenso de unión al ribosoma (RBS). A continuación, encontramos 3 ORFs, la primera de las cuales constituía el gen *cap3A* (desde el nt 5911 hasta el 7095), implicado en la biosíntesis capsular; las dos siguientes se denominaron *cap3B* (desde el nt 7111 hasta el 8364) y *cap3C* (desde el nt 8662 hasta el 9582), debido a que parecían estar incluidas dentro de un mismo operón. Por tanto, la delección ocurrida durante la construcción del plásmido pKER1 había afectado al gen *cap3A*, quizá debido a que la presencia de la proteína codificada por este gen en el citoplasma de *E. coli* resulte nociva para la bacteria. Asimismo, comprobamos que parte del gen que en principio se había denominado *cap3-1* (García y cols., 1993), se trataba realmente de la zona 5' de *cap3A*. Por tanto, durante el proceso de construcción de pLGL1 dos fragmentos de DNA, uno de ellos conteniendo parte del gen *cap3A*, se habían fusionado, produciéndose la delección de un par de bases (bp), por lo que no se reconstruyó el sitio de corte *ScaI*. Recientemente se ha demostrado que el fragmento *ScaI* de 2,5 kb también parece ser específico del serotipo 3 aunque se encuentra alejado del otro en el cromosoma de *S. pneumoniae* y no está implicado en la biosíntesis capsular (García y López, 1995). Cada una de los genes *cap3A*, *cap3B* y *cap3C* está precedido por un RBS (posiciones 5896-5900, 7096-7100 y 8752-8755, respectivamente). Además, precediendo al gen *cap3A*, se encuentran dos secuencias características de un promotor consenso (posiciones 5819-5824 y 5841-5846) que ya habían sido observadas por García y cols. (1993). Por otro lado,

identificamos dos secuencias que podían constituir terminadores de la transcripción Rho-independientes; la primera de ellas se encontraba entre los nt 1042 y 1099, y la segunda entre los nt 4851-4903.

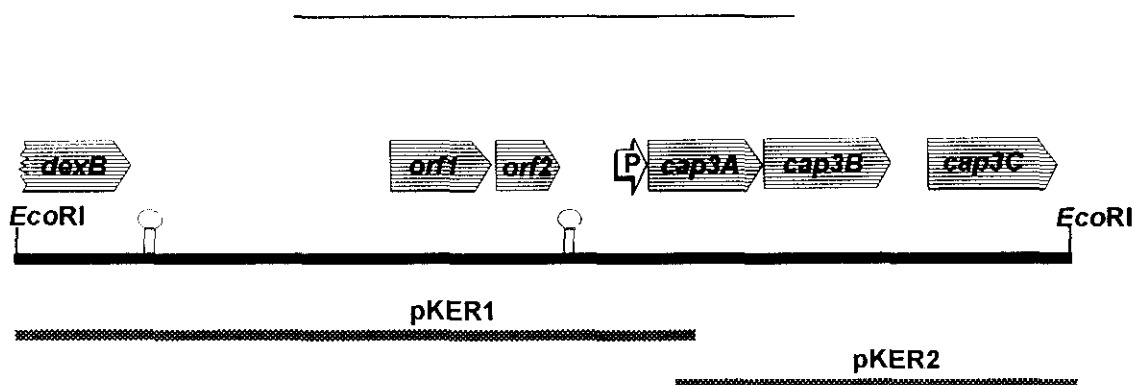


Figura 11. Esquema de la disposición de las ORFs contenidas en el fragmento *EcoRI* de 9704 bp. Las flechas sombreadas representan los genes presentes en el fragmento. P señala la posición del promotor del operón *cap3*. \cap representa los posibles terminadores de la transcripción Rho-independientes. En la parte inferior se muestran las posiciones de los insertos de pKER1 y pKER2.

1.8. IDENTIFICACIÓN GÉNICA PRELIMINAR MEDIANTE COMPARACIÓN DE SECUENCIAS

La comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias de nucleótidos de las ORFs encontradas en el fragmento *EcoRI* de la cepa 406, con las presentes en las bases de datos, nos permitió asignar determinadas funciones, siquiera de manera provisional a las posibles proteínas codificadas por estas ORFs.

Por una parte, la secuencia de aminoácidos de la ORF incompleta mostró un gran parecido con la correspondiente a la proteína DexB tanto de *S. mutans* (Russell y Ferreti, 1990) como de *S. equisimilis* (Melchod y cols., 1993); en concreto, observamos una identidad de aproximadamente el 65% (Figura 12) y, en base a ello, la ORF correspondiente de neumococo fue designada como *dexB*. DexB es una glucan 1,6- α -glucosidasa, implicada en la liberación de residuos de glucosa a partir de dextrano, un exopolisacárido compuesto por unidades de glucosa unidas mediante enlaces $\beta(1\rightarrow6)$.

DexB	NSLFWNNHDLPRIVSIWGN	Q	E	YREKSAKAF	AILLHLMRGTPYIYQ	46																																								
M30944	NSLFWNNHDLPRVLSIWNT	G	K	YREKSAKALA	AILLHLMRGTPYIYQ	371																																								
X72832	NSLFWNNHDLPRVLSIWND	S	I	YREKSAKALA	AILLHLMRGTPYIYQ	371																																								
DexB	GEEIGMTNYPFETLD	Q	V	EDIESLNYPREALEKGV	P	I	E	E	I	M	D	S	I	R	V	I	92																													
M30944	GEEIGMTNYPFKDLN	E	L	DDIESLNYAKEAFTNGK	S	M	E	T	I	M	D	S	I	R	N	I	417																													
X72832	GEEIGMTNYPFKDLT	E	V	DDIESLNYAKEAMENG	V	P	A	A	R	V	M	S	S	I	R	K	V	417																												
DexB	GRDNARTPMQWDE	S	K	NAGFSTGQ	-	P	W	L	A	V	N	P	N	Y	E	M	I	N	V	Q	E	A	L	A	N	P	D	137																		
M30944	GRDNARTPMQWDAS	S	Q	NAGFSTADK	T	W	L	P	V	N	P	N	Y	K	D	I	N	V	Q	A	A	L	K	N	S	N	463																			
X72832	GRDNARTPMQWSK	D	T	HAGFSEAQE	T	W	L	P	V	N	P	N	Y	Q	E	I	N	V	A	D	A	L	A	N	Q	D	463																			
DexB	SIFYTY	Q	R	L	V	Q	I	R	K	E	N	S	W	L	I	R	A	D	F	E	L	L	D	T	A	D	K	V	F	A	I	R	K	D	G	D	R	R	F	L	183					
M30944	SIFYTI	Q	Q	L	I	Q	L	R	R	E	N	D	W	L	V	D	A	D	F	E	L	L	P	T	A	D	K	V	F	A	L	R	K	V	R	E	E	R	Y	L	509					
X72832	SIFYTY	Q	Q	L	I	A	L	R	R	K	D	Q	D	W	L	V	E	A	D	Y	H	L	L	P	T	A	D	K	V	F	A	Q	R	Q	F	G	E	E	T	Y	V	509				
DexB	VVANLSNEDQD	L	T	V	E	G	K	V	K	S	V	L	I	E	N	T	L	A	Q	E	V	F	E	K	Q	I	L	V	P	W	D	A	F	C	V	E	229									
M30944	I	V	V	N	S	D	Q	E	E	V	L	E	I	D	V	D	K	Q	E	T	L	I	S	N	T	N	E	S	A	A	L	A	N	H	K	L	Q	P	W	D	A	F	C	I	K	555
X72832	I	V	V	N	S	D	Q	E	Q	V	F	A	K	D	L	A	G	A	E	V	V	I	T	N	T	D	V	D	K	V	L	E	T	K	H	L	Q	P	W	D	A	F	C	V	K	555
DexB	L	L	231																																											
M30944	I	N	557																																											
X72832	L	S	V	558																																										

	M30944		X72832	
DexB	66,1	80,4	64,3	78,3

Figura 12. Comparación de la secuencia conocida de aminoácidos de la proteína DexB de *S. pneumoniae* con las de otros estreptococos. M30944 y X72832 corresponden a los números de acceso de las glucan 1,6- α -glucosidasa de *S. mutans* y *S. equisimilis*, respectivamente. Las zonas en azul indican aminoácidos idénticos en las tres proteínas, mientras que las señaladas en verde corresponden a cambios conservativos en la secuencia de aminoácidos entre las tres proteínas. En la parte inferior se muestran los porcentajes de identidad (en azul) y similitud (en rojo) para cada comparación por separado.

Las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes *orf1* y *orf2* corresponderían a dos proteínas de aproximadamente 25 y 17 kDa, respectivamente, que poseían una gran similitud con las codificadas respectivamente, por los genes *cps19fC* y *cps19fD* descritos en una estirpe de neumococo de serotipo 19F (Guidolin y cols., 1994). Se había sugerido que estos genes podrían estar implicados en la biosíntesis del polisacárido capsular de este serotipo, aunque este punto no ha podido ser confirmado todavía. Además, también observamos cierta similitud, aunque considerablemente menor que en el caso anterior, con la estructura primaria de las proteínas codificadas por los genes *cpsB* y *cpsC* de *S. agalactiae* (Figura 13A) que forman parte del operón *cps* responsable de la síntesis del polisacárido capsular en este microorganismo (Rubens y cols., 1993). Los porcentajes, tanto de identidad como de similitud, de estas comparaciones se muestran en la Figura 13B. Asimismo, en la proteína codificada por el gen *orf1* observamos una cantidad considerable de residuos hidrofóbicos, (un 34%), principalmente dispuestos formando dos segmentos altamente hidrofóbicos, uno en cada extremo de la proteína (datos no mostrados), así como la secuencia **LIGFLAGGIGT**SVIVLLELLDTHVK (posiciones 181-206), característica de proteínas implicadas en el transporte de azúcares, denominadas transportadores GLUT (de 'Glucose Transporters'), generalmente asociadas a la membrana de los microorganismos (Silverman, 1991). Todo esto podía indicar un posible papel de esta proteína como transportadora durante la síntesis de la cápsula del serotipo 3 de *S. pneumoniae*.

El gen *cap3A* codifica una proteína de 44,6 kDa, muy similar a la de la proteína HasB de *S. pyogenes* (Figura 14), cuya actividad enzimática había sido identificada como UDP-GlcDH, es decir, la enzima que cataliza la oxidación de UDP-Glc a UDP-GlcA (Dougherty y van de Rijn, 1993). Además, también encontramos una identidad de aminoácidos prácticamente absoluta, concretamente un 99%, con la secuencia de la proteína codificada por el gen *cps3D* (Dillard y cols., 1995) de otra estirpe de neumococo de serotipo 3. Un análisis más preciso de la estructura primaria de la proteína Cap3A reveló la existencia de una secuencia (aminoácidos 251 a 264) muy similar a la del péptido tríptico que contiene el sitio catalítico de la UDP-GlcDH bovina (Franzen y cols., 1981), así como un aparente motivo de unión a NAD en el extremo N-terminal de la proteína, característico de muchas deshidrogenasas (Wierenga y cols., 1986) (Figuras 10 y 14).

A

Orf1	M-KEQNT-LEIDVLQLFRALWKRKLVILLVAIITSSVAFAYSTFVI	44
U09239	M-KEQNT-LEIDVLQLFRALVKRKLVILLVAIITSSVAFAYSTFVI	44
L09116	MNKIANTEVEINIFNLLKLVKVKKFLITFVAIAFATAGLFYSLFIV	46
Orf1	KPEFTSTTRIYVVNRNQGEKSGLTNQDLQAGSYLVKDYREIILSQD	90
U09239	KPEFTSMTRIYVVNRDQGEKSGLTNQDLQAGSSLVKDYREIILSQD	90
L09116	TPQYTSSTRITYVINPNTPNNS-ITAQDLQAGSF LANDYKEIITSTD	91
Orf1	VLEEVISDLKLDLTPKGLANKIRVTVPVDTRIVSVSVNDRVPEEAS	136
U09239	VLEEVVSDLKLDLTPKDLANKIRVTVPVDTRIVSVSVSDRVPEEAS	136
L09116	VLEKVISSSEKLNYPSSQLLQKITVSVILK DTRVISISVEDANPKMSQ	137
Orf1	RIANSLREVAAQKIIISITRVSDVATLEEARPAISPSSPNIKRNTLI	182
U09239	RIANSLREVAAQKIIISITRVSDVT TLEEARPATSPSSPNIKRSTLI	182
L09116	KLANSVREAAVSKIKAVTQVEDIT TLEKGNLPKAPSSPNIKKNVLI	183
Orf1	GFLAGGIGTTSVIVL-LLELLDTHVVRPEDEDIEDTLQMTLLGVVPNLG	227
U09239	GFLAGVIGTTSVIVL-ILELLDTRVVRPKDIEDTLQMTLLGIVPNLN	227
L09116	GFIVGA-GLSTIVLVIMGILDDRVTETEDEDIEKVLGLTSLGIVPDLN	228
Orf1	KLK	230
U09239	KLK	230
L09116	KL	230
Orf2	MPTLEIAQKKLEFIKKAAEYYNALCNTNIQLSGDKLVKVISVTSVNP	46
U09239	MPTLEIAQKKLEFIKKAAEYYNALCNTNIQLSGDKLVKVISVTSVLP	46
L09116	MTRLEIVDSKLRQAKKTEEYFNAI RTNIQFSGKENKILAIASVREG	46
Orf2	EGKTTTSVNIARSFARAGYKTLIDGDTRNSVMMSGFFKSRREKITEL	92
U09239	EGKTTTSVNIARSFARAGYKTLIDGDTRNSVMMSGFFKSRREKITGL	92
L09116	EGKSTTSTSLALSLAQAGFRTLLIDADTRNSVMMSGTFKATGTIKGL	92
Orf2	TEFLSGTADLSHGLCDTNIENLFFVQSGSVSPNPTALLQSKNFVVM	138
U09239	TEFLSGTADLSHGLCDTNIENLFFVQSGTVSPNPTALLQSKNFNDM	138
L09116	TNYLSGNADLGDIIICETNVPRLMVVPSGKVPNPTALLQNAAYENKM	138
Orf2	VRIFSK-----EVSIL-----SWWKR	154
U09239	IETLRKYFDYIIIVDTAPIGIVIDAIIITQKCDASILVTATGEWNKR	184
L09116	IEAIKNI FDYIIIDTPPIGLVVDAAIIANACR-WFYFSNPSRQNK T	183
Orf2		
U09239	DVQKAKQQL EQTGKLF LGVVFNKLDISVDKYGVYGFYGNYGKK	227

B

	U09239		L09116	
Orf1	93,5	96,1	47,1	68,7
Orf2	90,6	93,3	53,0	68,5

Figura 13. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de *orf1* y *orf2* con las de las presentes en las bases de datos. A; comparaciones de las secuencias; U09239 corresponde a las secuencias de las proteínas Cps19fC (parte superior) y Cps19fD (parte inferior) de *S. pneumoniae* serotipo 19F; L09116 corresponde a las secuencias de las proteínas CpsB (parte superior) y CpsC (parte inferior) de *S. agalactiae*. En azul se indican aminoácidos idénticos en las tres proteínas y, en verde, los cambios conservativos entre ellas. B; porcentajes de identidad (en azul) y similitud (en rojo) para cada comparación.

	○□□ ◆ ◆ ◆ □ □ □ □ ●	
Cap3A	MKIAIAGSGYVGLSLAVLLAQHHEVKVIDVIKDKVESINNRKSPIK	46
L08444	MKIAVAGSGYVGLSLGVLLSLQNEVTIVDILPSKVDKINNGLSPIQ	46
Cap3A	DEAIEKYLVEKELNLEASLDPAHVYKDVEYAIATPTNYDVDLNQF	92
L08444	DEYIEYYLKSKQLSIKATLDSKAAYKEAELVVIATPTNYNSRINYF	92
Cap3A	DTS SVEAAIKTCMEYNDTC TIVIKSTIPEGYTKEVDRKFNTRDRIIF	138
L08444	DTQH VETVIKEVLSVNSHATLIKSTIPIGFITEMRQKFQTDRIIF	138
Cap3A	SPEFLRESKALYDNLVPSRIVVGTDLDDSELTK-RAWQFADLLKGG	182
L08444	SPEFLRESKALYDNLVPSRIIVSCEENDSPKVKADA EK FALLLKSA	183
Cap3A	AIKEEVPILVVAFNEAEVAKLFSNTYLATRVRYFNEIDTYSEVKEL	226
L08444	AKKNNVPV LIMGASEAEAVKLFANTYLALRVA YFNELDTYAESRKL	227

Cap3A	NPKTIIDIVCYDPRIGSYNNPSFGYGGYCLPKD TKQLKASFRDVP	272
L08444	NSHMI IQGISYDDRIGMHYNNPSFGYGGYCLPKD TKQLLANYNIP	273
Cap3A	ENLITAVVQSNKTRKDYIAGAIL-----AKQPSVVG IYRLIMRSD	312
L08444	QTLIEAIVSSNNVRKSYIAKQIINVLKEQESPVKVVG IYRLIMKSN	319
Cap3A	SDNFRSSAVKGVMERLDNYGKEIVIYEPTIECDTFMGYRV-IKSLD	357
L08444	SDNFRSAIKDVIDILKSKDIKIIIEYPM LNKLESEDSV LVNDLE	365
Cap3A	EFKNISDIVVANRMNDDL RDIQEKLYTRDLFGRE	391
L08444	NFKKQANIIVTNRYDNELQDVKNKVYSRDIFGRD	399

	L08444
Cap3A	57,0 88,7

Figura 14. Comparación de la secuencia de aminoácidos de Cap3A con la de la proteína HasB de *S. pyogenes*. L08444 corresponde al número de acceso de la secuencia de aminoácidos de HasB. En azul se indican aminoácidos idénticos entre ambas proteínas, y en verde, los cambios conservativos en la secuencia de aminoácidos. En la parte inferior se indican los porcentajes de identidad (en azul) y similitud (en rojo). *, aminoácidos que componen el péptido tríptico correspondiente al sitio catalítico; los aminoácidos característicos de sitios de unión a NAD están representados por los símbolos ○ (residuos básicos o hidrofílicos), □ (residuos pequeños e hidrofóbicos), ◆ (glicinas) y ● (residuos ácidos).

El gen *cap3B* codificaría una proteína de aproximadamente 49 kDa, cuya estructura primaria contiene aproximadamente un 33% de aminoácidos hidrofóbicos y cuyo perfil de hidrofobicidad es característico de una proteína de membrana, con varios dominios transmembranales (Figura 15A). La comparación de esta secuencia con las de las bases de datos reveló un cierto parecido con la proteína HasA de *S. pyogenes* (Figura 15B), identificada como una hialuronato sintasa, es decir, la enzima que cataliza la formación de enlaces entre los monosacáridos que componen el ácido hialurónico de la cápsula de este microorganismo (DeAngelis y cols., 1993b; Dougherty y van de Rijn, 1994). Además, encontramos una identidad de aminoácidos muy alta entre Cap3B y la proteína Cps3S (Dillard y cols., 1995), codificada por el gen *cps3S*, adyacente al *cps3D* anteriormente citado.

Por último, el gen *cap3C* codificaría una proteína de aproximadamente 34 kDa muy similar a las proteínas GtaB de *Bacillus subtilis* (Soldo y cols., 1993) y HasC de *S. pyogenes* (Crater y cols., 1995), ambas identificadas como UDP-Glc pirofosforilasas, es decir, la enzima que cataliza la formación de UDP-Glc a partir de UTP y Glc-1-P. Otros autores han descrito varios residuos de lisina que están aparentemente implicados en la actividad catalítica de la UDP-Glc pirofosforilasa de patata (Katsube y cols., 1991). Uno de ellos es el único que resulta indispensable para el funcionamiento de la enzima, alrededor del cual existen varios aminoácidos que forman un dominio que comparte un gran parecido con una secuencia presente en el extremo N-terminal de Cap3C, en la que se encuentra también el residuo de lisina catalítico (Figura 16).

Los datos comentados en los párrafos precedentes sugirieron que la proteína Cap3A actuaría como UDP-GlcDH, mientras que Cap3B sería una de las glicosil transferasas, o polisacárido-sintasas, encargada de catalizar la formación de, al menos, uno de los dos tipos de enlaces que forman el polisacárido capsular de serotipo 3, y Cap3C correspondería a una UDP-Glc pirofosforilasa. Como se ha indicado anteriormente (apartado 7.1. de Introducción), estas actividades enzimáticas ya habían sido estudiadas en neumococo y se había sugerido su implicación en la biosíntesis capsular (Mills y Smith, 1965).

A

Cap3B	MYTFILMLLDDFFQNHDFHFFMLFFVFILIRWAVIYFHAVRYKSYSC	46
L20853	MYLFGTSTVGIYG-----VILITYLVIKLGLSFL----YEPFRG	35
Cap3B	SVSDEKLFSSVVIIPVVDEPLNLFESVLRNISRHKP-SEIIVVINGP	91
L20853	NPHDYKV-AAVIPSYNEDAESLLETLKSVLAQTYPLSEIYIVDDGS	80
Cap3B	KNERLVKLCCHDF-NEKLENNMTPIQCYTTPVPGKRNAILFGLHEDV	136
L20853	SNTDAIQLIIEEYVNRREVDICRNVIIVHRSLVNGKRRAQAWAFER--	124
Cap3B	SQSDITVLDVSDTVWTPRTLSELLKPFVCDKKIGGVTTROKILDPE	182
L20853	SDADVFLTVDSDTYIYPNALEELLKSF-NDETVYAATGHLNARNRQ	169
Cap3B	RNLVTFANLLEEIRAEKTKAMSVTGVKVGCLPGRITIAFRTEILRE	228
L20853	TNLLTRLTDIRYDNAFGVERAAQSLTGNILVCSGPLSIYRREVIIIP	215
Cap3B	CIHEFMNETFMGFHKEVSDDRSLTNLTLKKGKVTVMQDTSVVYTDA	274
L20853	NLERYKNQTFGLLPVSIKDDRCCLTNYAIDLGRTVYQSTARCDTDV	260
Cap3B	PTSWKRFIRQQLRWAEGSQYNNLKMTPWMIRNAPLMFFIYFTDMIL	320
L20853	PFQLKRSYLKQQNRWNKSFRESIISVKKILSNPIVALWTIFEVVMF	306
Cap3B	PMLLISFGVNIIFLKIILNITTIIVYTASWWEIILYVLLGMIFSFGGR	366
L20853	MMLIVAIG-NLLFNQAIQLDLIKLFA-FLSIIFIVALCRNVHYMVK	350
Cap3B	NFKAMSRMKWYYVFLIPVFIIVLSIIMCPIRLGLMRCSDDLGWGT	412
L20853	HPASF-----LLSPLYGILHLFVLQPLKLYSL-CTIKNTEWGT	387
Cap3B	RNLTE	417
L20853	RKKVT	392

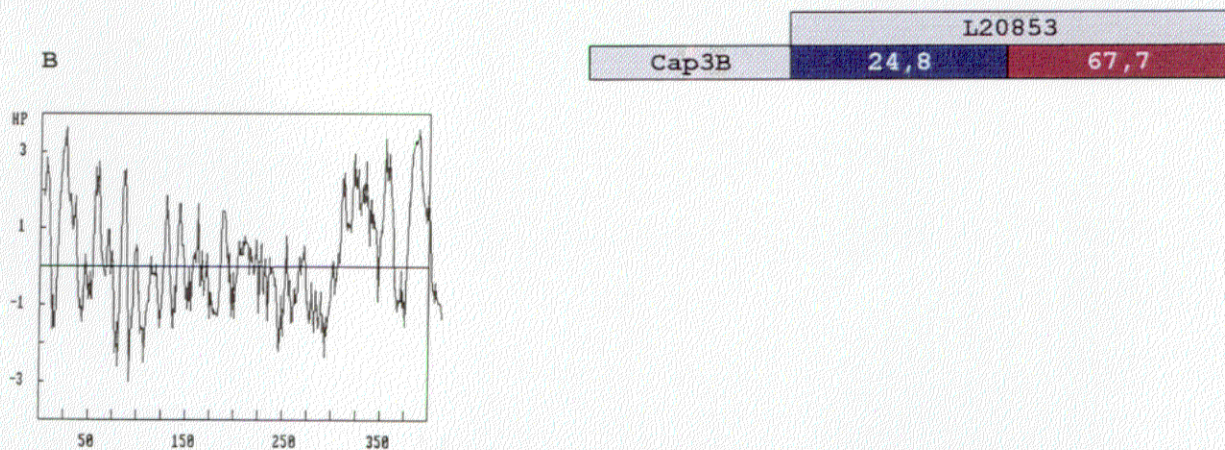


Figura 15. Perfil de hidrofobicidad y comparación de la secuencia de Cap3B con la de la proteína HasA de *S. pyogenes*. Panel A, comparación de secuencias. L20853 corresponde a la secuencia de aminoácidos de HasA. En azul se indican los aminoácidos idénticos en ambas proteínas, y en verde, los cambios conservativos. En la parte inferior se muestran los porcentajes de identidad (en azul) y similitud (en rojo) entre ambas proteínas. Panel B, perfil de hidrofobicidad (HP) de la proteína Cap3B; los valores en el eje de abcisas señalan las posiciones en la secuencia de aminoácidos; los valores positivos en el eje de ordenadas indican el carácter hidrofóbico de los residuos.

Cap3C	MKRVKKA V I PAAGLGTRFLPAT K ALAKEMLPIVDRPTIHFVI	42
U33452	MTKVRKAI I PAAGLGTRFLPAT K ALAKEMLPIVDKPTIQFIV	42
Z22516	MKRVKKA I I PAAGLGTRFLPAT K AMPKEMLPIVDKPTIQYII	42
Cap3C	EEALRSGIEDILVVTGKSKRSIEDYFDS T FELEYSLRKQGMELLK	88
U33452	NEALKSGIEEILVVTGKAKRSIEDHFD S NFELEYNLQAKGKNELLK	88
Z22516	EEAVEAGIEDIIIVTGKSKRAIEDHFD Y SPELERNLEEKGKTELE	88
Cap3C	SVNESTDI -KVHFVRQSSPRGLGDAVLQAKSFVGD ^{DP} FVVMLGDDL	133
U33452	LVDETTAI -NLHFIRQSSHPRGLGDAVLQAKAFVGN ^{EP} FVVMLGDDL	133
Z22516	KVKKASNLAD ^I HYIRQKEPKGLGHAVWCARNFIG ^{DE} PPFAVLLGDDI	134
Cap3C	MDITDS T AVPLTRQLMDDYNATQASTIAVMPVRYEDVSSYGVISPR	179
U33452	MDITNASAKPLTKQLMEDYDKTHEASTIAVMKVPHE ^D VSSYGVIAPO	179
Z22516	VQ- - -AET P GLRQLMDEYEK T LSSIIIGVQQVPEEETHRYGIIDP-	175
Cap3C	LES SNGLYSVDAFVEKPKPEEAPS ^N LAIIGRYLLTPEIFSILETQK	225
U33452	GKAVKGLYSVDTFVEKPPQPEDAPSD ^L AIIIGRYLLTPEIFDILERQT	225
Z22516	LTSEGRRYQVKNFVEKPPKGTAPS ^N LAILGRYVFTPEIFMYLEEQQ	221
Cap3C	PGAGNEIQLTDAIDTLNKTQSVFAREFV G KRYDVGDKFNFMRKTSID	271
U33452	PGAGNEVQLTDAIDTLNKTQRVFAREF K GNRYDVGDKFGFMRKTSID	271
Z22516	VGAGGEIQLTDAIQKLNEIQRVFAYDFE G KRYDVGEKLGFITTTLE	267
Cap3C	YALQHPQIKESLKNYVIALGKQLEKLD ^{DCSS} SGHL	306
U33452	YALEHPQVKEDLKNYIIKLGKALEKSKVPT ^{HS} K	304
Z22516	FAMQDKELRDQLVPFMEGLLNKEEI	292

	U33452		Z22516	
Cap3C	71,5	88,0	55,5	72,8

Figura 16. Comparación de la secuencia de aminoácidos de Cap3C con las de algunas UDP-Glc pirofosforilasas. U33452 indica la secuencia de la proteína HasC de *S. pyogenes*; Z22516 corresponde a la secuencia de la proteína GtaB de *B. subtilis*. En azul se indican los aminoácidos idénticos en las tres proteínas, y en verde, los cambios conservativos. En amarillo se indica el residuo de lisina equivalente al que se ha descrito como indispensable para la actividad catalítica de la UDP-Glc pirofosforilasa de patata (Katsube y cols., 1991). En la parte inferior se muestran los porcentajes de identidad (en azul) y similitud (en rojo) para cada comparación.

1.9. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

Como ya se ha indicado anteriormente, entre el final del gen *dexB* y el comienzo de *orf1*, existe una región que no contiene ningún marco abierto de lectura. La comparación de esta región (entre los nt 698 y 3648) con las bases de datos, reveló una similitud considerable con la región correspondiente —comprendida entre el gen *dexB* y el gen *cps19fC* (homólogo al gen *orf1*)— en el caso del serotipo 19F de neumococo (Guidolin y cols., 1994; Morona y cols., 1994). Cuando realizamos la comparación de forma más precisa,

encontramos que la secuencia comprendida entre los nt 698 y 1689 era prácticamente idéntica a la correspondiente del serotipo 19F, mientras que la comprendida entre el nt 1689 y el comienzo del gen *orf1* (nt 3648) difería significativamente de la secuencia del serotipo 19F. Por una parte, en el caso de la cepa 406, no encontramos ninguna secuencia de inserción (IS), como en el caso del serotipo 19F (Morona y cols., 1994), aunque sí la posible secuencia de reconocimiento para la IS1202 (nt 1658-1689). Por otro lado, en el caso de la cepa 406, parece haberse producido una delección de aproximadamente 280 bp que incluiría la zona correspondiente a la región 5' del gen *cps19fA* (Guidolin y cols., 1994). Para descartar que esta delección se hubiera podido producir durante el proceso de clonación, amplificamos, mediante PCR, la región comprendida entre los nt 616 y 1787 utilizando DNA cromosómico de la cepa 406 y realizamos la secuenciación directa del producto de amplificación. De este modo, obtuvimos un fragmento de DNA de 1,1 kb (Figura 17), que concordaba por tanto con el tamaño esperado, y cuya secuencia coincidía con la determinada previamente. En la Figura 17 se muestra, además, la amplificación de esta misma región de DNA a partir de genomas de cepas de distintos serotipos, que reveló una gran heterogeneidad. Así, a partir de DNA de una cepa de serotipo 1, obtuvimos un fragmento de DNA de un tamaño aproximado de 3 kb mientras que del serotipo 23, el producto obtenido fue de 1,5 kb; éste fue de 2 kb cuando utilizamos DNA extraído de cepas de los serotipos 2, 7, 8, 9 y 33. Además, cuando utilizamos DNA de una estirpe de serotipo 14, obtuvimos dos productos de amplificación, uno de ellos de 1,5 kb y el otro de 2 kb. Por otro lado, encontramos otra posible delección de cinco bp, respecto de la secuencia del serotipo 19F, tras la posición 1918; esta delección provocaría un cambio de fase durante la traducción del mRNA correspondiente que conlleva la sustitución, más adelante (nt 2147), de un codón TAT por otro de terminación (TAA). Por último, encontramos una zona de siete A (nt 3184-3190) —la zona correspondiente en el serotipo 19F contenía ocho A— lo que acarrearía la aparición de otro codón de terminación. La amplificación mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos PCAP12 y PCAP13 (Tabla 4) confirmó que estas alteraciones no se debían a un artefacto surgido durante la clonación.

Por otro lado, en la estirpe 406 encontramos, entre el gen *orf2* y el *cap3A*, una región que tampoco contenía ningún marco de lectura abierta, mientras que en el caso del serotipo 19F no existía una región equivalente a ésta (Guidolin y cols., 1994). Como ya se ha mencionado anteriormente, esta región contiene una secuencia que podría actuar como un

terminador de la transcripción Rho-independiente, así como una secuencia idéntica a un promotor consenso.

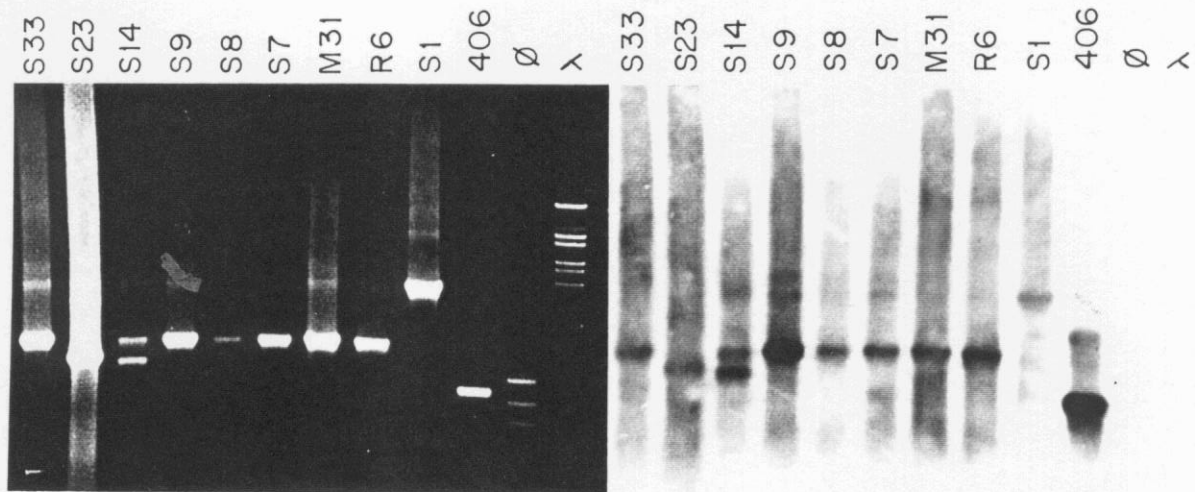


Figura 17. Heterogeneidad de tamaño de la zonas intergénicas *dexB-orf1* en estirpes de neumococo pertenecientes a distintos serotipos. En la parte derecha se muestran los tamaños de los productos de la amplificación por PCR y en la izquierda la hibridación de estos productos con pKER1. Los serotipos a los que pertenecen las estirpes de las que se obtuvo el DNA se indican en la parte superior. λ y ϕ corresponden a los marcadores de peso molecular descritos en el apartado 8.1 de Materiales y Métodos. La amplificación se realizó utilizando los oligonucleótidos PCAP10 y PCAP11, mediante un ciclo, repetido 40 veces, que constó de un paso de desnaturalización de DNA de 3 minutos a 95°C, una etapa de anillamiento de 2 minutos a 69°C seguido de 5 minutos de polimerización de DNA a 72°C.

2. DISTRIBUCIÓN DE LOS GENES DEL FRAGMENTO *EcoRI* EN ESTIRPES DE NEUMOCOCO PERTENECIENTES A DISTINTOS SEROTIPOS

Según lo expuesto hasta aquí, los genes analizados parecían estar dispuestos en dos grupos, separados por zonas no codificantes, una de las cuales había sufrido notables

modificaciones. Previamente a la realización de esta tesis, en nuestro laboratorio se había descrito que, mientras que el gen *cap3-1* (que correspondía realmente con el comienzo del gen *cap3A*) era un gen específico del serotipo 3, la zona localizada en posición 5' respecto de él se encontraba conservada en todos los demás serotipos analizados (García y cols., 1993). Para ampliar esta información, realizamos experimentos de hibridación bajo condiciones restrictivas, de DNAs extraídos de cepas provenientes de muestras clínicas y pertenecientes a distintos serotipos, con sondas que incluían distintas zonas del fragmento *EcoRI* (Figura 18). Así, pudimos observar que la zona que contiene los genes *cap3B* y *cap3C* sólo se encuentra en el DNA de cepas de serotipo 3, mientras que el gen *cap3A* parece encontrarse conservado en el cromosoma de las estirpes de serotipo 5. Asimismo, encontramos que la región que contiene los genes *orf1* y *orf2* se encuentra en algunos serotipos —pero no en todos— mientras que la región que abarca desde el final de *dexB* hasta el comienzo de *orf1* se encuentra en todos los serotipos analizados.

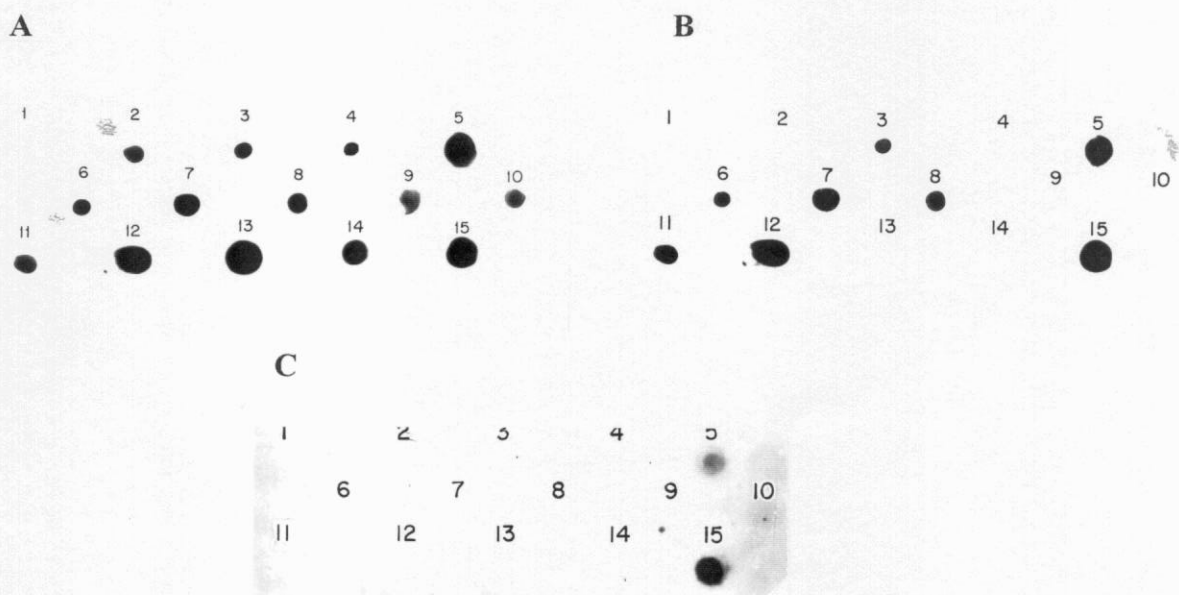


Figura 18. Análisis mediante 'dot-blot' de la presencia de los genes capsulares y los adyacentes en DNAs de estirpes de neumococo de otros serotipos. Los DNAs fueron hibridados con pKER7 (Panel A), pLGL9 (Panel B) o pKER2 (Panel C). La distribución de los DNAs se realizó de la siguiente manera: 1, *S. oralis*; 2, *S. pneumoniae* R6; 3-14, aislados clínicos de *S. pneumoniae* pertenecientes a los serotipos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 19, 23 y 33, respectivamente; 15, plásmido utilizado como sonda en cada caso.

3. LOCALIZACIÓN DE GENES EN EL CROMOSOMA DE *S. pneumoniae*

En el año 1991, Gasc y colaboradores desarrollaron, utilizando tres endonucleasas de restricción diferentes (*Sma*I, *Sac*II y *Apa*I) un mapa físico del DNA de la estirpe R6 de *S. pneumoniae* (Fig. 19A); este mapa podría resultar de gran utilidad a la hora de identificar la posición en el cromosoma de los genes existentes en el fragmento *Eco*RI relacionados con la síntesis del polisacárido capsular, así como la de posibles genes (o fragmentos de éstos) repetidos y cuya existencia ya había sido sugerida hace más de dos décadas por otros investigadores (ver apartado 7.2 de Introducción). Así, en la Figura 19B se muestran los experimentos de electroforesis en campo pulsado de DNA de las estirpes R6, 406 y M23, digeridos con *Sma*I, y su posterior hibridación con sondas que contenían genes específicos del serotipo 3 (pKER3), o genes comunes a varios o a todos los serotipos analizados en el anterior apartado (pKER1, pLGL7 y pLGL9). De este modo, se pudo determinar que los genes capsulares específicos del serotipo 3, se encontraban ubicados en un fragmento *Sma*I de 290 kb, correspondiente al fragmento 3 en el mapa físico (Gasc y cols., 1991). Observamos además que algunos genes comunes, o parte de ellos, se encontraban repetidos en otras zonas del cromosoma de neumococo, concretamente en un fragmento *Sma*I de 52 kb. Además, hibridando con el plásmido pXF405, que contiene el gen *recP* de neumococo (Rhee y Morrison, 1988), identificamos de forma inequívoca el fragmento *Sma*I de 52 kb como el fragmento 12 en el mapa físico del DNA de la cepa R6. Por otra parte, digerimos el DNA de las estirpes R6 y M23 con las enzimas *Sac*II y *Apa*I, la primera de las cuales reconocía una diana de corte situada en la posición 2581 (Fig. 10), y lo hibridamos con pKER2, pKER4 y pKER7 (Figura 20). Así, observamos que los genes específicos del serotipo 3 se encuentran en el fragmento *Sac*II de 60 kb (nº 12), y en el *Apa*I de 59 kb (nº 13) y en el que también se encuentran los genes *pbp2x* y *pbp1a* (Gasc y cols., 1991), mientras que la región de DNA situada antes de la posición 2581 forma parte del fragmento *Sac*II de 118 kb (nº 6). Por otro lado, como se muestra en la Figura 21, se encontró un gran polimorfismo entre los patrones de restricción de estirpes pertenecientes a distintos serotipos, tal y como ya habían observado Lefèvre y cols. (1993).

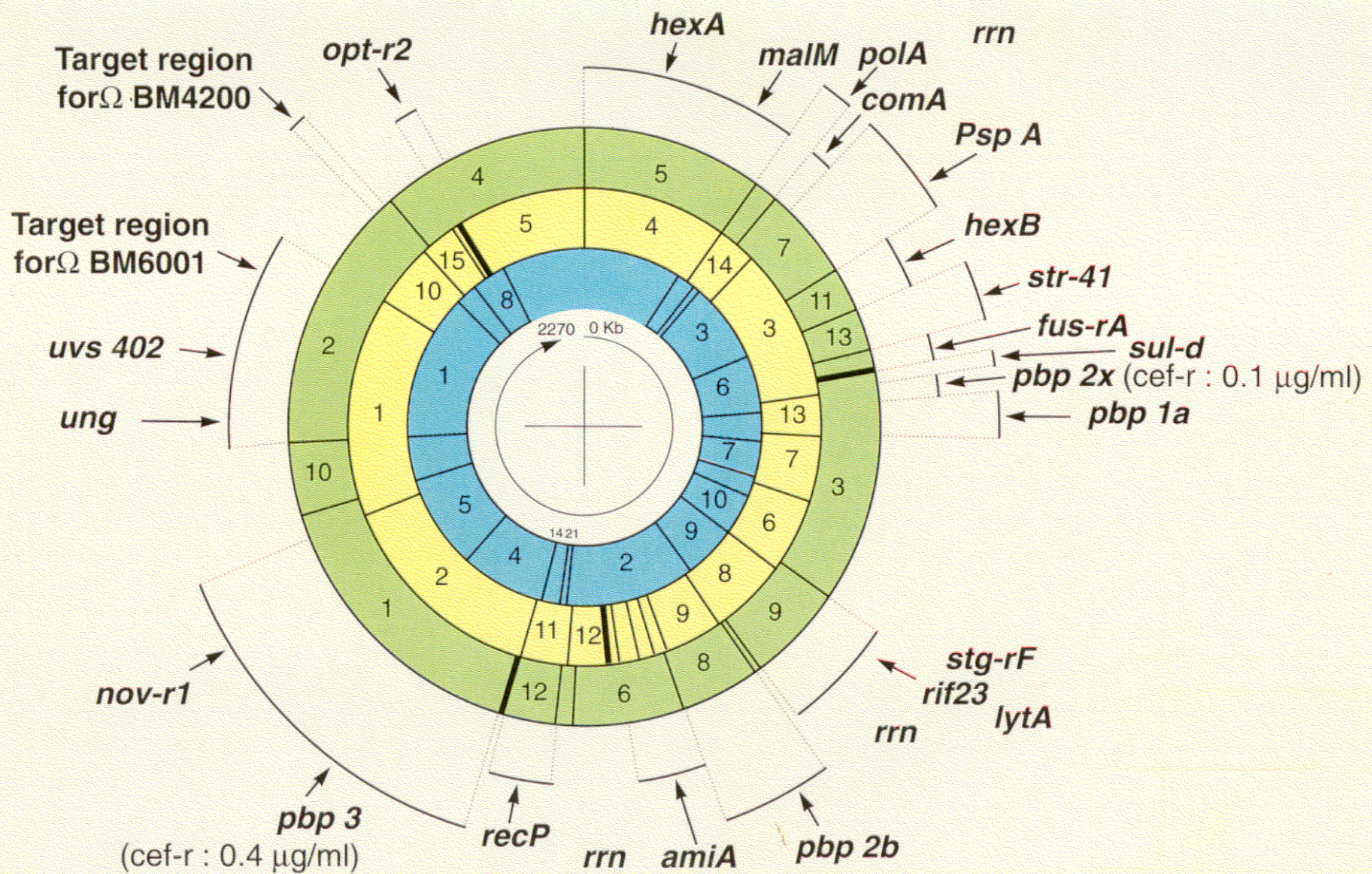


Figura 19A. Mapa físico del genoma de la estirpe R6 de *S. pneumoniae*. Se indica la localización de algunos genes y regiones, y la numeración de los principales fragmentos. Las enzimas utilizadas son *Sma*I (verde), *Apa*I (amarillo), y *Sac*II (azul). Tomado de Gasc y cols. (1991).

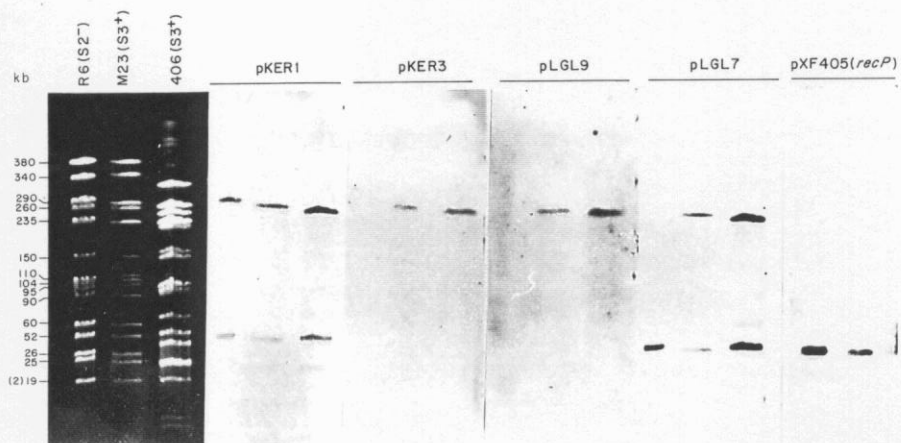


Figura 19B. Localización, mediante PFGE, de los genes capsulares y los adyacentes a éstos en el genoma de neumococo. Los DNAs fueron digeridos con *SmaI* e hibridados con pKER1, pKER3, pLGL9 o pLGL7. El plásmido pXF405 fue utilizado para identificar inequívocamente el fragmento *SmaI* de 52 kb. A la izquierda se muestran los tamaños de los fragmentos *SmaI* de DNA de la cepa R6. En la parte superior se indica la procedencia de los DNAs utilizados.

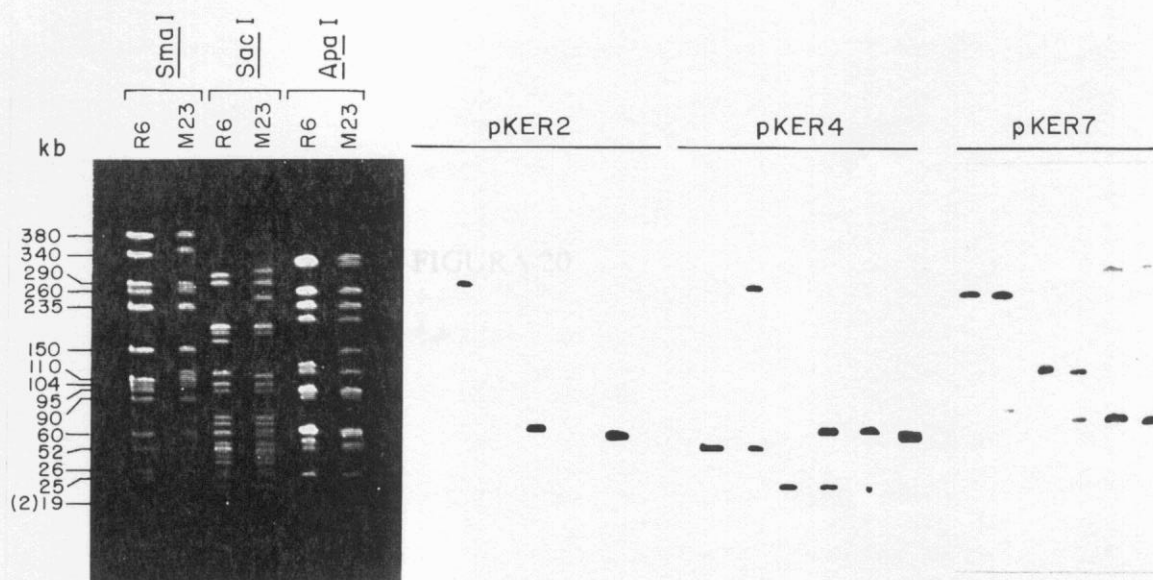


Figura 20. Localización, mediante PFGE, de los genes capsulares en el cromosoma de neumococo. Los DNAs de las cepas R6 y M23 fueron digeridos con *SmaI*, *SacII* o *ApaI* e hibridados con pKER2, pKER4 o pKER7. A la izquierda se muestran los tamaños de los fragmentos *SmaI* del DNA de la cepa R6.

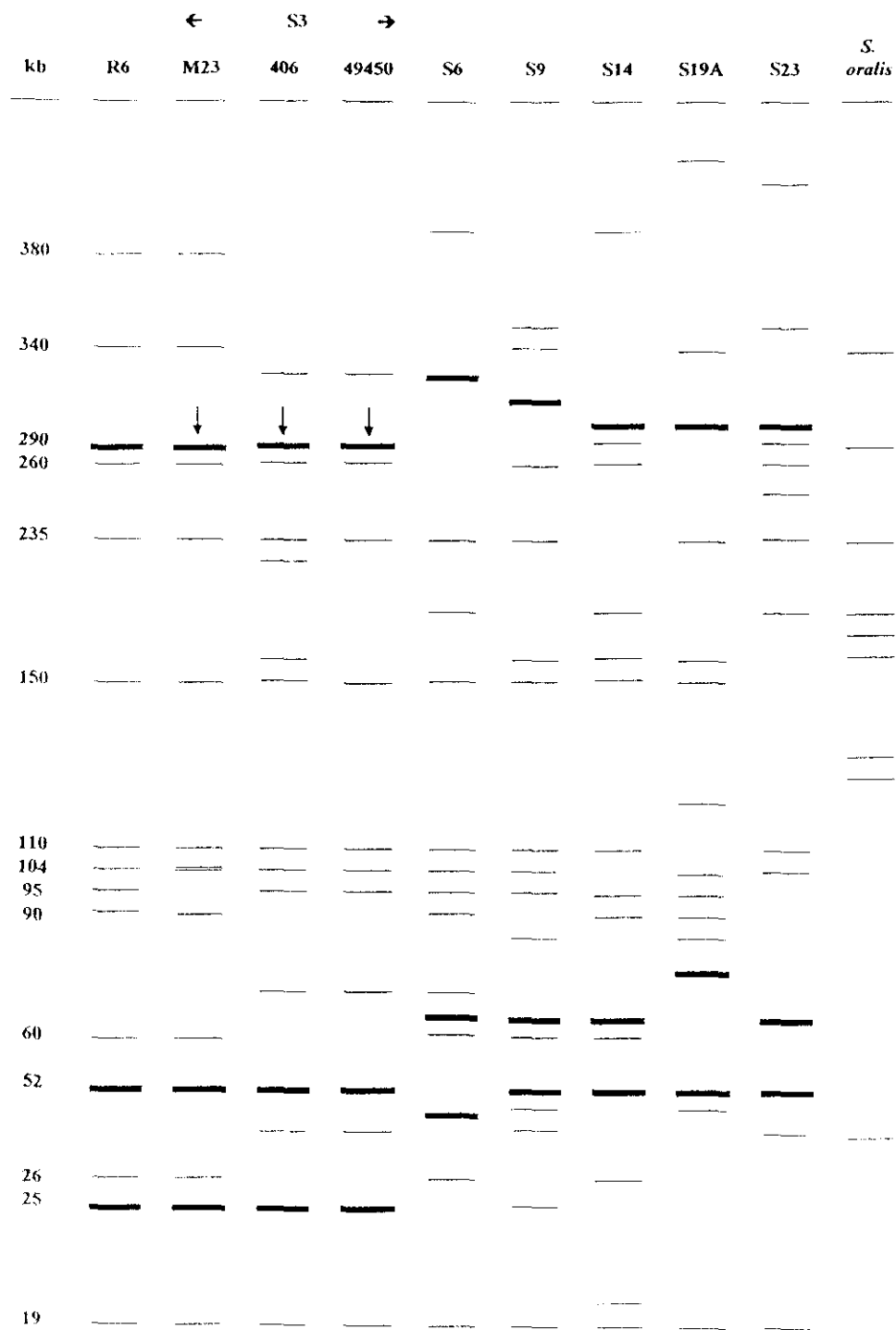


Figura 21. Representación esquemática de un experimento de hibridación utilizando fragmentos *SmaI* de DNAs obtenidos a partir de estirpes de distintos serotipos y separados mediante PFGE. En la parte superior se indican los serotipos utilizados. A la izquierda se muestran los tamaños de los fragmentos *SmaI* del DNA de la cepa R6. Las líneas finas corresponden a fragmentos que no hibridan con ninguna de las sondas utilizadas (pKER1, pKER2 y pKER7); las líneas gruesas representan los fragmentos que hibridan con pKER1 y pKER7; las líneas señaladas por flechas corresponden a los fragmentos que hibridan, además, con pKER2.

4. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL

Según se ha indicado anteriormente, en la secuencia de nucleótidos del fragmento *EcoRI* se había observado una secuencia que podría funcionar como un posible promotor de la transcripción y dos posibles terminadores Rho-independientes. Por tanto, podíamos suponer que los genes *cap3ABC* formaban parte de una unidad transcripcional, independiente de los genes *orf1* y *2*, los cuales podrían, a su vez, constituir parte de otra unidad transcripcional. Sin embargo, no se encontró ninguna secuencia nucleotídica, precediendo a estos genes, que pudiera en principio actuar como promotora de su transcripción (Fig. 10).

4.1. IDENTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES CAPSULARES

Para determinar la organización transcripcional tanto de los genes comunes como de los específicos del serotipo 3, purificamos RNA de la estirpe 406 de neumococo a partir de un cultivo en fase exponencial de crecimiento y lo hibridamos con sondas que contenían diferentes fragmentos de DNA (Figura 22). De este modo, encontramos que los genes *cap3ABC* forman, en efecto, una unidad transcripcional (denominada operón *cap3*) cuyo producto es un mRNA de aproximadamente 5,8 kb, por lo que este operón debe incluir, al menos, un cuarto gen, situado a continuación de *cap3C*. Por el contrario, observamos que la utilización de sondas que incluían los genes *orf1* y *2* (pKER5) o las secuencias que los preceden (pKER8) no conllevaba la aparición de bandas de hibridación, lo cual indicaba que aparentemente estos genes no se transcriben y por tanto, no deben encontrarse implicados en la síntesis del polisacárido capsular de serotipo 3. De todas formas, no se puede eliminar totalmente la posibilidad de que el mRNA transcrito a partir de estos genes comunes tenga una vida media muy corta y/o se degrade con mucha facilidad haciendo así muy difícil su identificación.

4.2 IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL OPERÓN *CAP3*

Para comprobar que el promotor del operón *cap3* se encontraba en la zona que precede al gen *cap3A*, localizamos el sitio de iniciación de la transcripción mediante 'primer extension' (apartado 12 de Materiales y Métodos) utilizando el oligonucleótido CAP3APR1 (Tabla 4). Este experimento (Figura 23) reveló la síntesis, por la transcriptasa inversa, de un único fragmento de DNA de 91 bp a partir de una preparación de RNA total de la estirpe 406, lo

que indicaba que el comienzo de la transcripción del operón *cap3* estaba situado en el nucleótido A localizado en la posición 5853 (Fig. 10).

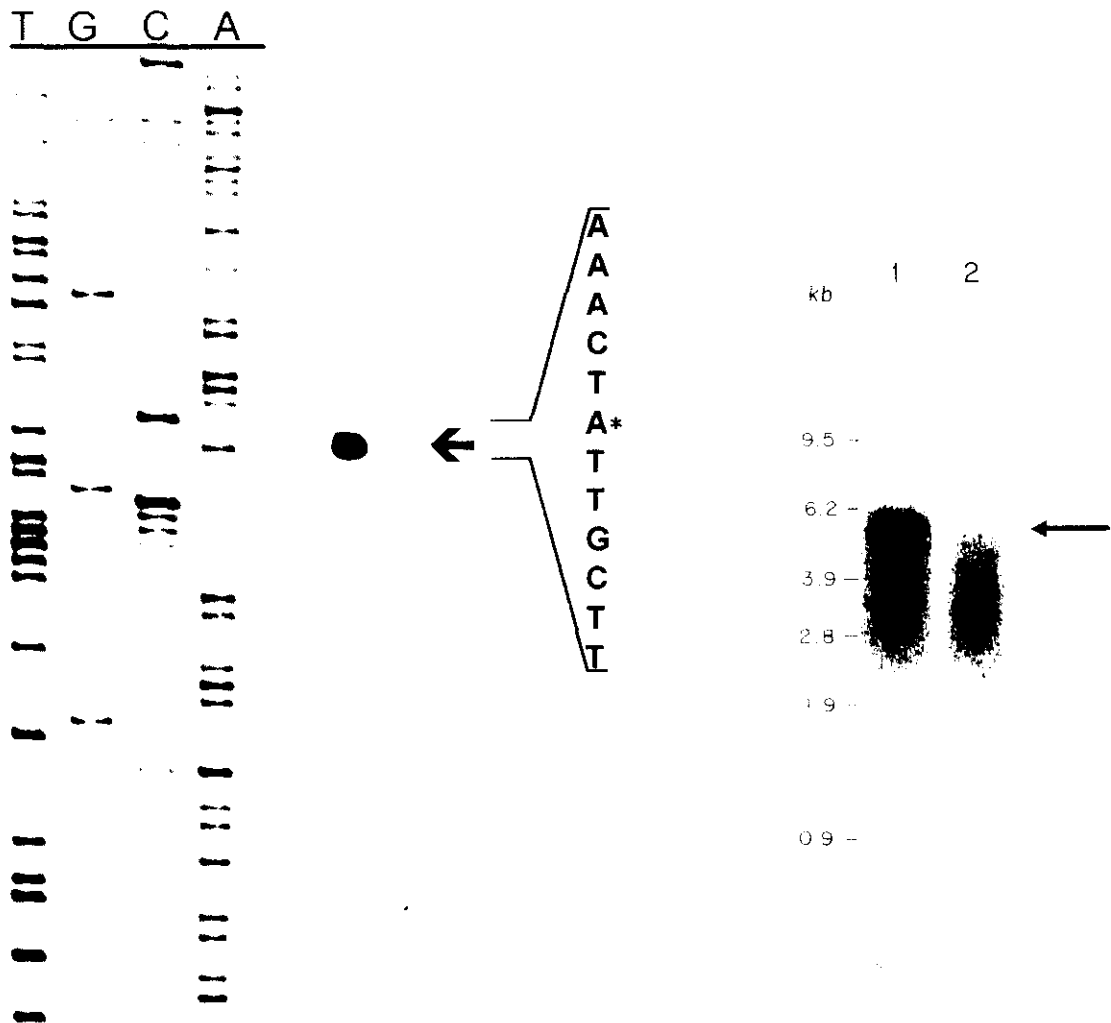


Figura 22. Determinación del sitio de iniciación de la transcripción del operón *cap3*. A la derecha se muestra la secuencia del extremo 5' del gen *cap3A* realizada con el oligonucleótido CAP3APR1 (Tabla 4). La flecha indica la migración de la banda que indica el sitio de iniciación de la transcripción, correspondiente a la A marcada con un asterisco.

Figura 23. Identificación del mRNA del operón *cap3*. Experimento de hibridación mediante 'Northern blot' de RNA de la estirpe 406. Se utilizaron como sondas los plásmidos pKER23 (carril 1) y pLGL7 (carril 2). A la izquierda se indican la migración de los marcadores de masa molecular. La flecha señala la banda correspondiente al mRNA del operón *cap3*.

5. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LOS GENES ESPECÍFICOS EN LA BIOSÍNTESIS CAPSULAR DEL SEROTIPO 3

Experimentos llevados a cabo previamente en nuestro laboratorio (García y cols., 1993) habían demostrado que mutaciones en el gen *cap3A* inhibían la capacidad de neumococo tipo 3 para sintetizar cápsula. Por otra parte, y como ya hemos expuesto en el apartado 4.1, los genes que preceden al operón *cap3* (*orf1* y *orf2*) no son necesarios para dicha biosíntesis. Quedaba por tanto por determinar si, al igual que *cap3A*, los genes *cap3B* y *cap3C* eran imprescindibles para este proceso, utilizamos la mutagénesis por inserción-duplicación de cada uno de ellos (apartado 4 de Materiales y Métodos). Para ello, construimos un plásmido vector según se indica en la Figura 24. Con este fin se digirió el plásmido pUC19 con la endonucleasa de restricción *SspI* y se añadió a una mezcla de ligación en la que se incluyó el gen que determina la resistencia a lincomicina (*ermC*), obtenido mediante digestión del plásmido pFB9 con las enzimas *ClaI* y *MspI*, y posterior formación de extremos romos mediante el tratamiento de éstos con PolIk. Con esta mezcla de ligación transformamos la cepa TG1 de *E. coli* y encontramos una estirpe Ap^R Lin^R que contenía el plásmido pUCE191. Éste fue utilizado como vector en las construcciones que se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Construcción de los plásmidos utilizados para la mutagénesis por inserción-duplicación

Plásmido	Fragmento clonado (endonucleasas utilizadas/posición inicial y final)	pUCE191/endonucleasas utilizadas
pUCEK2	<i>PstI</i> + <i>DraI</i> /8693-9509	pUCE191/ <i>PstI</i> + <i>SmaI</i>
pUCEK3 ^a	<i>EcoRI</i> + <i>SnaBI</i> /1-524	pUCE191/ <i>EcoRI</i> + <i>PstI</i>
pUCEK4 ^b	<i>MunI</i> /7764-8136	pUCE191/ <i>SmaI</i> + <i>HindIII</i>

^aEste plásmido fue construido a partir de pKER12 (Tabla 5) tratado con *EcoRI* y *PstI* (cuya diana de restricción se encuentra en la zona que proviene del vector pUC18).

^bEste plásmido fue construido a partir de pKER22 (Tabla 6) tratado con *PvuII* y *HindIII* (cuyas dianas de restricción se encuentran en la zona que proviene del vector pUC18).

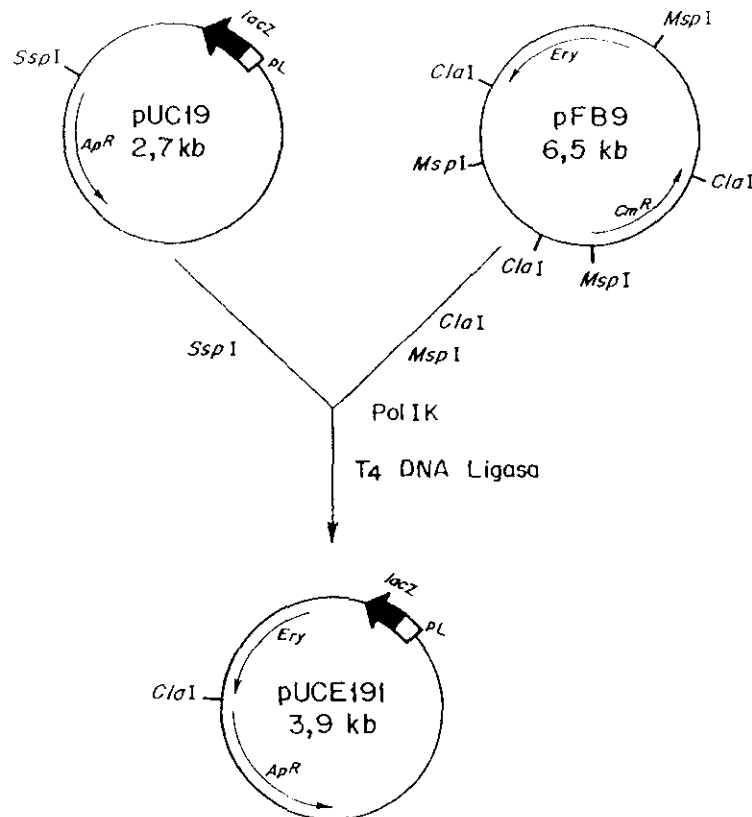


Figura 24. Construcción del plásmido pUCE191. pL, zona de clonación múltiple del plásmido pUC19; Ap^R, Ery y Cm^R representan los genes que determinan la resistencia a ampicilina, eritromicina y cloranfenicol, respectivamente.

Cuando transformamos la estirpe capsulada M23 con pUCEK3, que contiene un fragmento interno del gen *dexB*, los transformantes Lin^R no tenían afectada su producción de cápsula (datos no mostrados) demostrando así que este gen no se encuentra implicado en la biosíntesis del polisacárido capsular de serotipo 3. Asimismo, la inactivación de *cap3C* mediante la transformación de M23 con pUCEK2 también produjo transformantes Lin^R con fenotipo capsulado de serotipo 3. Por otra parte, cuando utilizamos el plásmido pUCEK4 para interrumpir el gen *cap3B*, no obtuvimos transformantes Lin^R. Este resultado podría indicar que el gen *cap3B* era esencial para la viabilidad del microorganismo; sin embargo, cuando procedimos a mutagenizar este gen sobre la estirpe M24, que contiene una mutación en el gen *cap3A* que produce un fenotipo no capsulado, sí pudieron obtenerse transformantes Lin^R. Así pues, estos resultados indican que el gen *cap3B* no puede ser interrumpido en una estirpe en la que el gen *cap3A* es funcional, mientras que, si éste está mutado, el gen *cap3B* sí puede entonces ser mutagenizado.

6. ESTUDIO DE MUTACIONES PUNTUALES QUE AFECTAN A LA PRODUCCIÓN DE POLISACÁRIDO CAPSULAR DE SEROTIPO 3

Como se ha indicado anteriormente, a partir de dos estirpes capsuladas de serotipo 3, M23 y NS3-1, obtuvimos 13 mutantes espontáneos no capsulados e isogénicos (Tabla 3), dos de los cuales, M24 y NR3-6, fueron utilizados para construir los plásmidos recombinantes pKER1 y pKER2. Además, disponíamos de un mutante espontáneo, denominado A66R2, aislado en el laboratorio del Prof. Robert Austrian en los años 50 (Austrian y cols., 1959). Este mutante había sido identificado por estos autores como defectivo en la producción de la enzima UDP-GlcDH, debido a la mutación de un *locus* que denominaron *capD* (Bernheimer y Wermundsen, 1972), lo cual le confería un fenotipo no capsulado. Para caracterizar las mutaciones que habían sufrido las cepas obtenidas en nuestro laboratorio localizamos, de manera aproximada, las regiones en que éstas habían tenido lugar, mediante experimentos de transformación al fenotipo capsulado utilizando diversos DNAs donadores. En la Tabla 8 se resumen los experimentos de transformación genética llevados a cabo con estas cepas. Encontramos que en 12 de las 13 estirpes mutantes aisladas en nuestro laboratorio, la mutación se localizaba en el gen *cap3A*, mientras que en la cepa restante, NR3-12, se encontraba en *cap3B*. La mutación de la cepa M24 había sido localizada anteriormente en un fragmento *DraI-BstYI* de 0,24 kb dentro de *cap3A* (García y cols., 1993), es decir entre los nt 5863 y 6110 (Fig. 10). Las 11 mutaciones restantes del gen *cap3A* se podían dividir en dos grupos según la región del gen donde se localizaba la mutación: el primero incluiría a las cepas NR3-4, NR3-5, NR3-6, NR3-11 y NR3-15, cuyas mutaciones se encuentran en la región 3' del gen, mientras que el segundo grupo incluiría las cepas NR3-7, NR3-8, NR3-9, NR3-13, NR3-14 y NR3-16, cuyas mutaciones se localizan en la región comprendida entre los nt 6261 y 6533 (extremo del fragmento contenido en pKER1). A continuación, caracterizamos las mutaciones de tres de estas estirpes (Figura 25) y para ello amplificamos mediante PCR el gen *cap3A* (o parte de él) a partir del DNA cromosómico de cada uno de los mutantes y realizamos la secuenciación directa del producto de PCR. Así, la mutación de la cepa M24 resultó ser una inserción de una base (T) en la posición 100 a partir del codón ATG de iniciación de la traducción del mRNA; esta inserción origina la aparición de un codón de terminación (TAA). Por su parte, la mutación de la cepa NR3-7 consistió en una transversión, G → T,

que conlleva un cambio Glu²⁰⁰→Asp; aunque este cambio es de tipo conservativo, ya que ambos aminoácidos poseen grupos cargados negativamente, tiene lugar en una región bastante conservada entre las proteínas similares a ésta, como se puede apreciar en la Figura 14. Por otra parte, la cepa NR3-5 mostró una mutación consistente en una transición C → T en el nt 901 del gen que produce la aparición de un codón de terminación TAA en esta misma posición.

Además, mediante estos experimentos de transformación genética, observamos que la estirpe A66R2, previamente caracterizada como defectiva en la producción de UDP-GlcDH, producía transformantes capsulados cuando era transformada con el gen *cap3A* amplificado por PCR (datos no mostrados), lo cual indicaba que la mutación contenida en esta cepa, que le confería el fenotipo rugoso, se localizaba en éste gen. Esto apoyaba la hipótesis de que el gen *cap3A* codifica la UDP-GlcDH en las cepas de neumococo de serotipo 3.

Por otro lado, habíamos encontrado que una de las estirpes rugosas, la denominada NR3-12, debía contener una mutación en el gen *cap3B*, concretamente en la región comprendida entre el nt 1 y el 656 del gen dado que no se transformaba con *cap3A* ni con el plásmido pKER22 pero sí con pKER23 (Tabla 8). Por tanto, ya que esta mutación le confería un fenotipo rugoso, el gen *cap3B* debía estar implicado en la biosíntesis del polisacárido capsular de serotipo 3 de neumococo.

Tabla 8. Localización de mutaciones por transformación con diferentes DNAs donadores

Mutante	Restauración de la producción de cápsula tras la transformación con:							
	pLGL1	pKER1	pKER2	<i>cap3A</i> ^a	<i>cap3A/MunI-AccI</i> ^b	<i>cap3A/AccI</i> ^c	pKER22	pKER23
M24	+	+	-	+	ND	-	ND	ND
A66R2	-	-	+	+	+	+	ND	ND
NR3-4	-	-	+	+	+	+	ND	ND
NR3-5	-	-	+	+	+	+	ND	ND
NR3-6	-	-	+	+	+	+	ND	ND
NR3-7	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND
NR3-8	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND
NR3-9	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND
NR3-11	-	-	+	+	ND	ND	ND	ND
NR3-12	-	-	+	-	ND	ND	-	+
NR3-13	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND
NR3-14	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND
NR3-15	-	-	+	+	ND	ND	ND	ND
NR3-16	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND

^a*cap3A* fue amplificado por PCR utilizando DNA de la cepa 406 y los oligonucleótidos PCAP3 y PCAP7 (Tabla 4). La amplificación se llevó a cabo según se indica en el apartado 9 de Materiales y Métodos, utilizando un ciclo de 3 minutos a 95°C (desnaturalización), 2 minutos a 69°C (anillamiento) y 5 minutos a 72°C (polimerización de DNA) repetido 40 veces, y un paso final de extensión por la DNA polimerasa de 6 minutos a 72°C.

^bEl gen *cap3A* amplificado por PCR fue tratado con *MunI* y *AccI*, sometido a electroforesis y el fragmento situado entre las posiciones 6706 y 7113 se purificó mediante la técnica de β-agarasa.

^cEl gen *cap3A* amplificado por PCR fue tratado con *AccI*, sometido a electroforesis y el fragmento situado entre las posiciones 6276 y 7113 se purificó mediante la técnica de β-agarasa.

+, transformantes capsulados; -, ausencia de transformantes capsulados; ND, no determinado.

<i>EcoRV</i>	-35	-10	<i>DraI</i>	
<u>GATATC</u> CTTTTCAAAGCTGATACTAAGGCACAAAAAAGTTTGATATTCCCCTTGACAAATAGATAAAATATATATATAATTAACCTATTCCTTTTAAAT				100
			M K I A I A G S G Y V G L S L A V L L	19
AAAGTGAATATTAATAATGCAGAGAAAGGACTGTAGTAAATGAAAATGCCATTCAGGAAGTGGTTATGTAGGACTGTCTTTAGCGGTGCTACT				200

			A Q H H E V K V I D V I K D K V E S I N N R K S P I K D E A I E K	52
AGTTCAGCATCATGAAGTTAAGGTTATTTGATGTTATAAAGGATAAGGTAGAGTGGATAAACAATAGAAAATCCTCAATTAAGGATGAGCGAATTGAGAAA				300
			GATTAAGGT estirpe M24	
			<i>BstYI</i>	
			Y L V E K E L N L E A S L D P A H V Y K D V E Y A I I A T P T N Y	85
TACTTAGTTGAAAAGAGTTGAATCTTGAAGCCTCCTTAGATCCTGCACACGTTTATAAAGACGTGGACTATGCTATTATTGCTACTCCGACTAATTATG				400
<i>AccI</i>			<i>ScaI</i>	
D V D L N Q F D T S S V E A A I K T C M E Y N D T C T I V I K S T I				119
ATGTAGACTTAAATCAGTTTGAATCATCTTCAGTTGAAGCTGCCTATCAAGACTTGTATGGAAATAAATGATACTTGTACAATCGTAATCAAAGTACTAT				500
<i>AccI</i>			<i>HindIII</i>	
P E G Y T K E V R D K F N T D R I I F S P E F L R E S K A L Y D N				152
TCCTGAAGGGTATACATAAGAAGTGAAGGAAAAGTTAATACAGATCGTATATTTTTTCCTCCAGAGTTTCTACGTGAATCCAAAGCTTATATGATAAT				600
			<i>BstYI</i>	
L Y P S R I V V G T D L D D S E L T K R A W Q F A D L L K G G A I				185
TTGTATCCATCTAGAATTGTGTAGGAAGTGAATTTGGATGATTTCTGAGTTAACAAAAGAGCATGGCAGTTTGCAGATCTACITAAAGGTGGAGCTATTA				700
			D	
K E E V P I L V V A F N E A E V A K L F S N T Y L A T R V R Y F N E				219
AGGAAGAGGTTCCGATACCTGGTTGGCTTTAATGAAGCAGAGTTGCAAAATGTTTAGTAACACTTACTTGGCAACTCGCGTACGTTATTTAATGA				800
			CCAGATGGT estirpe NR3-7	
I D T Y S E V K E L N P K T I I D I V C Y D P R I G S Y Y N N P S				252
GATAGATACATATAGCGAGGTAAGGGCTTAATCCCAAGACAATATTGATATTTGTTGTTATGATCCTAGAATTTGGATCATACTATAAACCCTAGC				900
			<i>MunI</i>	
F G Y G G Y C L P K D T K Q L K A S F R D V P E N L I T A V V Q S				285
TTTGGTTACGGAGGGTATTGCTTACCAAAAGACACAAGCAATTGAAAGCAAGTTTATAGGGATGTTCTGAAAATCTGATTACAGCTGTGGTGCAATCTA				1000

N K T R K D Y I A G A I L A K Q P S V V G I Y R L I M K S D S D N F				319
ATAAAAGAGAAAGATTATATAGCTGGAGCTATTCTAGCTAAACAACCTAGTGTGTAGGTATTTATAGATTAATATAGAAAATCTGATTTGATAATTT				1100
			TAAATAACCT estirpe NR3-5	
R S S A V K G V M E R L D N Y G K E I V I Y E P T I E C D T F M G				352
TCGTTCTAGTCTGTTAAGGGAGTTATGGAAAGCTTTGGACAATATTGGTAAAGAAATGTTATTTACGAACCTACTATTTGAGTGTGATCTTTTATGGGA				1200
			Y R V I K S L D E F K N I S D I V V A N R M N D D L R D I Q E K L	385
TACAGAGTAAATTAATCTTTAGATGAATTAAGAATATTTCTGACATGTTGTAGCGAATCGTATGAACGATGATTTAAGGGATATACAGAAAACCTCT				1300
			Y T R D L F G R E ***	
			<i>AccI</i>	
ATACACCGGATTTAATTCGACAGAGATAAGGGGAAATAATTTTATGATACATTTATTTAATGTTGTTGGATTTTTCAGGAATCATGATTTTCATTT				1400

Figura 25. Secuencia de nucleótidos del gen *cap3A* y localización de las mutaciones responsables del fenotipo rugoso. En negrita se indica la secuencia de aminoácidos de Cap3A. También se muestran las secuencias -10 y -35 del promotor del operón *cap3* mientras que el posible sitio de unión al ribosoma se indica subrayado y en cursiva. Las mutaciones presentes en las estirpes M24, NR3-5 y NR3-7 se indican debajo de la secuencia principal y subrayadas, mientras que los fenotipos derivados de éstas se representan sobre la secuencia de aminoácidos principal. Los codones de terminación se representan mediante tres asteriscos. Los sitios de restricción utilizados para construir los plásmidos necesarios para la localización de las mutaciones están doblemente subrayados.

7. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS PRODUCTOS GÉNICOS DEL OPERÓN *CAP3*

De lo comentado hasta aquí se puede deducir que, de los genes incluidos en el fragmento *EcoRI*, tan sólo dos —*cap3A* y *cap3B*— son necesarios para la síntesis del polisacárido

capsular de serotipo 3 de neumococo. El primero de ellos parece ser el encargado de codificar la enzima UDP-GlcDH, responsable de la formación de uno de los precursores de la síntesis capsular (UDP-GlcA), a partir del otro precursor (UDP-Glc) (ver apartado 7.1 de Introducción). Por otra parte, *cap3B* podría actuar catalizando la formación de alguno de los enlaces necesarios para la polimerización, es decir, para la incorporación de alguno de los monosacáridos, Glc o GlcA, al polisacárido en formación. En cuanto al tercer gen, *cap3C*, parece ser prescindible para la síntesis capsular aunque, dada la disposición de los tres genes en un mismo operón que posiblemente incluye un cuarto gen, es probable que participe en la síntesis de la cápsula. El alto porcentaje de identidad entre la estructura primaria de la secuencia deducida de aminoácidos de Cap3C y las de la UDP-Glc pirofosforilasa, tanto de *E. coli* como de *B. subtilis* (Figura 16), sugiere que la función de Cap3C sería la de sintetizar, a partir de UTP y Glc-1-P, el precursor que sirve de sustrato para la actividad de Cap3A (UDP-Glc), según se indica en el apartado 7.1 de Introducción. Así, la ruta de biosíntesis del polisacárido capsular del serotipo 3 propuesta por los investigadores clásicos quedaría tal y como se indica en la Figura 26.

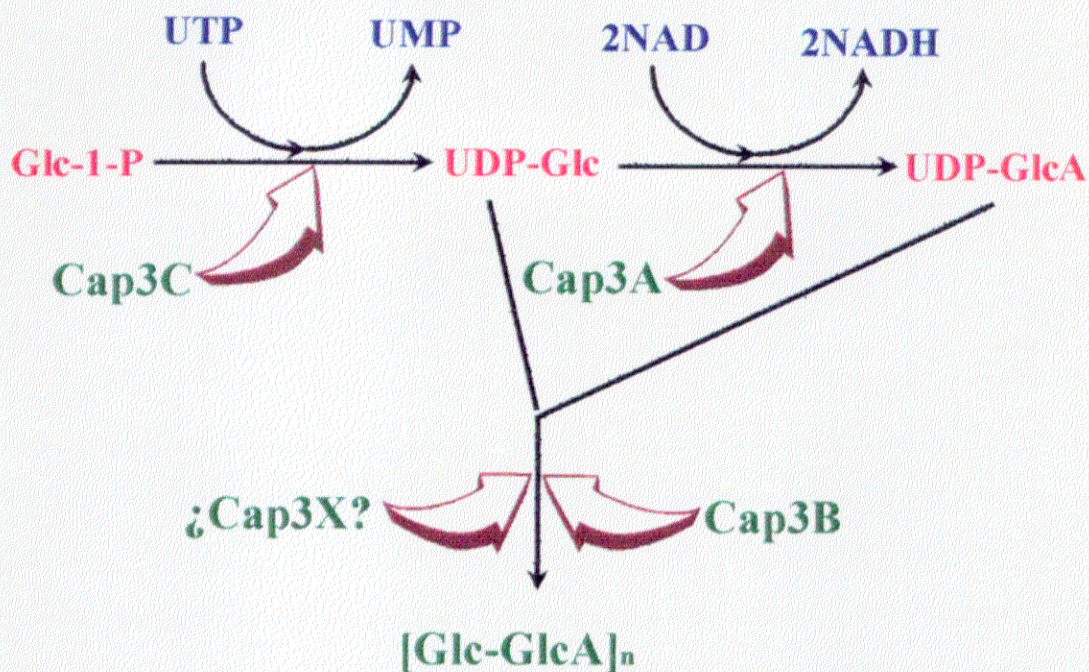


Figura 26. Ruta de síntesis del polisacárido capsular del serotipo 3 de neumococo. Las enzimas (en verde) implicadas en los pasos bioquímicos de la síntesis (flechas negras). ¿Cap3X? indica una enzima hipotética implicada en el proceso de polimerización del polisacárido capsular. En rojo se indican los precursores de la síntesis capsular, los cofactores de las reacciones se muestran en azul. $[Glc-GlcA]_n$ representa el polisacárido capsular.

Por tanto, con el fin de caracterizar de forma inequívoca las actividades enzimáticas de estas proteínas, procedimos a expresar por separado cada uno de los tres genes del operón *cap3* en *E. coli* con el fin de determinar la actividad bioquímica de cada una de las proteínas producidas. Como algunos autores han mencionado (Martin y cols., 1989; Dillard y Yother, 1991), la expresión de genes de neumococo en otros microorganismos, como *E. coli*, entraña serias dificultades por lo que, para nuestro trabajo, tuvimos que recurrir, en general, a sistemas de expresión con regulación estricta.

7.1. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA CAP3A

Como ya se ha comentado anteriormente, tanto la comparación de secuencias de aminoácidos (apartado 1.8), como la complementación genética de un mutante previamente caracterizado como defectivo en UDP-GlcDH con el gen *cap3A* (apartado 6) indican que este gen codifica probablemente esta enzima. Por tanto, con el fin de identificar la actividad bioquímica de la proteína Cap3A procedimos a clonar el gen *cap3A* en *E. coli*, puesto que se ha observado la imposibilidad de llevar a cabo el ensayo espectrofotométrico de cuantificación de la formación de NADH, utilizado habitualmente para estudiar la actividad UDP-GlcDH de otros microorganismos, a partir de extractos de neumococo debido a la presencia de una elevada actividad NADH oxidasa, que copurifica junto a la enzima UDP-GlcDH (Smith y cols., 1958b; 1959b).

7.1.1. CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN *CAP3A* EN *E. COLI*

En la Figura 27 se muestra la construcción del plásmido pTVU1, que contiene el gen *cap3A* orientado de forma que su transcripción está controlada por el promotor del gen $\phi 10$ del bacteriófago T7 de *E. coli* (Tabor, 1990). De esta manera, el plásmido pTVU1 pudo ser construido en un principio en la estirpe DH10B de *E. coli* la cual, al no producir la enzima RNA polimerasa del bacteriófago, no permite la transcripción de *cap3A*, con lo cual el posible efecto nocivo de Cap3A sobre el microorganismo, que sospechamos pueda existir debido a la delección que repetidamente se produce durante el proceso de construcción de pKER1 en *E. coli*, quedaría anulado.

En primer lugar, amplificamos, mediante PCR, el gen *cap3A* a partir de DNA de la cepa 406. Utilizamos los oligonucleótidos PCAP20 y PCAP22 (Tabla 4), que crean dos dianas de restricción, *NdeI* y *NsiI* (posiciones 5908 y 7195, respectivamente; Figura 10). La reacción de PCR se llevó a cabo en las condiciones que se indican en el apartado 6 de esta sección variando únicamente la temperatura de hibridación que fue, en este caso, de 58°C. Purificamos el producto de la reacción y, tras tratarlo con las endonucleasas *NdeI* y *NsiI*, se incluyó en una mezcla de ligación con el vector pT7-7 tratado con *NdeI* y *PstI*. Esta mezcla de ligación se utilizó para transformar células de la estirpe DH10B de *E. coli* y, de este modo, se seleccionó un transformante Ap^R que contenía el plásmido pTVU1.

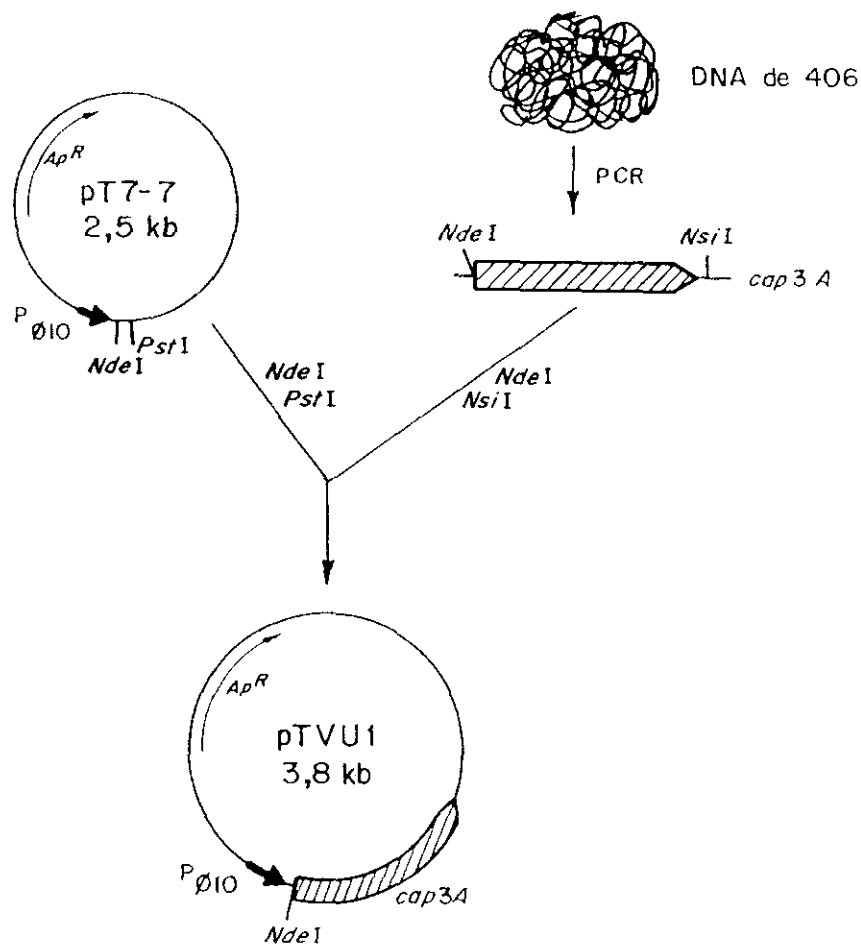


Figura 27. Construcción del plásmido pTVU1 que contiene el gen *cap3A* bajo el control del promotor del gen 10 del fago T7. Ap^R representa el gen que determina la resistencia a ampicilina; P ϕ 10 representa el promotor del gen 10 del fago T7.

7.1.2. PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA CAP3A EN *E. COLI*

Como se ha señalado anteriormente, para producir la proteína Cap3A es necesario introducir el plásmido pTVU1 en una estirpe de *E. coli* que produzca la enzima RNA polimerasa del fago T7. Utilizamos el plásmido pTVU1 para transformar la estirpe JM109(DE3) y seleccionamos un transformante Ap^R que contenía el plásmido completo, como se confirmó mediante la secuenciación completa del gen utilizando los oligonucleótidos adecuados. A continuación, obtuvimos un extracto celular de la estirpe JM109(DE3) (pTVU1) a partir de un cultivo en el que la producción de la RNA polimerasa del fago T7 había sido inducida mediante la adición de IPTG (concentración final 0,5 mM), durante 90 minutos a 37°C. Dicho extracto fue analizado mediante SDS-PAGE. Como muestra control utilizamos un extracto celular obtenido en idénticas condiciones a partir de un cultivo de la cepa JM109(DE3) (pT7-7). De este modo, observamos la formación, en el extracto de la cepa JM109(DE3) (pTVU1), de una proteína de aproximadamente 46 kDa (Figura 28) que corresponde, aproximadamente, a la M_r deducida a partir de la secuencia de nucleótidos de *cap3A* (44.700). A continuación, las proteínas fueron transferidas a una membrana Immobilon-P^{SQ} (Millipore), y teñidas con negro Amido (Sigma). Se cortó la banda correspondiente a la proteína de 47 kDa y se determinó la secuencia de su extremo N-terminal, que resultó ser Met-Lys-Ile-Ala-Ile-Ala-Gly, lo que confirmó que se trataba de la proteína Cap3A.

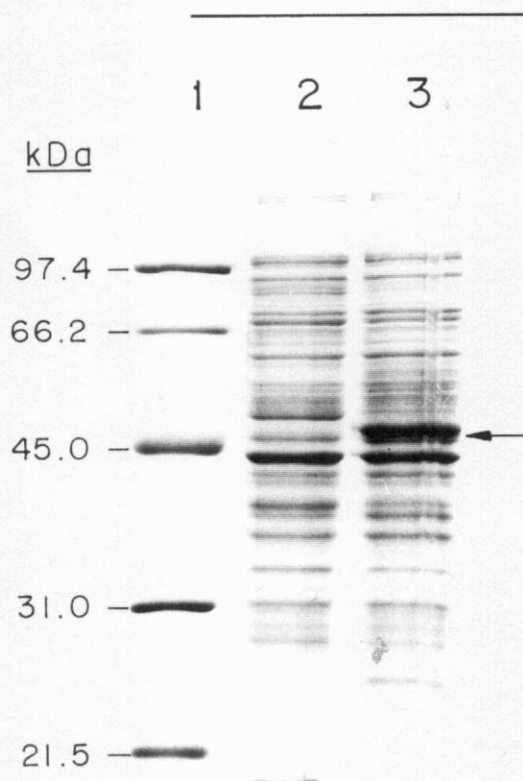


Figura 28. Análisis, mediante SDS-PAGE, de la expresión del gen *cap3A* en *E. coli* JM109(DE3) (pTVU1). Carril 1, marcadores de peso molecular; carril 2, extracto total de células de un cultivo de *E. coli* JM109(DE3) (pT7-7) tras una hora de inducción con IPTG; carril 3, extracto total de células de un cultivo de *E. coli* JM109(DE3) (pTVU1) tras una hora de inducción con IPTG a 30°C. La flecha indica la proteína inducida. La masa molecular de los marcadores (en kDa) se indica a la izquierda.

7.1.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD *IN VITRO* DE CAP3A

Un estudio más detallado de la producción de Cap3A por la cepa JM109(DE3) (pTVU1) reveló que la práctica totalidad de la proteína codificada por el gen *cap3A* se encontraba en forma insoluble en estos extractos, probablemente debido a la formación de cuerpos de inclusión. Para tratar de obtener la proteína en forma soluble, los cultivos fueron incubados a 30°C, con el fin de reducir la síntesis proteica y, consiguientemente, la probabilidad de formación de cuerpos de inclusión. En efecto, cuando analizamos, mediante SDS-PAGE, los extractos así obtenidos encontramos que, si bien la intensidad de la banda correspondiente a Cap3A era menor, dicha banda aparecía mayoritariamente en la fracción soluble del extracto. De este modo, para llevar a cabo el análisis de la actividad enzimática *in vitro* de Cap3A realizamos el ensayo según se indica en el apartado 16.1. de Materiales y Métodos, utilizando como muestra control un extracto celular de la cepa JM109(DE3) (pT7-7) y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.

Se pudo observar que el pH óptimo para la reacción catalizada por la enzima Cap3A es 9,0; por otro lado, su temperatura óptima parece ser 30°C, ya que cuando realizamos el ensayo a 25°C o a 37°C, la actividad enzimática disminuyó considerablemente. Además, en contraste con los resultados obtenidos previamente (Mills, 1969), el catión Mg^{2+} no parece ser necesario para la actividad UDP-GlcDH de neumococo, ya que la adición de EDTA a una concentración final de 10 mM no afecta significativamente a la actividad enzimática. Por último, la acetilación de los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína presentes en la proteína Cap3A mediante la adición de ácido iodoacético a una concentración final de 10 mM provoca un descenso muy significativo en la actividad enzimática UDP-GlcDH, indicando que alguna residuo de cisteína interviene en la actividad catalítica de esta proteína. Este hecho ya había sido sugerido anteriormente (Mills, 1969) y confirma los datos deducidos a partir de la comparación de secuencias de aminoácidos (ver apartado 1.8 de esta sección).

Tabla 9. Actividad UDP-GlcDH en extractos de *E. coli*

Plásmido ^a	Condiciones de inducción ^b	pH de la reacción (otras condiciones)	Actividad específica ^c (U mg ⁻¹) ($\times 10^2$)	Actividad (%)
pT7-7	no inducido	9,0	— ^d	
pT7-7	3 horas	9,0	—	
pTVU1	no inducido	9,0	2	5,5
pTVU1	1 hora	9,0	36	100
pTVU1	1 hora	8,5	22	61,1
pTVU1	1 hora	8,0	19	52,8
pTVU1	1 hora	7,5	4	11,1
pTVU1	1 hora	9,0 (+ ácido iodoacético 10 mM)	3	8,3
pTVU1	1 hora	9,0 (+ EDTA 10 mM)	34	94,5
pTVU1	3 horas	9,0	—	
pTVU1	1 hora (a 37°C)	9,0	4	11,1
pTVU1	1 hora	9,0 (25°C)	2	5,5
pTVU1	1 hora	9,0 (37°C)	3	8,3

^a La cepa huésped fue JM109(DE3).

^b La inducción se llevó a cabo, durante el tiempo indicado, a 30°C a menos que se indique lo contrario.

^c Los valores son medias aritméticas de tres experimentos independientes.

^d —, no detectable.

Por otra parte, identificamos el producto de la reacción, UDP-GlcA, mediante HPLC según se indica en el apartado 16.2. de Materiales y Métodos. Se determinó la radiactividad de las fracciones recogidas a lo largo de la elución de las muestras obteniéndose de esta forma, los resultados mostrados en la Figura 29. De esta manera observamos que, mientras que en la muestra control la radiactividad se encuentra presente en las fracciones eluidas durante el tiempo correspondiente a la UDP-Glc, en la muestra problema eluye en dos tiempos principalmente, el primero equivalente al de elución de UDP-Glc, y el segundo tiempo al de UDP-GlcA. Además, analizamos la presencia de ácidos urónicos (apartado 18.4 de Materiales y Métodos) en cada una de las fracciones obtenidas tras la

cromatografía, y observamos reacción positiva únicamente en las fracciones correspondientes al pico de UDP-GlcA.

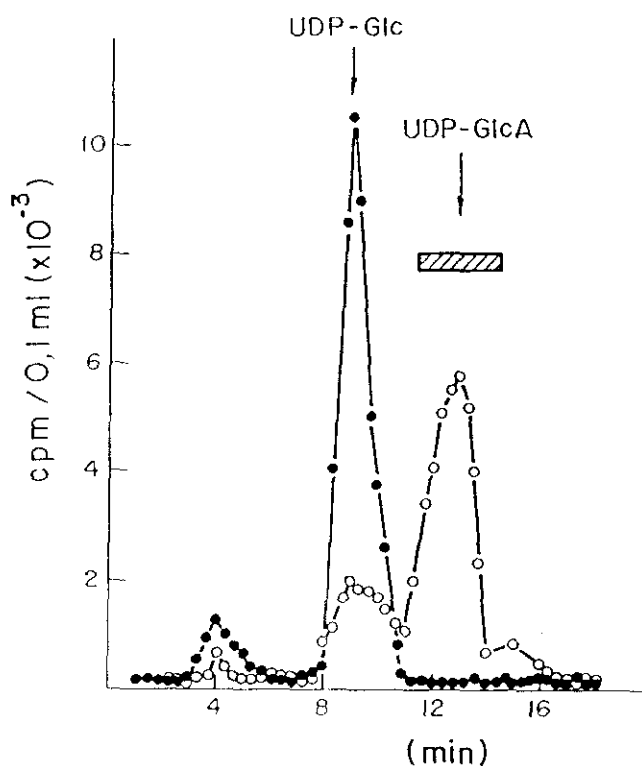


Figura 29. Análisis mediante HPLC de la formación de UDP-GlcA a partir de UDP-Glc. Se incubó UDP-[U-¹⁴C]Glc con extractos preparados a partir de células de cultivos de *E. coli* JM109(DE3) (pTVU1) sin inducir (●) o inducidos (○) con IPTG durante una hora a 30°C y a continuación se analizaron en una columna de HPLC. Las flechas indican la posición de los patrones de UDP-Glc y UDP-GlcA; la barra horizontal muestra las fracciones eluidas que dieron positiva la reacción de carbazol.

7.2. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA CAP3B

7.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MUTACIÓN DE LA CEPA NR3-12

Tal y como se comentó en el apartado 6 de esta sección, de entre todos los mutantes rugosos espontáneos obtenidos en nuestro laboratorio, tan sólo uno de ellos, la estirpe NR3-12, se encontraba mutado fuera del gen *cap3A*. En concreto, observamos que la mutación se encontraba en el extremo 5' del gen *cap3B*, entre las posiciones 7111 y 7768 (Tabla 8) de la secuencia mostrada en la Figura 10. Para identificar la mutación presente en la cepa NR3-12, amplificamos, mediante PCR utilizando los oligonucleótidos PCAP3B y

PCAP21 y las condiciones de reacción indicadas en el apartado 6 de esta sección, el gen *cap3B* a partir del DNA de la cepa NR3-12. La secuenciación de dicho gen reveló que la mutación consiste en la inserción de un sola base, una T, en una región compuesta por seis T, que abarca desde la posición 7177 hasta la 7182, próxima por tanto al extremo 5' del gen (Figura 30). Dicha inserción provoca la aparición de un codón de terminación, TAA, en la posición 7232 (Fig. 10). Esta mutación causaría la síntesis de una proteína Cap3B truncada y, muy posiblemente, inactiva; sin embargo, cuando analizamos más detalladamente la cepa NR3-12, observamos que producía una pequeña cantidad de polisacárido capsular de tipo 3 (aproximadamente un 10% de la observada en la cepa salvaje, que es de entre 10 y 50 μg por cada 10^8 células) (datos no mostrados). Este hecho podría ser explicado mediante la existencia de un 'salto' ocasional de tipo +1 en el marco de lectura, es decir, el ribosoma 'saltaría' una base hacia adelante retomando el marco de lectura original. De este modo, se produciría una pequeña cantidad de proteína Cap3B activa, que sintetizaría una cierta cantidad de polisacárido capsular de tipo 3. Este fenómeno de deslizamiento del ribosoma ya ha sido descrito en el caso de diversos genes y en diferentes especies (Engelberg-Kulka y Schoulaker-Schwarz, 1994).

7.2.2. CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE PARA EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *CAP3B* EN *E. COLI*

En la Figura 31 se muestra la clonación del gen *cap3B* en *E. coli*, utilizando el vector pT7-7. Para llevar a cabo la clonación, amplificamos, mediante PCR, el gen *cap3B* a partir de DNA cromosómico de la cepa 406. Utilizamos los oligonucleótidos PCAP3B y PCAP21; el primero crea una diana de restricción *NdeI* en la posición 7079 (Fig. 10) mientras que el segundo incluye en su secuencia la diana *PstI* (posición 8693, Figura 10). Las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción fueron las que se describen en el apartado 6 de esta sección. Tras la reacción de PCR, el producto, purificado mediante GeneClean, fue tratado con las endonucleasas *NdeI* y *PstI* e incluido con el vector tratado con estas dos mismas enzimas en una mezcla de ligación, que se utilizó para transformar la estirpe JM109 de *E. coli*. Así, seleccionamos una estirpe transformante Ap^{R} que contenía el plásmido pTBP3 [JM109(pTBP3)].

estirpe NR3-12	M Y T F I L M L L D F F Q N H D F H F F M L F F C L Y S Y	29
estirpe 406	M Y T F I L M L L D F F Q N H D F H F F M L F F V F I L	28
	GGG GAATAATTTTATGATACATTTATTTAATGTTGTTGGATTTTTTCAGAAICATGATTTTCATTTCTTTATGTTGTTTTTTGTCCTTATTTTAA	100
	GGGTTTACTAAAAATACATATGTAATAAAAAATACAACAACCTAAAAAAGTCTTAGTACTAAAAAGTAAAGAAATACACAAAAAACAGAAATAAGAAAT	
	estirpe NR3-12 GTTTTTTTCT	
	S L G G Y I F S C C Q I *	41
	I R W A V I Y F H A V R Y K S Y S C S V S D E K L F S S V I I P V V	62
	TTGTTTGGGTTTATATATTTTCATTCGTGACAGATATAAGTCTACAGTTGTAGTGTAAAGTATGAGAAGTTATTTAGTTCTGTAATATATCCCTGTCGT	200
	AAGCAATGGCAAAATATATAAAGTACGACAGTCTATATTCAGGATGTCACATCAATTCACACTCTTCAATAAATCAAGACATTAATAAGGACAGCA	
	D E P L N L F E S V L N R I S R H K P S E I I V V I N G P K N E R	95
	GGATGAAGTACTAATCTTTTGAAGGTGACTGAATAGAATTTCCAGACATAAACATCCGAAATTAATGTTGGTTATTAACGGCCCAAAAAACGAGAGA	300
	GGTAATTTGTTGAATTAGAAAAAATTCACATGACTTTATCTTAAAGGCTGTATTTGGTAGGGCTTAAATAACACCAATAATTCGGCGGTTTTTTGGCTCTCT	
	L V K L C H D F N E K L E N N M T P I Q C Y Y T P V P G K R N A I	128
	CTTGTAAAACCTTTTCATGATTTTAAATGAAAAATAGAAAAATAATGACTCCAATTCATGTTTATACACTCTCTCTCTCGGCAAGAATAATGCTATCC	400
	GAACAATTTGAAATATACAAAAATACCTTTTAAATCTTTATTATACTGAGGTAAAGTTACAATAATGTGAGGACAAGGACCGTCTCTTTACGATAGG	
	L F G L E H V D S Q S D I T V L V D S D T V W T P R T L S E L L K P	162
	TCCTTGGCTGGAGATGCTGGATTCGACAGACTGATATACAGTCTCTAGTAGATAGTGATACAGTATGGACGCTAGAACTTGGAGTGTCTGCTGAAGCC	500
	AGAAACCGACCTCTACACCTTAAGGCTCACTATAATGTCAAGATCACTATCCATACCTGCGGATCTTGGAACTCACTCAACGACTTCGCT	
	F V C D K K I G G V T T R Q K I L D P E R N L V T M F A N L L E E	195
	TTTTGTTTGGGATAAAAAATAGTGGGGTAACGACAAGACAAAAAATCTTTGACCTGAGCGTAATCTCGTGACAATGTTTACTAACCTGTAGAGGAA	600
	AAAAACAACCGCTATTTTTTATCCACCCCATTCCTGTCTCTTTTTAAAGAACGGGACTCGCATAGAGCACTGTACAAAAGGATCAACAATCTCCCT	
	I R A E G T M K A M S V T G K V G C L P G R T I A F R T E I L R E	228
	ATTAGGCTACAAGCAACTACGAAGCAATGAGTGTGACTGGTAAAGTAGGGTGGTTACCTGGTCGAAACATTCCTTTTAGAACAAGAGTCTCTCAGAGAT	700
	TAATCCGCTCTCTGATACCTTTGCTTACTCAGACTGACCATTCATCCACCAATGAGCCAGCTGTAAACGAAATCTTGTCTCTAAGAGTCTCTCA	
	C I H E F M N E T F M G F H K E V S D D R S L T N L T L K K G Y K T	262
	GTATACATGAGTTTATGAATGAGCTTTTCATGGGATTTGCATAAGGAAGTTTCTGATGATAGAAGTCTTACAAAATTTGACTTTAAAAAAAGGCTATAAAAC	800
	ATATGCTACTCAAACTACTTACTYTGAAAGTACCCTAAGTATTCCTTCAAGACTACTATCTTCAGAAATGTTTAAACTGAAAATTTTTTTCGATATTTTT	
	V M Q D T S V V Y T D A P T S W K K F I R Q Q L R W A E G S Q Y N	295
	TTTTATGCAAGTACTTTTGTGTTGATACAGATGCTCTTACAAGTTGGAAAAAGTTCATTAGACAGCAACTAAGGTGGGCAAGGTTCTCAGTATAAG	900
	MAAATGCTCTATTAAGCAACAGATATGCTACGAGGATGTTCAACCTTTTTTCAAGTARTCTGTGTTGATTCACCCGCTTTCGAAGATCATATTC	
	N L K M T P W M I R N A P L M F F I Y F T D M I L P M L L I S F G	328
	AATCTAAAATGAGCTCTCTGGATGATFAGAAATGCCCTCTTATGTTTATTTATTTACAGATATGATTTTACCTATGCTACTTATAGCTTTGGTGT	1000
	TTATATTTTACTGTAAGCAACTACTAACTCTTACGGGGAGAAATCAAAAAATAAATAAAATGCTATACTTAAATGGATACGATTAATAATGGAAACCC	
	V N I F L L K I L N I T T I V Y T A S W W E I I L Y V L L G M I F S	362
	TTAAATATATCTCTGTTAAAAATATAAATAAATACATATGTTTATACAGCTTCATCCGCGGAAAATATTTTATATGTTCTTTTGGGAATGATTTTATAG	1100
	ACTTATATAAGGACAACTTTTATAATTTATATTTGATGTTAACAATAATGTCGAAGTACCACCCCTTTAATAAAATATACAAGAAAAACCTTACTAAAAATC	
	F G G R N F K A M S R M K W Y Y V F L I P V F I I V L S I I M C P	395
	TTTTTAAAGCAAAATTTTAAATCTATGTTAGAAATGAAGTGGIATTAAGTATTTCTTATTCCTGTTTTATAAATCGTTCTGACTATAATATATGTCCTT	1200
	GAAGCTCTCTCTTGAATTTGGATACAGATCTTACTTCACCATAATACATAAAGAAATAGGACAAAAATATAGCAAAACTCAATTTAATACAGGGA	
	I R L L G L M R C S D D L G W G T R N L T E *	417
	ATTAGCTTACTTAGCACTTACGACAGTCTCTGATGATTTAGGGTGGGAACTAGGAATTTAACAGAGTAGATATAATATAG	1300
	TAATCAATAAATGCTGAATCTTACAGACTACTTAAATCCACCCCTTGAATCTTAAATGTCCTCACTCTATTTACTACT	

Figura 30. Secuencia de nucleótidos del gen *cap3B* y localización de la mutación de la estirpe NR3-12. Se muestra la secuencia de la doble cadena y sobre ésta se indica la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína Cap3B. La mutación presente en la cepa NR3-12 se muestra en negrita debajo de la secuencia principal, y el fenotipo originado por ella se representa sobre la secuencia de la proteína Cap3B. Los codones de terminación están representados mediante un asterisco.

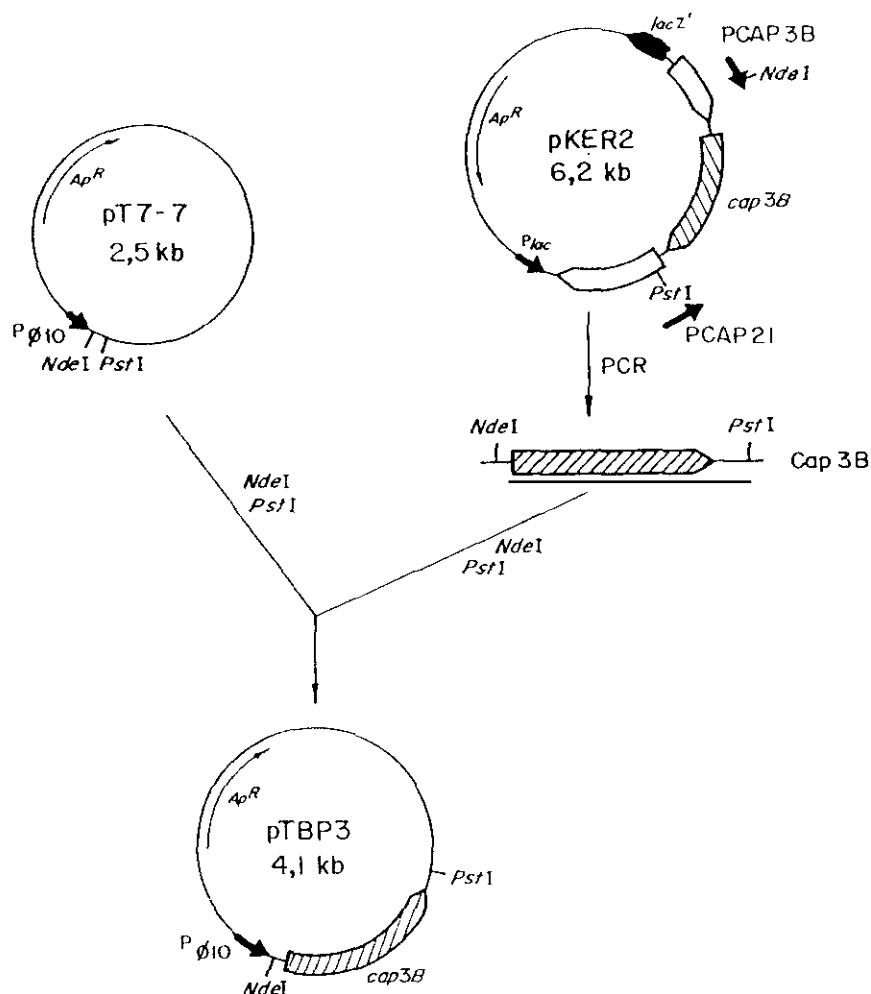


Figura 31. Construcción del plásmido pTBP3 que contiene el gen *cap3B* bajo el promotor del gen 10 del fago T7. Ap^R representa el gen que determina la resistencia a ampicilina; Pφ10 representa el promotor del gen 10 del fago T7. También se indican los oligonucleótidos utilizados en la PCR (PCAP21 y PCAP3B).

7.2.3. PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA CAP3B EN *E. COLI*

Utilizamos el plásmido pTBP3 para transformar cepas de *E. coli* que produjeran la enzima RNA polimerasa del fago T7, con el fin de conseguir la producción de la enzima Cap3B. Para ello fue necesario utilizar la estirpe BL21(DE3)(pLysS), ya que tanto la cepa JM109(DE3) como la BL21(DE3) no produjeron transformantes con el plásmido pTBP3. La cepa utilizada contiene el plásmido pLysS, que porta el gen *cat* determinante de la

resistencia a cloranfenicol, y cuyo replicón es compatible con el de pT7-7. El plásmido pLysS contiene, además, el gen que codifica la *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa del fago T7, que es expresado de manera constitutiva. Es sabido que esta enzima lítica inhibe a la RNA polimerasa del fago (Moffatt y Studier, 1987); por tanto, la presencia del plásmido pLysS en la célula conlleva un control más eficaz de la actividad de la RNA polimerasa y, consiguientemente, de la expresión del gen *cap3B*. De este modo, tras seleccionar una cepa transformante Cm^R y Ap^R [BL21(DE3)(pLysS)(pTBP3)], analizamos la producción de Cap3B y para ello obtuvimos un extracto celular —según se indica en el apartado 14 de Materiales y Métodos— en el que habíamos inducido la producción de RNA polimerasa de T7 durante 90 minutos a 37°C mediante la adición al cultivo de IPTG (concentración final 0,5 mM). Este extracto fue analizado mediante SDS-PAGE utilizando, como muestra control, un extracto celular obtenido en idénticas condiciones a partir de la cepa BL21(DE3)(pLysS)(pT7-7). De este modo, observamos la aparición de un banda correspondiente a una proteína de aproximadamente 50 kDa, (Fig. 32A). A partir de este extracto celular analizamos la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína, resultando ser Met-Tyr-Thr-Phe-Ile-Leu, idéntica a la deducida a partir de la secuencia del gen *cap3B*.

7.2.4. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE POLISACÁRIDO CAPSULAR DE SEROTIPO 3 EN *E. COLI* QUE EXPRESA EL GEN *CAP3B*

Mediante un experimento de doble inmunodifusión en gel pudo ponerse de manifiesto la presencia de polisacárido inmunológicamente idéntico al de serotipo 3 de neumococo en los extractos celulares obtenidos a partir de la estirpe productora de la proteína Cap3B (Fig. 32B). Como era de esperar, en el extracto obtenido a partir de la cepa BL21(DE3)(pLysS)(pT7-7) no se observó la aparición de ninguna banda de precipitación. Como se ve en la Figura 32B, el extracto preparado a partir de un cultivo no inducido de la cepa BL21(DE3)(pLysS)(pTBP3) contiene también polisacárido de serotipo 3, aunque en niveles de entre el 10 y el 25% de los encontrados en cultivos inducidos (datos no mostrados) indicando la existencia de una represión incompleta del promotor del gen $\phi 10$ como ya había sido descrito con anterioridad (Studier, 1991). Por otra parte, el polisacárido producido por los cultivos inducidos de la cepa BL21(DE3)(pLysS)(pTBP3) resultó ser

aproximadamente de entre el 1 y 5% del sintetizado por las cepas de neumococo de serotipo 3 (datos no mostrados).

El polisacárido producido por la estirpe de *E. coli* que contiene el plásmido pTBP3 resultó tener un alto peso molecular, tal y como observamos mediante filtración en gel utilizando una columna de Sepharose CL-4B (Pharmacia), ya que eluyó en el volumen de exclusión de la columna, de la misma manera que lo hizo el polisacárido producido por la estirpe 406 de neumococo. Por otra parte, utilizamos un cultivo sin inducir de la estirpe de *E. coli* productora de polisacárido serotipo 3 para determinar la localización subcelular de éste. Así, encontramos que una gran parte, aproximadamente el 40%, se encontraba en el espacio periplásmico, mientras que otro 40 ó 50% estaba en el citoplasma de la célula y el 10 ó 20% restante en la fracción membranosa (datos no mostrados).

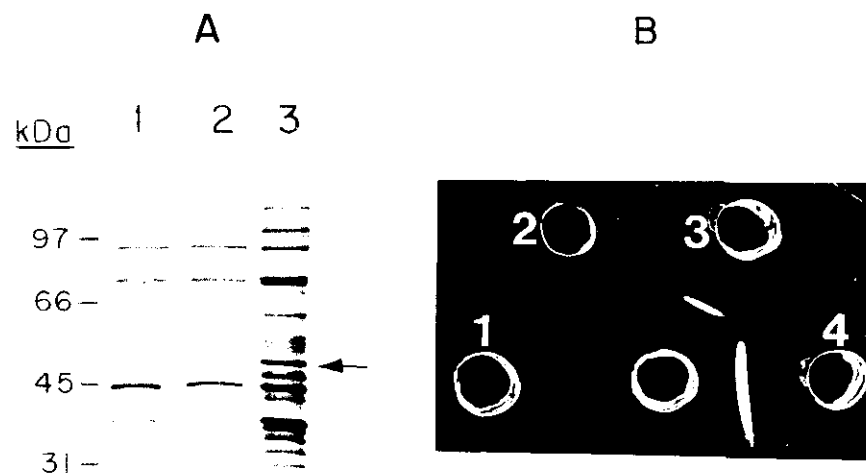


Figura 32. Expresión del gen *cap3B* en *E. coli* y producción de polisacárido capsular de tipo 3. Panel A, análisis mediante SDS-PAGE de la producción de Cap3B en una estirpe de *E. coli* que expresa el gen *cap3B*. Se utilizó un gel de poliacrilamida al 10%. Carril 1, extracto total de células de un cultivo de *E. coli* BL21(DE3) (pLysS)(pT7-7) inducido con IPTG durante una hora; carriles 2 y 3, extractos totales de células de un cultivo de *E. coli* BL21(DE3) (pLysS)(pTBP3) obtenidos antes y después de la inducción con IPTG, respectivamente. La banda correspondiente a la proteína Cap3B se indica mediante una flecha. Panel B, ensayo de inmunodifusión doble en gel. Los pocillos 1, 2 y 3 contienen los extractos correspondientes a los carriles 1, 2 y 3 del panel A, respectivamente. El pocillo 4 contiene polisacárido de *S. pneumoniae* de tipo 3. El pocillo central contiene suero anti-serotipo 3.

7.2.5. CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE PARA LA CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN *CAP3B* EN NEUMOCOCO

Como habíamos observado anteriormente (ver apartado 2 de esta sección), el gen *cap3B* es específico del serotipo 3, y era interesante estudiar la producción de Cap3B en estirpes de neumococo pertenecientes a otros serotipos. Para ello, construimos el plásmido pLSE3B, tal y como se indica en la Figura 33, utilizando como vector el plásmido pLSE1, capaz de replicar tanto en neumococo como en *E. coli*. El fragmento *PvuII-HindIII* (posiciones 6749 y 8729, respectivamente; Figura 10) obtenido a partir de pKER2, fue ligado a pLSE1, digerido previamente con *EcoRV* y *HindIII*. Esta mezcla de ligación se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* C600, obteniéndose así un transformante Ery^R Tc^S que contenía el plásmido pLSE3B, en el cual la expresión del gen *cap3B* quedaba bajo el control del promotor que dirige la transcripción del gen responsable de la resistencia a tetraciclina.

7.2.6. OBTENCIÓN DE ESTIRPES DE NEUMOCOCO QUE PRESENTAN UN FENOTIPO BINARIO AL EXPRESAR EL GEN *CAP3B*

De acuerdo con los resultados comentados anteriormente (ver apartado 7.2.3), todo parecía indicar que la proteína Cap3B es, tal y como habíamos supuesto basándonos en el análisis comparativo de su secuencia de aminoácidos, la polisacárido-sintasa del serotipo 3 de neumococo, es decir, una enzima con actividad glicosil-transferasa que es capaz, además, de catalizar la formación de los dos tipos de enlace presentes en el polisacárido capsular de serotipo 3. Para confirmar esta suposición, transformamos 4 estirpes capsuladas de neumococo —M25, 15783/94, 8595/95 y 6028 pertenecientes a los serotipos 1, 2, 5 y 8, respectivamente— con el plásmido pLSE3B y analizamos el fenotipo de las estirpes transformantes Lin^R obtenidas. De este modo, observamos que éstas producían, además de polisacárido capsular de su serotipo original, una cantidad significativa de polisacárido capsular de serotipo 3, tal y como se muestra en la Figura 34. También observamos que al transformar las estirpes rugosas de serotipo 2, M11 y M31 con el plásmido pLSE3B los transformantes Lin^R producen únicamente cápsula de serotipo 3 (Fig. 34). Este polisacárido es el resultado de la actividad enzimática de Cap3B a partir de UDP-Glc —compuesto relacionado con el metabolismo general de la célula— y UDP-GlcA que se encuentra presente en el citoplasma de las células pertenecientes, entre otros, a los serotipos utilizados

en este experimento. Esta presencia se debe a su participación en la biosíntesis de la cápsula original como forma donadora de GlcA, como es el caso de los serotipos 2, 5 y 8 o como intermediario en la síntesis de UDP-GalA, en el caso de las células pertenecientes al serotipo 1 (Smith y cols., 1958b; Mills y Smith, 1965).

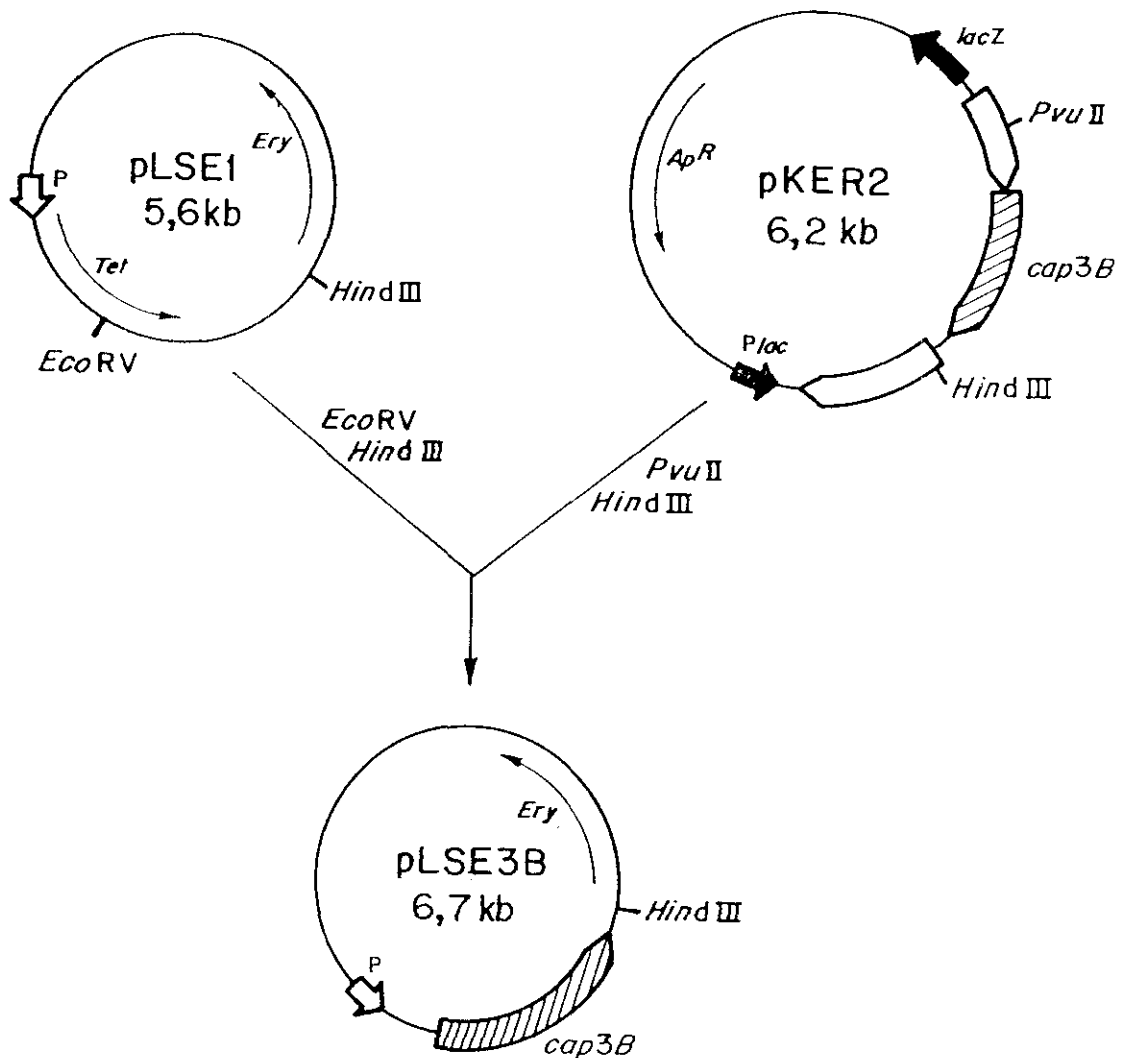


Figura 33. Construcción de un plásmido recombinante (pLSE3B) que contiene el gen *cap3B* y se replica en *S. pneumoniae*. *Ery*, representa el gen que determina la resistencia a eritromicina. *Ap^R*, el que determina la resistencia a ampicilina y *Tet*, el que determina la resistencia a tetraciclina. *P*, indica el promotor de *Tet*.

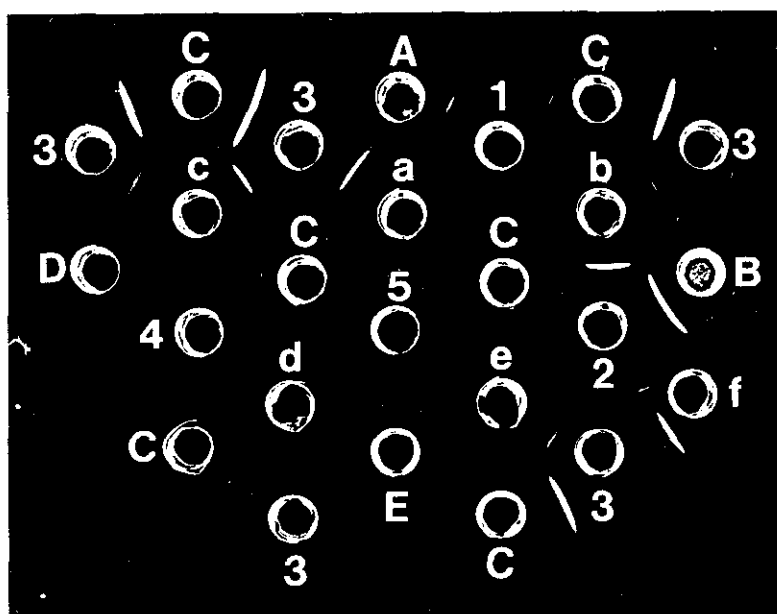


Figura 34. Análisis, mediante inmunodifusión doble en gel, de la producción de polisacáridos capsulares en estirpes de neumococo con fenotipo 'binario'. 1 a 5 indican antisuecos contra polisacáridos capsulares de neumococo de los serotipos 1, 2, 3, 5 y 8, respectivamente. Las letras A a E designan polisacáridos capsulares purificados de estirpes de *S. pneumoniae* de los serotipos 1, 2, 3, 5 y 8, respectivamente. Las letras 'a' a 'd' corresponden a extractos obtenidos a partir de transformantes 'binarios' de los serotipos 1/3, 2/3, 5/3 y 8/3, respectivamente. e y f indican polisacáridos preparados a partir de transformantes capsulados de M11 y M31 de serotipo 3, respectivamente.

7.3. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA CAP3C

7.3.1. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PKALI

Llevamos a cabo la construcción de un plásmido que contuviera el gen *cap3C*, para su expresión en una estirpe de *E. coli*, tal y como se describe en la Figura 35. Para ello, digerimos el plásmido recombinante pKER2 con las endonucleasas *Xba*I y *Eco*RI y purificamos el fragmento que abarca desde el nt 8225 hasta el 9704 (Fig. 10). A continuación lo ligamos al plásmido pUC19 digerido previamente con las mismas enzimas.

Esta mezcla de ligación fue utilizada para transformar la estirpe DH10B de *E. coli* y de esta forma seleccionamos un transformante Ap^R que contenía al plásmido pKAL1.

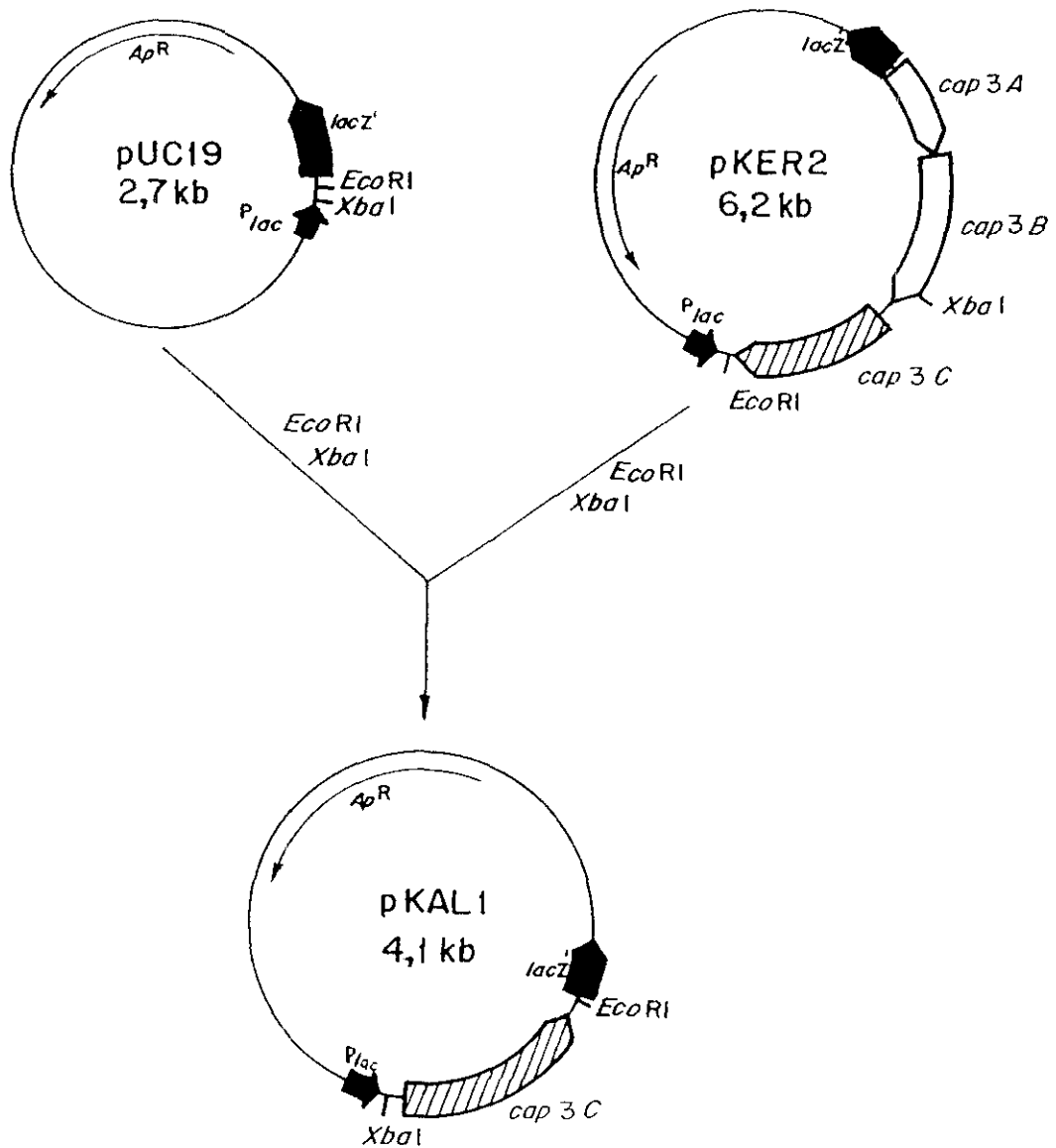


Figura 35. Construcción del plásmido pKAL1 que contiene el gen *cap3C* bajo el promotor del operón *lac*. Ap^R, representa el gen que determina la resistencia a ampicilina; P_{lac}, designa el promotor del operón del metabolismo de la lactosa de *E. coli*.

7.3.2. COMPLEMENTACIÓN DE UNA MUTACIÓN *galU* DE *E. COLI* POR EL PLÁSMIDO pKAL1

Durante los últimos años se han clonado e identificado los genes que codifican las UDP-Glc pirofosforilasas de varios organismos, tanto procarióticos como eucarióticos (Ragheb y Dottin, 1987; Valla y cols., 1989; Katsube y cols., 1991; Peng y Chang, 1993; Soldo y cols., 1993; Crater y cols., 1995). Entre estos organismos se encuentra *E. coli*, cuyo gen *galU* ha sido recientemente clonado, y su correspondiente proteína purificada y caracterizada (Weissborn y cols., 1994). Por otra parte, algunos de los efectos producidos por la inactivación de este gen se conocen desde hace mucho tiempo, y han sido objeto de amplios estudios bioquímicos (Sundararajan y cols., 1962; Fukasawa y cols., 1963; Komeda y cols., 1977; Giæver y cols., 1988); así, uno de los fenotipos más característicos derivados de la deficiencia en esta enzima es el que conlleva la incapacidad para utilizar galactosa como fuente de carbono (Sundararajan y cols., 1962). Como consecuencia, cuando el cultivo de un mutante *galU* de *E. coli* se lleva a cabo en medio sólido de MacConkey suplementado con galactosa al 0,6%, se obtienen unas colonias diminutas e incoloras, mientras que la estirpe silvestre crece formando colonias grandes y de un intenso color rojo, debido a la acidificación del medio por la fermentación del azúcar (Peng y Chang, 1993). De este modo, procedimos a transformar la estirpe FF4001 con el plásmido pKAL1 y seleccionamos los transformantes Ap^R sobre placas de medio MacConkey suplementado con galactosa al 0,6% y ampicilina (100 µg ml⁻¹). Así, encontramos que todos los transformantes Ap^R crecían formando colonias rojas (Fig. 36). Por tanto, habíamos demostrado que la enzima Cap3C de neumococo es capaz de suplir la deficiencia de una cepa de *E. coli* en la enzima GalU, indicando que, en efecto, Cap3C es una UDP-Glc pirofosforilasa.

7.3.3. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PTNC41

Analizando en un gel de poliacrilamida-SDS los extractos celulares obtenidos a partir de cultivos de las cepas DH10B (pKAL1) y FF4001 (pKAL1) no se observó la aparición de ninguna banda adicional respecto a los extractos utilizados como control, que pudiera corresponder a la proteína Cap3C. Por tanto, parecía que, si bien esta enzima era producida en cantidad suficiente para suplir la deficiencia de la célula en la proteína GalU, dicha producción no era lo suficientemente elevada como para permitir su detección en geles de poliacrilamida-SDS. Por esta razón, procedimos a construir un plásmido en el que la

transcripción del gen *cap3C* estuviera dirigida por un promotor fuerte. Para ello, utilizamos el vector pT7-4, que contiene el promotor del gen $\phi 10$ del fago T7, utilizado con anterioridad para llevar a cabo la expresión de los genes *cap3A* y *cap3B* en *E. coli* y construimos el plásmido pTNC41, según se indica en la Figura 37. El fragmento de DNA que contiene el gen *cap3C*, utilizado para la construcción del plásmido pKAL1, fue en este caso ligado al plásmido pT7-4 previamente digerido con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*; a continuación, esta mezcla de ligación fue utilizada para transformar la cepa JM109 de *E. coli* y seleccionamos los transformantes Ap^R, obteniendo de este modo, uno que contenía el plásmido pTNC41.

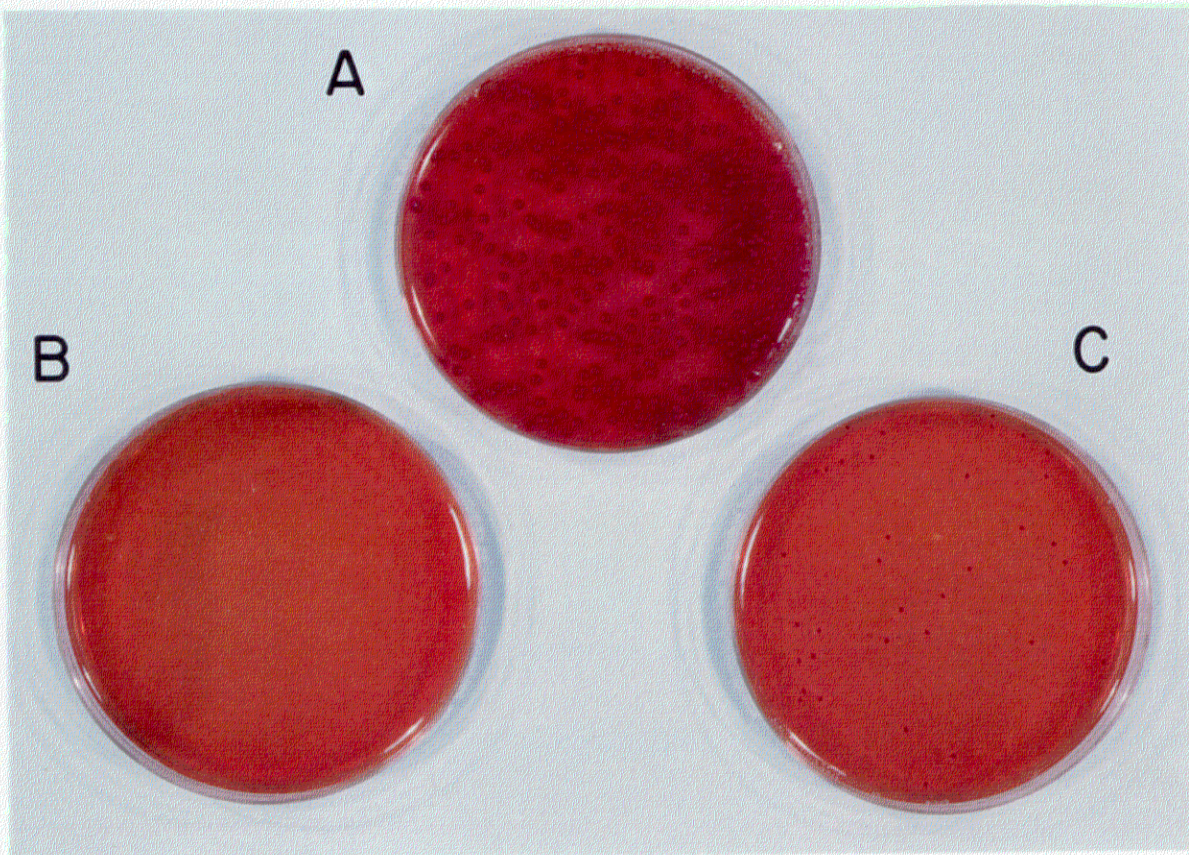


Figura 36. Complementación de la mutación *galU* en la estirpe de *E. coli* FF4001 mediante la adquisición del plásmido pKAL1. Placa A, medio MacConkey agar base suplementado con galactosa al 0,6% y ampicilina, e inoculado con células de la cepa FF4001(pKAL1); placa B, medio MacConkey agar base suplementado con galactosa al 0,6% e inoculado con células de la estirpe FF4001; placa C, medio MacConkey agar base suplementado con glucosa al 0,6% e inoculado con células de la estirpe FF4001.

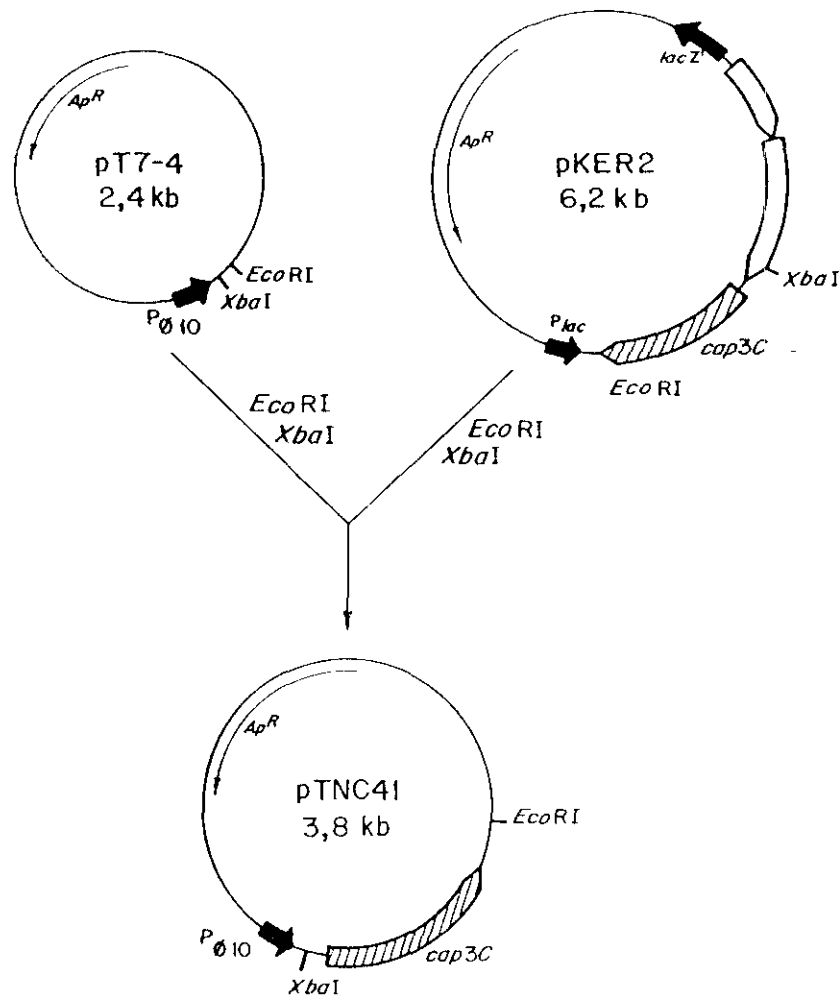


Figura 37. Construcción del plásmido pTNC41 que contiene el gen *cap3C* bajo el promotor del gen 10 del fago T7. *Ap^R* representa el gen que determina la resistencia a ampicilina; *P_{φ10}* representa el promotor del gen 10 del fago T7.

7.3.4. PRODUCCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA ENZIMA CAP3C EN *E. COLI*

Al igual que en el caso del gen *cap3A* (apartado 7.1 de esta sección), para llevar a cabo la expresión del gen *cap3C* es necesario introducir el plásmido pTNC41 en una cepa de *E. coli* que produzca la RNA polimerasa del fago T7; así, utilizamos la cepa JM109(DE3) y analizamos la producción de Cap3C en un transformante que contenía el plásmido pTNC41 mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. De este modo, como se muestra en la Figura 38, encontramos que en los extractos celulares obtenidos a partir de cultivos en los que la producción de RNA polimerasa de T7 había sido inducida durante 75 minutos

mediante la adición al cultivo de IPTG (concentración final 0, 5mM), aparecía una intensa banda, correspondiente a una proteína de aproximadamente 35 kDa que no existía en extractos celulares a partir de cultivos de la cepa JM109(DE3) (pT7-4). Analizando la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de esta proteína encontramos que correspondía totalmente con la deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *cap3C*. Cuando analizamos más detalladamente esta producción, observamos que la proteína Cap3C se encontraba prácticamente en su totalidad en la fracción insoluble de estos extractos. Con objeto de reducir la tasa de síntesis proteica y tratar de evitar la formación de cuerpos de inclusión, al igual que en el apartado 7.1.3 de esta sección, la obtención de los extractos celulares se llevó a cabo a partir de cultivos realizados a 30°C y en medio M63 suplementado con glucosa al 0,2%, aunque, en este caso, lamentablemente, no se obtuvo el resultado deseado.

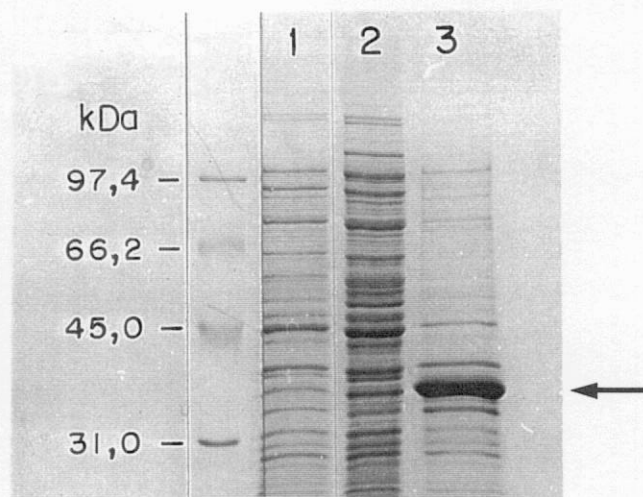


Figura 38. Análisis, mediante SDS-PAGE, de la expresión del gen *cap3C* en *E. coli*. Se utilizó un gel de poliacrilamida al 12%; carril 1, marcadores de peso molecular; carril 2, extracto celular obtenido a partir de un cultivo de la cepa JM109(DE3) (pT7-4) inducido con IPTG durante una hora; carriles 3 y 4, fracciones soluble y de membrana, respectivamente, de un extracto celular obtenido a partir de un cultivo de la cepa JM109(DE3) (pTNC41) inducido con IPTG durante una hora. La proteína inducida se indica con una flecha. La masa molecular de los marcadores, en kDa, se indica a la izquierda.

8. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO *EcoRI-BclI* SITUADO EN POSICIÓN 3' CON RESPECTO AL GEN *CAP3C*

Como se ha descrito anteriormente, el tamaño del mRNA sintetizado a partir del promotor del operón *cap3* indicaba que éste debía incluir, al menos, un cuarto gen. Para analizar la posible implicación de este gen en la biosíntesis capsular, así como para estudiar la presencia de otros genes que pudieran intervenir en dicha biosíntesis, procedimos a clonar esta región de DNA en *E. coli*. Para ello, utilizamos la estirpe *Lin*^R denominada M23 (pUCEK2), obtenida en el apartado 5 durante la inactivación del gen *cap3C*. De acuerdo con el modelo propuesto por Morrison y cols. (1984), durante la obtención de esta cepa se debió producir un proceso de recombinación mediante el cual el plásmido pUCEK2 se insertó en el cromosoma bacteriano, quedando éste con una disposición genética similar a la mostrada en la Figura 39A.

8.1. OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO PUCEK21

De acuerdo con lo mostrado en la Figura 39A, la digestión del DNA cromosómico de la cepa M23 (pUCEK2) con algunas endonucleasas de restricción, tales como *KpnI*, *SacI* o *BclI*, generaría fragmentos que contendrían el origen de replicación del plásmido y el gen que determina la resistencia a Ap, provenientes de pUC19, así como fragmentos de DNA de neumococo de diferentes tamaños, según la endonucleasa utilizada. Estos fragmentos contendrían, además de la región *PstI-EcoRI* contenida en pKER2 (nt 8693 a nt 9704, Fig. 10), una región nueva situada en posición 3' respecto a *cap3C*.

Se purificó DNA cromosómico de la estirpe M23 (pUCEK2) y realizamos un mapa de restricción de la zona situada a continuación de *cap3C*, mediante su hibridación con pKER21, que contiene prácticamente todo este gen, y con pKER23. Esta última sonda nos indica cual de las dos bandas de hibridación obtenidas con pKER21 era la correspondiente al fragmento *EcoRI* de 9704 pb. De este modo construimos el mapa físico mostrado en la Figura 39B. Se puede observar que la endonucleasa *BclI* libera un fragmento de aproximadamente 8 kb, siendo éste el de mayor tamaño obtenido al emplear las endonucleasas antes mencionadas. De esta manera, digerimos el DNA de la cepa M23 (pUCEK2) con *BclI* y tras someterlo a una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión, purificamos, mediante la técnica de la β -agarosa, los fragmentos situados en un

intervalo de tamaños de entre 7 y 9 kb. A continuación, los incluimos en una mezcla de ligación, que fue utilizada para transformar la cepa TG1 de *E. coli*. Así, encontramos una estirpe transformante Ap^R que contenía el plásmido pUCEK21 (Figura 39C).

8.2. SECUENCIACIÓN DEL INSERTO CONTENIDO EN EL PLÁSMIDO pUCEK21

La secuenciación del fragmento de DNA contenido en el plásmido pUCEK21 se llevó a cabo con un secuenciador automático según se detalla en el apartado 10 de Materiales y Métodos, mediante el uso de oligonucleótidos sintéticos. Además, se construyeron tres subclones del plásmido pUCEK21, denominados pUCEK211, pUCEK213 y pUCEK214; el primero de ellos fue construido ligando el fragmento *EcoRI-PstI* (nt 9870-12097) (Fig. 10) al plásmido pUC18 digerido previamente con estas dos mismas endonucleasas. El segundo de los subclones se construyó ligando el fragmento *SacI-PstI* (posiciones 11008 a 12097, Fig. 10) al plásmido pUC18 digerido con estas dos mismas enzimas. Por último, el plásmido pUCEK214 se construyó ligando el fragmento *PstI-PstI* (posiciones 12097 a 13004, Fig. 10) al plásmido pUC18 previamente digerido con *PstI*. La secuencia así obtenida (nt 9705-14056) se muestra en la Figura 10.

8.3. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA SECUENCIA DEL INSERTO DE pUCEK21

El análisis de la secuencia de nucleótidos comprendida entre los nt 9570 y 14056, reveló la presencia de una nueva ORF (*orf3*) (Figs. 10 y 40). Ésta comenzaría en el nt 12671 y terminaría en el nt 13792. La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la de nucleótidos de la *orf3* reveló un cierto parecido con la secuencia de la proteína NanA —una enzima con actividad neuraminidasa— de neumococo, si bien ésta última es de un tamaño mucho mayor (1035 aminoácidos frente a 373 de la Orf3) (Cámara y cols., 1994), siendo este parecido más acusado en el extremo N-terminal de la proteína tal y como se muestra en la Figura 41. La proteína Orf3 comienza coincidiendo con la secuencia del péptido señal de NanA, y comparte una zona de ocho aminoácidos, del 31 al 38, idéntica a la de la neuraminidasa; asimismo, los tres últimos aminoácidos de esta zona, VLA, probablemente constituyen el lugar de actuación de la peptidasa, como ya se sugirió para el caso de NanA (Cámara y cols., 1994), ya que cumplen la regla '-3,-1' (Perlman y Halvorson, 1983), según la cual los tres últimos aminoácidos del péptido señal definen el lugar de ruptura; de estos tres, los aminoácidos -3 y -1 (siendo al aminoácido +1 el primero

de la proteína madura) deben presentar cadenas laterales pequeñas y sin carga, capaces de permitir la interacción de la proteína con la peptidasa.

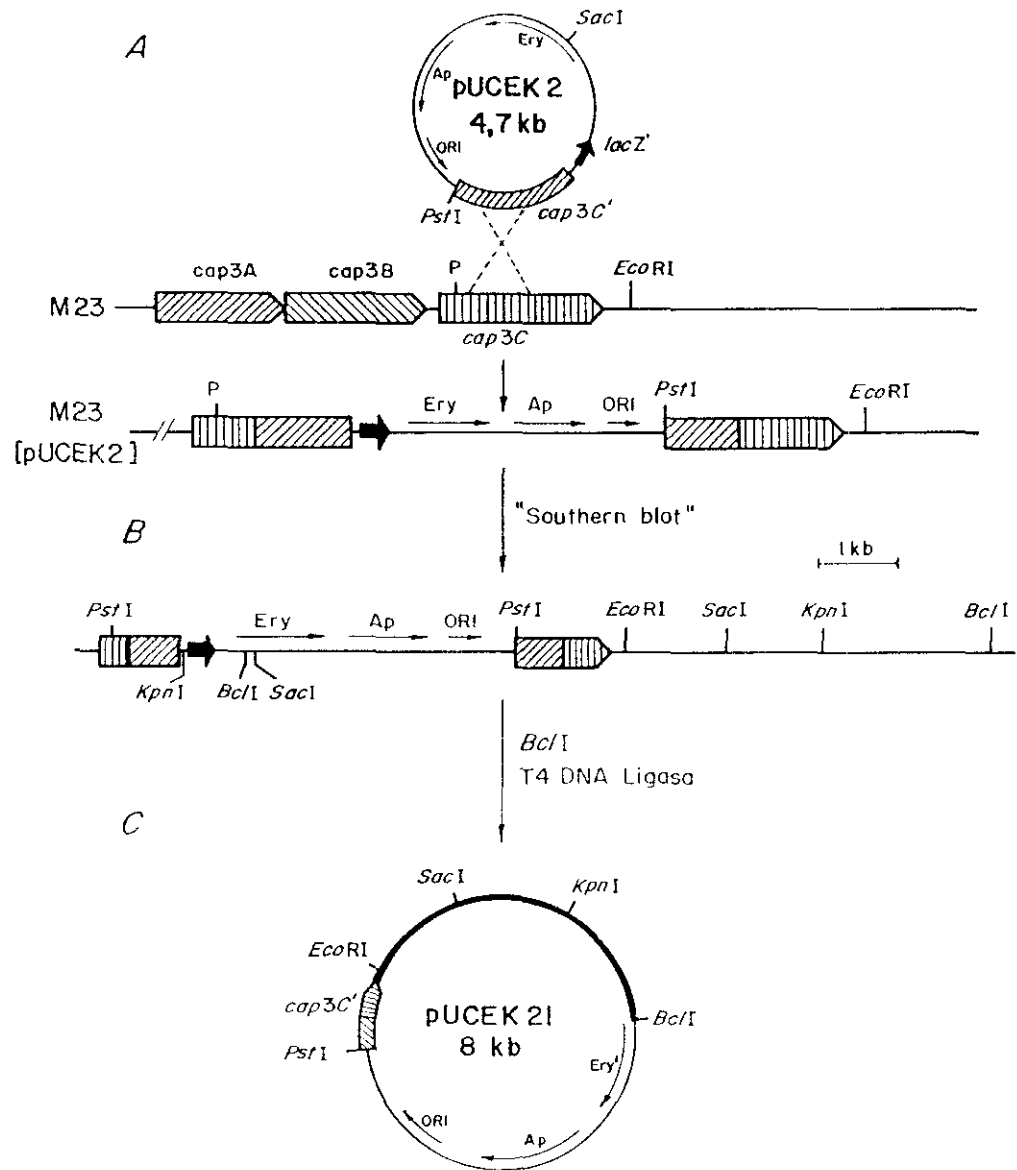


Figura 39. Esquema de inactivación del gen *cap3C* y construcción del plásmido pUCEK21. A: inserción de pUCEK2 en el cromosoma de la cepa M23. *cap3C'* indica que el gen *cap3C* está incompleto; ORI, representa el origen de replicación del plásmido pUCEK2; Ap, representa el gen que determina la resistencia a ampicilina; Ery, designa el gen que determina la resistencia a eritromicina. Las líneas discontinuas representan un evento de recombinación homóloga. B: mapa físico de la región de recombinación en la cepa transformante M23(pUCEK2). El sombreado de las dos copias incompletas del gen *cap3C'* indican la procedencia —del plásmido pUCEK2 o del cromosoma de M23— de los fragmentos que las componen. C: esquema del plásmido pUCEK21. Ery' indica que Ery está incompleto; la línea gruesa representa DNA de *S. pneumoniae*.

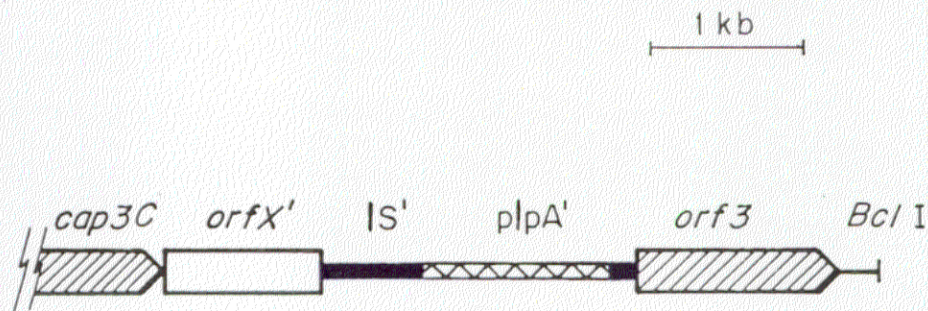


Figura 40. Esquema de la disposición de genes en la región situada en posición 3' con respecto al gen *cap3C*. *orfX'* indica que la ORF presente está incompleta; IS' indica la presencia de un fragmento de una secuencia de inserción; *plpA'* indica la presencia de un fragmento del gen *plpA*.

Orf4		MNKG	L	F	E	K	R	C	K	Y	S	I	R	K	F	S	L	G	V	A	S	V	M	I	G	A	A	F	F	31																		
X72967	MSYFRNRDIDIERN	S	M	N	R	S	V	Q	E	R	K	C	R	Y	S	I	R	K	L	S	V	G	A	V	S	M	I	V	G	A	V	F	46															
		↓																																														
Orf4		G	T	S	P	V	L	A	D	S	V	Q	S	-	-	-	-	G	S	T	A	N	L	P	A	D	L	A	T	A	L	A	T	A	K	E	N	D	G	R	D	F	E	A	P	K	V	73
X72967		G	T	S	P	V	L	A	Q	E	G	A	S	E	Q	P	L	A	N	E	T	Q	L	S	G	E	S	S	T	L	T	D	T	E	K	S	Q	P	S	S	E	T	E	L	S	G	N	92
Orf4		G	E	D	Q	G	S	P	E	V	T	D	G	P	K	T	E	E	L	L	A	L	E	K	E	K	P	A	E	E	K	P	K	E	D	K	P	A	A	A	K	P	E	T	P	K	119	
X72967		K	Q	E	Q	E	R	K	D	-	K	Q	E	E	K	I	P	R	D	Y	A	R	D	L	E	N	V	E	T	V	I	E	K	E	D	V	E	T	N	A	S	N	G	Q	R	V	137	
Orf4		T	V	T	P	E	W	Q	T	V	E	K	K	E	Q	Q	G	T	-	V	T	I	R	-	E	E	K	G	V	R	Y	N	Q	L	-	-	S	S	T	A	Q	N	D	N	A	G	160	
X72967		D	L	S	S	E	L	D	K	L	K	K	L	E	N	A	T	V	H	M	E	F	K	P	D	A	K	A	P	A	F	Y	N	L	F	S	V	S	S	A	T	R	K	D	E	Y	F	183
Orf4		K	P	A	L	F	E	R	K	G	L	T	V	D	A	N	G	N	A	T	V	D	L	-	-	T	F	K	D	D	S	E	K	G	K	S	R	F	G	V	F	L	K	F	R	D	T	204
X72967		T	M	A	V	Y	N	N	T	A	-	T	L	E	G	R	G	S	D	G	K	Q	F	Y	N	N	Y	N	D	A	P	L	K	V	K	P	G	Q	W	N	S	V	T	F	T	V	E	228

Figura 41. Comparación de la secuencia de aminoácidos de Orf4 con la de la proteína NanA de *S. pneumoniae*. X72967 representa la proteína NanA de neumococo. Las zonas en azul representan aminoácidos conservados en ambas proteínas; las zonas en verde designan los cambios conservativos existentes entre ellas. Se han subrayado los aminoácidos que constituyen el péptido señal de la proteína NanA; ↓ indica el posible lugar de corte de la peptidasa.

Por otra parte, cuando comparamos la secuencia de nucleótidos de la región comprendida entre *cap3C* y *orf3*, encontramos que la zona que se extiende entre los nt 10650 y 11271 es muy parecida (55% de nucleótidos idénticos) a un fragmento de la IS1167 de neumococo (Zhou y cols., 1995). Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con la IS1167, no contiene ningún marco abierto de lectura y, por tanto, no parece codificar ninguna proteína con actividad transposasa, como en el caso anterior. Por otro lado, al obtener la secuencia deducida de aminoácidos en el sentido de transcripción inverso al del operón *cap3* (nt 11271 a 10726), aunque no se encuentra un codón de iniciación, vimos que comparte un gran parecido con la estructura primaria del extremo C-terminal de la transposasa codificada por el gen presente en la IS1167 (Figura 42).

406	MSFIAQDFEKLDIITVLEGR TQAIIRNHFLRYDRVVRCRVKIITMD	46
M36180		
406	CLFPNAQIVLDRFHIIQHLSREMMTTRIVIMKFNDK	36
M36180	MFSPYYDLARQLFPCAKIVLDRFHIVQHLSRAMSRVVRVQIMNQLDR	92
406	QSLSYRAMKNHWRFQKDSRKLSDKAFYSRTFRQTLTPREIVNKTL	82
M36180	KSHHEYKAIKRYWKLIQQDSRKLSDKHFYRPTFRMHLTNKEILDKLL	138
406	AFSDELHYYDDLYQLLLFHLQEKNA DHFFDLLTEAFPQLNQAFRTA	128
M36180	SYSQDLKHHYQLYQLLLFHFQNKPEPEKFFGLIEDNLKQVHPLFQTV	184
406	LSTLVRYRKYVTNAIQMPYSNSRLEAINKLISFLQTQTCRYGYVFL	174
M36180	FKTFLKDKEKIVNALQLPYSNAKLEATNNLIKLIK-----RNAFGFR	226
406	QILEFSQR	182
M36180	NFENFKKRI FIALNIKKERTFVLSRA	252

Figura 42. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la de nucleótidos entre las posiciones 11271 y 10276 (Fig. 10) con la de la proteína codificada por IS1167 de *S. pneumoniae*. Las zonas en azul representan aminoácidos conservados en ambas secuencias, las zonas en verde designan los cambios conservativos entre éstas. 406 representa la secuencia deducida en la cepa 406; M36180 representa la transposasa codificada por IS1167 de neumococo.

Todo esto parece indicar que esta región corresponde a un fragmento de una secuencia de inserción que habría existido en esta zona. Del mismo modo, la zona que se extiende entre los nt 11274 y 12457 es prácticamente idéntica (98% de nucleótidos idénticos) a un fragmento de la secuencia de nucleótidos del gen *plpA* de neumococo (nt 837 a 2019) (Pearce y cols., 1994). Sin embargo, en este fragmento tampoco existe un marco abierto de lectura; cuando realizamos un análisis más detallado de esta zona observamos pequeñas diferencias en la secuencia que causaban la pérdida de la fase de lectura, según se muestra en la Figura 43. Así, en la posición 11337 (Fig. 10) se ha producido una inserción de una T y en la posición 11780 se ha insertado una G, lo que provoca que unos nucleótidos más adelante (posición 2286) aparezca un codón de terminación. Por otro lado, el extremo 5' del gen no ha permanecido en el cromosoma bacteriano, debido probablemente a la presencia de la secuencia de inserción descrita anteriormente.

Por último, encontramos un marco abierto de lectura (*orfX*) que comienza en el nt 9579 y se ve interrumpido por la presencia de la secuencia de inserción incompleta en el nt 10650, con lo cual el polipéptido codificado por esta ORF, que originalmente sería el cuarto gen del operón *cap3*, no corresponde con la proteína original en su extremo C-terminal. Otro autores han sugerido que esta proteína correspondería a una fosfoglucomutasa, encargada de catalizar el paso reversible de Glc-6-P a Glc-1-P (Dillard y cols., 1995), aunque la comparación de su secuencia de aminoácidos con las de las bases de datos no revela información relevante acerca de su posible función (datos no mostrados).

	L V Q I L T V S P I N I T S K T S E E Q K T S	
406	T TTAATCAAGCAAGACTCTATTACCTATCTAGTTGGTACAAATATTGACCGTCAGTCCCTATAAATAAACAATCTAAGACCAAGTGAAGAACAATAAATATCT	100
PlpA	Y TQ Q D S I T Y L V G T N I D R Q S Y K Y T S K T S D E Q K A S	934
406	T KKALLLNKDFRQAIAFGFDRTAYASQLNGQTGA	200
PlpA	T KKALLLNKDFRQAIAFGFDRTAYASQLNGQTGA	1034
406	S KILRLNLFVPPPTFEVQAADGKNEFGDMVKKEKLVITYGD	300
PlpA	S KILRLNLFVPPPTFEVQAADGKNEFGDMVKKEKLVITYGD	1134
406	E WKLDVNLADSQDGLYNPEKATAEFAKAKLALQA	400
PlpA	E WKLDVNLADSQDGLYNPEKAKAEFAKAKLSALQA	1234
406	E GVQFPPIHLDMFVDQQTATTTKVQRVQSMKQSLLEV	500
PlpA	E GVTFPPIHLDMFVDQQTATTTKVQRVQSMKQSLLEV	1334
	E A D N V I I D I Q Q L Q K D E V N N I T Y F A E N A A G E D	
406	T LGADNVIIIDIQQQLQKDEVNNITYFAENAAGED	600
PlpA	T LGADNVIIIDIQQQLQKDEVNNITYFAENAAGED	1433
406	W DLSDNVGVGWGPDFADPSTYLDIIKPSVGEESTKTY	700
PlpA	W DLSDNVGVGWGPDFADPSTYLDIIKPSVGEESTKTY	1533
406	L GFDSDGEDNVAAAKKVGLYDYEKLVTEAGDEATD	800
PlpA	L GFDSDGEDNVAAAKKVGLYDYEKLVTEAGDEATD	1633
406	V AKRYDKYAAAQAQAWLTDSALIIPTTTSRTGRPIL	900
PlpA	V AKRYDKYAAAQAQAWLTDSALIIPTTTSRTGRPIL	1733
406	S KMVPPTTIPFALSNGKGTSEPILYKYLRLEQLDKAV	1000
PlpA	S KMVPPTTIPFALSNGKGTSEPILYKYLRLEQLDKAV	1833
	T V D E Y Q K A Q E K W M K E K E E S N K K A Q E D L A K H V K *	
406	T VDEYQKAQEKMKEKEEESNKKAQEDLAKHVK*	1100
PlpA	T VDEYQKAQEKMKEKEEESNKKAQEDLAKHVK*	1933
406	T TTTCAAAATATAAGAAAGGATTTATTTTCCCTTCAATGGTGAATCCTTTTACATTTTAAAGAAAGATCTCAAAATGAT	1186
PlpA	T TTTCAAAATATAAGAAAGGATTTATTTTCCCTTCAATGGTGAATCCTTTTACATTTTAAAGAAAGATCTCAAAATGAT	2019

Figura 43. Comparación de la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 11274 y 12457 (ver Fig. 10) con parte de la del gen *plpA* de *S. pneumoniae*. Sobre la secuencia de nucleótidos de la estirpe 406 se muestra, en negrita, la deducida de aminoácidos; debajo de la secuencia de nucleótidos del gen *plpA* se muestra la secuencia de la proteína PlpA. Los codones de terminación se indican mediante un asterisco; las inserciones de una base en la secuencia de la cepa 406 se indican en negrita; | representa nucleótidos idénticos en ambas secuencias.

9. ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN EN LA BIOSÍNTESIS CAPSULAR DE LA REGIÓN DE DNA SITUADA EN POSICIÓN 3' RESPECTO DEL GEN *lytA*

Recientemente se ha afirmado, basándose en datos obtenidos mediante interrupción de genes por inserción del transposón Tn916, que la región situada en posición 3' respecto del gen *lytA* contiene genes implicados en la síntesis del polisacárido capsular de serotipo 3 (Watson y cols., 1995). Con el fin de estudiar este hecho, procedimos a transformar la estirpe M31 —mutante rugoso de serotipo 2 que ha sufrido una delección de, al menos, 5,5 kb que afecta al gen *lytA* y a la región situada en posición 3' respecto a éste, es decir, la que según estos autores está implicada en la biosíntesis capsular— y la cepa parental, M11, con DNA cromosómico de la cepa 406 y seleccionamos transformantes con fenotipo capsulado, el cual fue confirmado mediante la técnica de 'Quellung'. A continuación, comprobamos que los transformantes M31 S3⁺ mostraban un fenotipo LytA⁺; y mediante hibridación de los DNAs cromosómicos, tanto en dot-blot como en PFGE, con pGL40 y PGL65, sondas que contenían el gen *lytA* y/o diferentes zonas de la región analizada (Fig. 44), así como con pKER7 y pKER23, observamos, según se muestra en las Figuras 45a y 45b, que mostraban una delección idéntica a la de la cepa parental, además vimos que sólo los transformantes M31 S3⁺ y M11 S3⁺ contienen los genes capsulares de serotipo 3 (situados como era de esperar en el fragmento *Sma*I de 290 kb), mientras que todas las cepas contienen la región que precede a los genes capsulares. Además, comprobamos que el gen *lytA* y la zona analizada se sitúan en un fragmento *Sma*I de 90 kb, tal y como ya se había descrito (Gasc y cols., 1991).

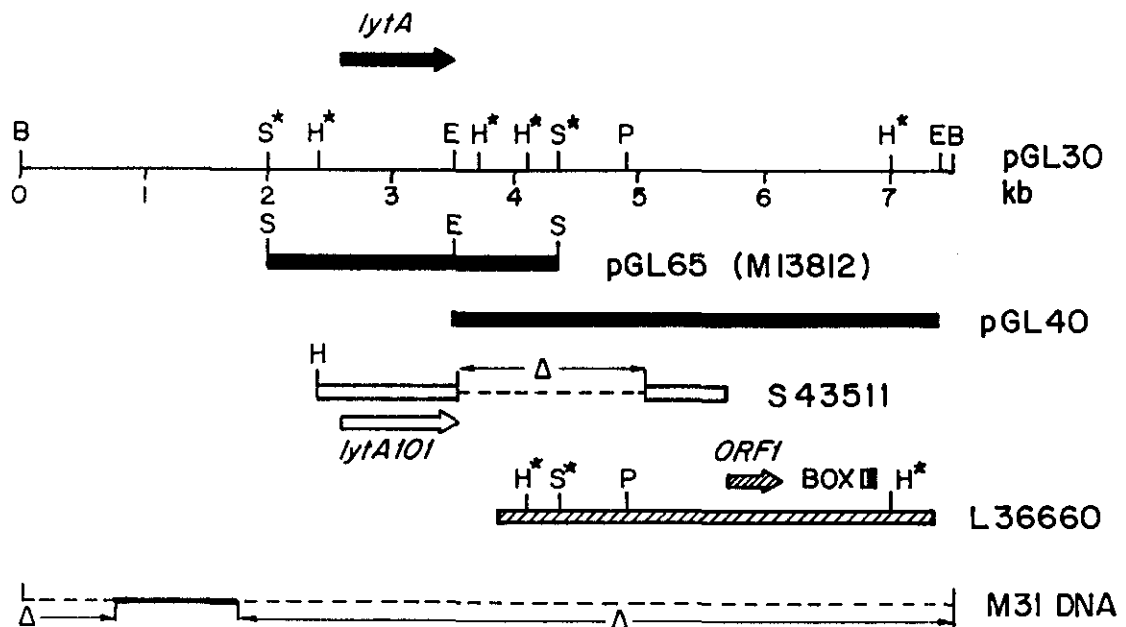


Figura 44. Mapa físico del fragmento *BclI* de 7,5 kb que contiene el gen *lytA* de *S. pneumoniae*. La región mostrada corresponde al inserto de DNA de neumococo del plásmido pGL30 (Sánchez-Puelles y cols., 1986); M13812, S43511, y L36660 corresponden a los números de acceso de las regiones indicadas. Los genes *lytA* y *lytA101* se indican mediante una flecha negra y otra blanca, respectivamente. También se muestra la localización de la ORF1 y de las secuencias BOX (Martin y cols., 1992). Δ representa las regiones deletionadas. Los asteriscos indican que existen dianas adicionales para las correspondientes enzimas. B, *BclI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; P, *PvuII*; S, *Sau3AI*.

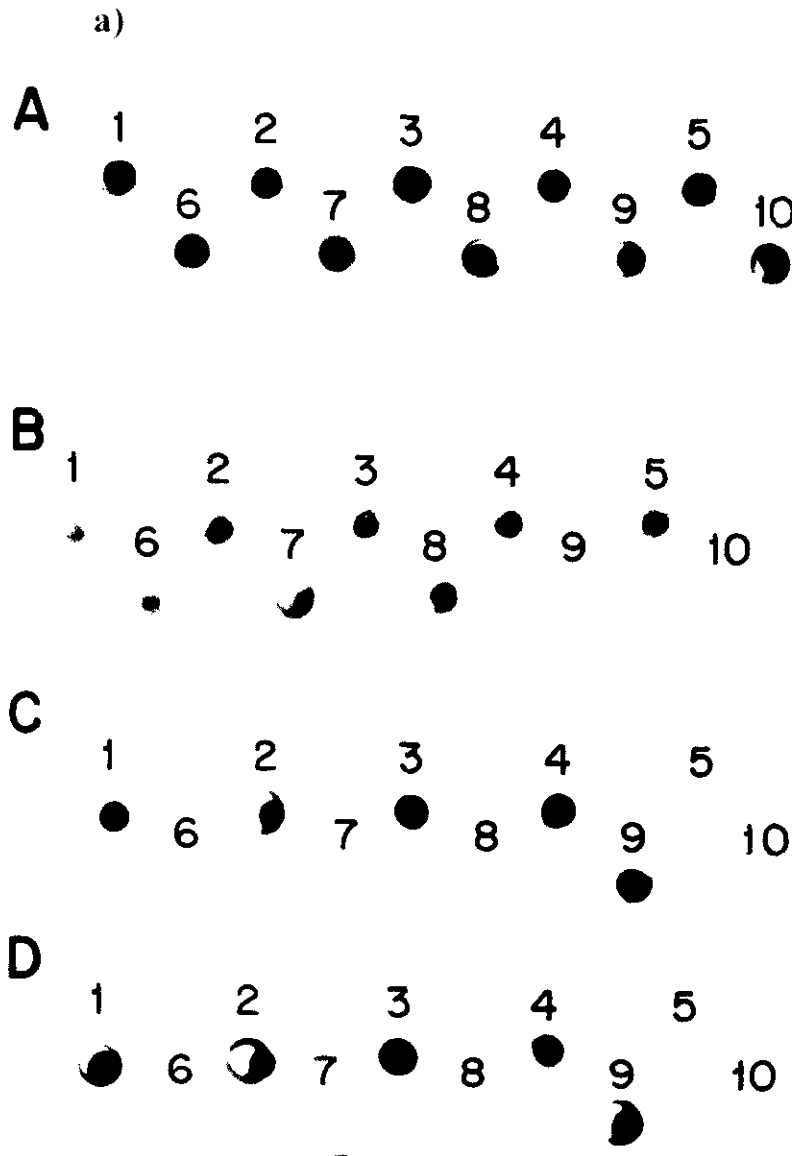
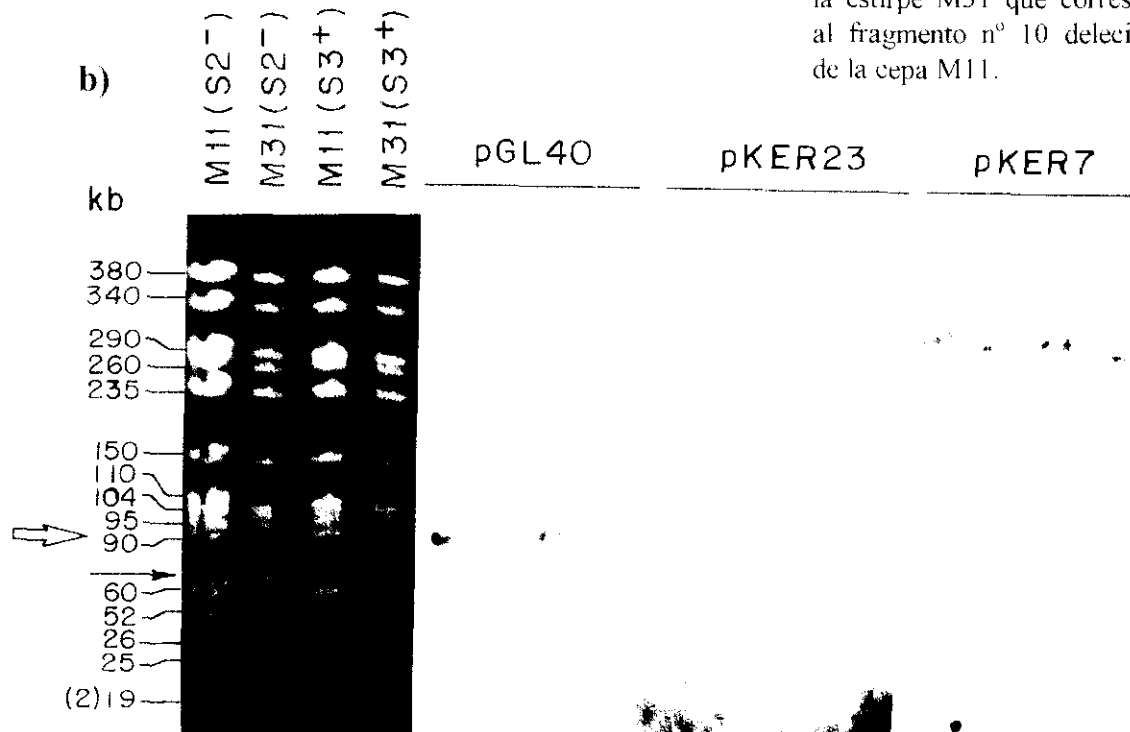


Figura 45. Determinación de la implicación de las regiones adyacentes al gen *lytA* en la síntesis de polisacárido capsular de *S. pneumoniae*. Panel a), análisis mediante dot blot de DNAs de varias estirpes de neumococo. Las sondas utilizadas fueron pKER7 (A), pKER23 (B), pGL65 (C), y pGL40 (D). Los DNAs corresponden a las estirpes: 1, M24; 2-4, transformantes capsulados de serotipo 3 de M11; 5-8, transformantes capsulados de serotipo 3 de M31; 9, M11; 10, M31. Panel b), análisis mediante PFGE de los DNAs de las estirpes estudiadas en el panel a) digeridos con *Sma*I. En la parte superior se indica la procedencia de los DNAs estudiados y los plásmidos utilizados como sondas. A la izquierda se indican los tamaños de los fragmentos obtenidos. La flecha blanca indica el fragmento n° 10 del genoma de la cepa M11 de neumococo en el que se localiza el gen *lytA*. La flecha negra señala el fragmento presente en la estirpe M31 que corresponde al fragmento n° 10 deleciónado de la cepa M11.



V.- DISCUSIÓN

“... Pero ¿cómo?, ¿gustar por qué? preguntó, terco, el tendero, que debía ser sin duda una de esas personas tan corrientes aficionadas a razonar y a discutir, y que son incapaces de elevarse a la lógica del absurdo.”

(Charles Baudelaire, “ Los dones de las hadas”)

El estudio de los genes capsulares se ha llevado a cabo principalmente en microorganismos Gram-negativos, habiéndose encontrado una disposición génica que parece estar bastante conservada en la mayoría de ellos. Los genes capsulares se agrupan en tres regiones adyacentes bien diferenciadas (Figs. 4 y 46): en primer lugar, la región 1, común a todos los serotipos de una misma especie, cuyos genes están encargados de dirigir la translocación del polisacárido desde el periplasma a la superficie celular; a continuación, la región 2, específica de cada serotipo, encargada de la síntesis de los precursores y de su posterior polimerización; y, por último, la región 3, conservada entre los distintos serotipos y encargada del transporte del polisacárido a través de la membrana citoplasmática. En lo que respecta a los microorganismos Gram-positivos, es concebible que, dadas las diferencias que existen entre éstos y los Gram-negativos —particularmente en lo que atañe a la complejidad de las estructuras periféricas— la disposición de los genes capsulares varíe de forma significativa; por ejemplo, debido a la ausencia de membrana externa, parece lógico suponer que no dispondrán de genes equivalentes a los de la región 1 de las bacterias Gram-negativas. Así, a pesar de la relativamente escasa información que se posee sobre los genes capsulares de bacterias Gram-positivas, se está poniendo en evidencia que, en efecto, la disposición de sus genes capsulares difiere de la encontrada en bacterias Gram-negativas (Figura 46), y parece no seguir un esquema único. De este modo, en el serotipo III de *S. agalactiae* se han identificado seis genes, aunque su organización en unidades transcripcionales no ha sido determinada. Por otro lado, en *S. aureus* de serotipo 1 se han identificado trece genes que parecen disponerse en varios operones, aunque la distribución de éstos entre los distintos serotipos no ha sido dilucidada aún. Por último, en *S. pyogenes*, en el que hasta el momento sólo se ha descrito la existencia de un serotipo, se ha identificado un operón, denominado *has* (por ‘hyaluronic acid synthesis’) que, al igual que lo que ocurre en el serotipo 3 de neumococo, consta de tres genes que codifican una glicosil-transferasa o polisacárido-sintasa (*hasA*), una UDP-GlcDH (*hasB*) y una UDP-Glc pirofosforilasa (*hasC*).

En esta tesis hemos clonado y secuenciado 14056 bp de DNA de *S. pneumoniae* y hemos observado que el operón *cap3* —específico del serotipo 3— se encuentra flanqueado por regiones comunes a DNAs de otros serotipos capsulares; sin embargo, también hemos demostrado que éstas no intervienen en la biosíntesis capsular. Por otro lado, otros autores han sugerido que los genes que intervienen en la síntesis capsular en estirpes de serotipo

19F se agrupan en un operón que consta tanto de genes comunes como de específicos, siendo los primeros aparentemente homólogos a los situados en la región 5' respecto del operón *cap3*. Tal y como se ha comentado en el apartado 7.2 de Introducción, los estudios clásicos acerca de la genética capsular de neumococo propusieron un modelo de organización de los genes específicos en forma de casete que, en el caso del serotipo 3, estaría constituida por el operón *cap3*, siendo esta zona la que se intercambiaría durante los fenómenos de transformación genética intertipo, mediante un proceso de recombinación mediado por la homología existente entre los diferentes serotipos capsulares a ambos lados del operón *cap3*.

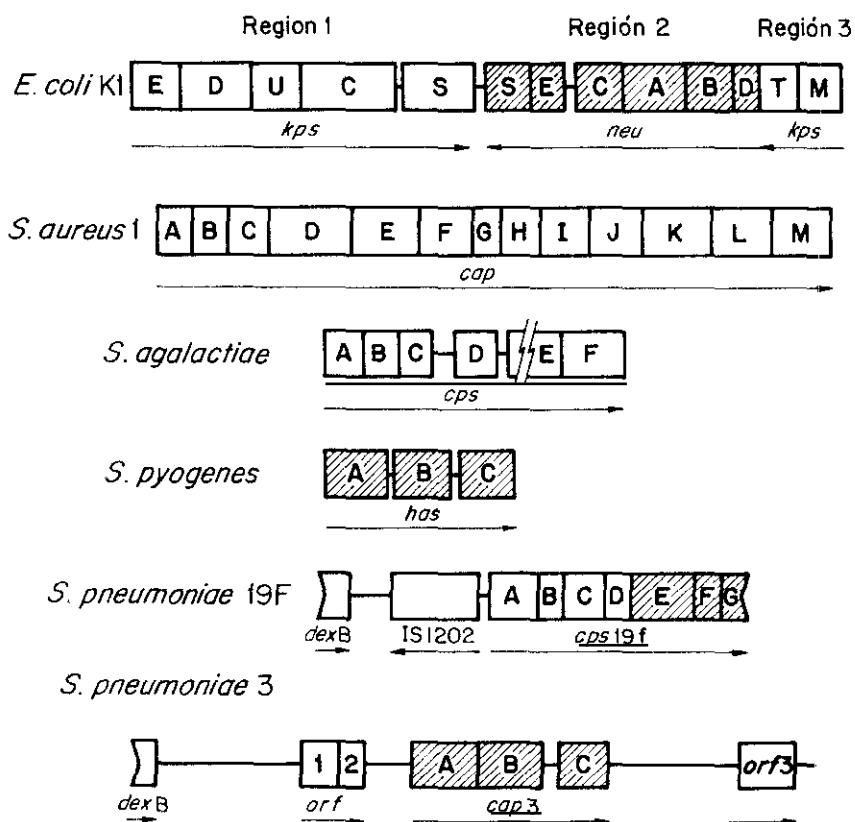


Figura 46. Análisis comparativo de la organización de los genes capsulares y adyacentes a éstos de algunas especies bacterianas. A la izquierda se indican los microorganismos a los que pertenecen los grupos de genes capsulares. Los bolques sombreados corresponden a genes identificados como serotipo-específicos. En *E. coli* y *S. pneumoniae* serotipo 3, los bolques blancos indican genes comunes a todos los serotipos. En los demás microorganismos los bolques blancos indican genes cuya distribución entre los distintos serotipos no ha sido analizada. Las flechas indican el sentido de transcripción de los genes.

1. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS GENES CAPSULARES

Por razones ya comentadas en el apartado de Resultados, fue necesario construir dos plásmidos, pKER1 y pKER2, para analizar un fragmento *EcoRI* de 10 kb del DNA de *S. pneumoniae* 406. Estos plásmidos contienen todo este fragmento en dos porciones solapantes. Por otro lado, construimos el plásmido pUCEK21 que posee un fragmento de DNA que solapa con el fragmento *EcoRI* por el extremo que contiene genes específicos del serotipo 3 (Figs. 10 y 39B). El análisis de la secuencia de los fragmentos de DNA de neumococo contenidos en estos tres plásmidos reveló una disposición génica que mostraba claras diferencias de organización con respecto a otros grupos de genes capsulares estudiados hasta el momento.

Como se ha indicado anteriormente, los genes que dirigen la biosíntesis capsular en los microorganismos se clasifican según la función que desempeñan las proteínas por ellos codificadas en dos tipos: comunes y específicos. Así, identificamos en neumococo ambos tipos de genes dentro de los presentes en la región estudiada aunque, como observamos en el apartado 4.1. de Resultados, los genes comunes, es decir, aquellos que aparecen en estirpes de diferentes serotipos, no parecen estar implicados en la biosíntesis capsular de tipo 3. En el caso de la estirpe 406 cabe diferenciar tres tipos de regiones cuando se analiza la zona del genoma que codifica para la cápsula de serotipo 3 y las zonas adyacentes con respecto a cepas pertenecientes a otros serotipos:

a) por un lado, encontramos que la región que incluye el espacio intergénico *dexB-orf1* se encuentra en todos los serotipos analizados hasta el momento y además hemos observado que esta zona es bastante variable, en cuanto a su tamaño, entre los distintos serotipos (Fig. 18). En general esta región posee un tamaño aproximado de 1,7 kb lo cual concuerda con el que tendría esta zona en el caso de que la secuencia identificada en la estirpe 406, homóloga al gen *cps19fA* estuviera completa (ver apartado 1.9. de Resultados). En algunos serotipos, sin embargo, el tamaño obtenido es mayor (serotipos 1 y 33) lo que podría indicar la presencia de alguna secuencia de inserción, como sucede con la estirpe de serotipo 19F estudiada por Guidolin y cols. (1994). Del mismo modo, las regiones situadas en posición 3' respecto del operón capsular, es decir, el fragmento de la secuencia de inserción y el del gen *plpA*, así como el gen *orf3*, se encuentran en todos los serotipos analizados (Fig. 18).

b) los genes *orf1* y *2* se encuentran sólo en algunos serotipos estudiados (Fig. 18).

c) los genes *cap3B*, *cap3C* y el fragmento de gen situado a continuación de este último sólo se encuentran en el serotipo 3 (Fig. 18). Dado que la proteína Cap3C cumple una función que debe ser común a todos los serotipos, como es la síntesis de UDP-Glc, resulta sorprendente que la hibridación con el gen *cap3C* no produzca ninguna banda de hibridación con DNAs de otros serotipos. Asimismo, confirmando resultados descritos previamente (García y cols., 1993), observamos que el gen *cap3A* hibrida con el DNA de estirpes de los serotipos 3 y 5. Sin embargo, la hibridación de este gen con DNAs de estirpes de otros serotipos que contienen, al igual que el serotipo 5, GlcA o GalA en su polisacárido (como ocurre con los serotipos 2 y 1, respectivamente) no mostró la aparición de ninguna banda de hibridación, indicando que los genes que codifican las UDP-GlcDH de estas estirpes son significativamente diferentes de *cap3A*. Experimentos clásicos de transformación genética ya habían permitido sugerir que los genes de las UDP-GlcDH de los serotipos 1 y 3 no son homólogos (Bernheimer y Wermundsen, 1969).

Hemos analizado la organización de estas regiones encontrando que los genes específicos del serotipo 3 se agrupan en un operón (Fig. 22) mientras que los que dirigen la biosíntesis del polisacárido capsular de serotipo 19F de neumococo, parecen disponerse formando un único operón junto con los genes (o regiones) identificados como comunes a todos los serotipos (Guidolin y cols., 1994) (Figura 46). Estos autores sugirieron, además, que los genes comunes, *cps19fA-D*, son necesarios para la síntesis capsular, mientras que, en el serotipo 3 hemos demostrado que las ORFs localizadas en esa región homóloga no son imprescindibles para la formación de polisacárido capsular, puesto que en la estirpe 406, dichos genes o bien se encuentran mutados, como es el caso de los genes homólogos a *cps19fA* y *B*, o no se transcriben, como sucede con los genes *orf1* y *2* (Fig. 22). Dado que las conclusiones a las que llegaron Guidolin y cols. se basan en datos obtenidos mediante inactivación por inserción-duplicación de cada uno de los genes *cps19f* y teniendo en cuenta la disposición de estos genes, no puede descartarse un efecto de inactivación polar, tal y como admitieron los propios investigadores.

Una clara diferencia en la estructura génica de los serotipos capsulares 3 y 19F es la presencia, en el caso de uno de los aislados de este último, de una secuencia de inserción,

(IS1202) que no se encuentra en la estirpe 406, aunque sí hemos observado la presencia de una posible secuencia de reconocimiento para la IS1202 entre los nt 1658 y 1689. Estos datos podrían sugerir que los genes capsulares estarían localizados en las proximidades de regiones susceptibles de facilitar la incorporación de secuencias de inserción y otros elementos móviles, como transposones, lo que podría permitir la escisión de los genes capsulares del cromosoma bacteriano y su transferencia, de forma natural, tanto a otras regiones del propio cromosoma como a otras estirpes. La presencia de elementos móviles flanqueando grupos de genes capsulares ya se ha descrito en otros microorganismos, como *H. influenzae* (Kroll y cols., 1991), *N. meningitidis* (Hammerschmidt y cols., 1996), en los que, además, se ha observado que desempeñan un importante papel en la regulación de la síntesis capsular mediante duplicaciones de la región serotipo-específica, y en *S. aureus* (Lee, 1995). Más recientemente, se ha observado la presencia de dos secuencias de inserción flanqueando el grupo de genes que dirigen la biosíntesis capsular del serotipo 1 de neumococo (R. Muñoz, comunicación personal). Esta aparente capacidad para movilizar la casete que contiene los genes capsulares específicos puede haber sido la causa de las alteraciones que parecen haber sufrido las regiones que flanquean dicha casete en la estirpe 406 y que habría ocasionado la delección del extremo 5' del gen homólogo a *cps19fA* así como las demás mutaciones que han sufrido tanto este gen como el que posiblemente existía a continuación, homólogo al gen *cps19fB*.

Los genes capsulares específicos del serotipo 3 se hallan separados de los comunes por un espacio de 1096 bp, que no existe en el caso del serotipo 19F. En esta región encontramos una secuencia que posiblemente actúe como un terminador de la transcripción Rho-independiente, así como una secuencia promotora consenso precediendo al gen *cap3A*. Recientemente, Dillard y cols. (1995) han aislado y secuenciado la región que contiene los genes específicos que dirigen la síntesis capsular en la estirpe WU2 de serotipo 3, lo que les permitió poner de manifiesto la existencia de tres genes, *cps3D*, *cps3S* y *cps3U*, que poseen un alto grado de identidad con respecto a los genes *cap3A*, *cap3B* y *cap3C* de la cepa 406, respectivamente (99%, 97,6% y 99,7%), lo que indica que ambos grupos de genes son homólogos. Por último, en la región situada en posición 3' respecto a los genes capsulares específicos hemos encontrado otro gen que podría también formar parte del operón capsular y que está interrumpido en su extremo 3' por la presencia de un fragmento de una secuencia de inserción que posee un 55% de nucleótidos idénticos con IS1167 (Zhou y cols., 1995).

Otros autores han sugerido, basándose únicamente en datos obtenidos mediante análisis comparativo de secuencias de aminoácidos, que este cuarto gen, que han denominado *cps3M*, codificaría una proteína con actividad fosfoglucomutasa, es decir, la enzima que cataliza la conversión de Glc-6-P en Glc-1-P (Dillard y cols., 1995) y que, por tanto, estaría implicada en la biosíntesis capsular, ya que sintetizaría el sustrato de la reacción catalizada por la UDP-Glc pirofosforilasa. No obstante, en nuestro trabajo hemos observado que, además de que el gen está interrumpido, la inactivación de *cap3C*, que a causa de un efecto polar también podría provocar la inactivación de los genes situados a continuación, produce estirpes capsuladas, indicando que estos genes no son imprescindibles para la biosíntesis capsular. Mediante un análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos (357 residuos) deducida a partir de la secuencia del gen desde el codón de iniciación hasta el lugar de interrupción con las presentes en las bases de datos, observamos un cierto parecido —concretamente posee un 30% de residuos idénticos en una región de 85 aminoácidos— con la ORF456 de *Coxiella burnetii* (número de acceso para las bases de datos Genbank y EMBL, X79075) que aparentemente codificaría una fosfomanomutasa, aunque esta suposición se basa únicamente a su vez en el parecido de la proteína que codificaría la ORF456 con una proteína de *P. aeruginosa* con actividad fosfomanomutasa. A continuación se localiza una región que, por análisis comparativo de secuencias, probablemente se trate de parte del gen *plpA* (Fig. 40) (Pearce y cols., 1994) y que, además, se encuentra interrumpido por la inserción de un par de bases. Estos datos sugieren que, al igual que ocurre en la zona de los genes comunes situada en posición 5' con respecto a los genes específicos, existe una serie de fragmentos de DNA que parecen representar restos génicos que serían consecuencia de algunos eventos de inserción o escisión de genes mediados por una secuencia de inserción, parte de la cual se perdió también durante un proceso posterior de reorganización génica. En esta sentido cabe destacar que, recientemente, se ha puesto de relieve el importante papel que podrían desempeñar las secuencias de inserción, asociadas a bacteriófagos, en la evolución y transferencia de determinantes de la virulencia bacteriana (Cheetham y Katz, 1995). Además, también recientemente, Xiang y cols. (1994) han encontrado evidencias de fenómenos de recombinación genética mediada por secuencias de inserción en los genes *rfb* de síntesis del lipopolisacárido de *S. enterica*. En este caso, como al parecer podría haber sucedido en *S.*

pneumoniae, la IS se habría inactivado con posterioridad a la recombinación, mediante la acumulación de mutaciones sin sentido.

A continuación del fragmento del gen *plpA* encontramos un posible gen, *orf3*, que codificaría una proteína exportable de aproximadamente 41 kDa (Fig. 40). No obstante, el papel que desempeñaría Orf3 es aún desconocido, ya que la comparación de secuencias de aminoácidos no revela ningún dato indicativo de su posible función.

Tal y como se ha comentado anteriormente, el análisis de la secuencia de nucleótidos sugiere que los genes capsulares específicos se agrupan en una unidad de transcripción que estaría dirigida por un promotor situado en posición 5' con respecto al gen *cap3A*. Esta hipótesis fue confirmada mediante la identificación del sitio de iniciación de la transcripción por 'Primer extension' (Fig. 23). La presencia de un posible promotor en esta región también ha sido postulada recientemente en la cepa WU2 de neumococo (Dillard y cols., 1995), aunque no se demostró su funcionalidad. Estos autores han propuesto, además, la existencia de un terminador débil Rho-independiente entre los genes *cps3S* (*cap3B*) y *cps3U* (*cap3C*), así como la presencia de un promotor situado en posición 5' respecto de este último gen, sugiriendo que estas dos secuencias formarían un sistema de atenuación de la expresión de *cps3U*. Sin embargo, en nuestro trabajo hemos observado que en la cepa 406, a pesar de poseer dichas secuencias, no se produce dicha atenuación, ya que los experimentos de 'Northern blot' mostraron la existencia de una única banda de hibridación correspondiente a un mRNA de aproximadamente 5,8 kb (Fig. 22). Sin embargo, no hemos podido poner en evidencia la existencia de alguna secuencia que pudiera actuar como terminador de la transcripción Rho-independiente en la región situada a 6 kb y en posición 3' del punto de iniciación de la transcripción, aunque no se puede descartar que la RNA polimerasa se libere como consecuencia de la existencia de un terminador Rho-dependiente. Por otro lado, no parece que los genes comunes se expresen en la estirpe 406, ya que no se ha detectado ninguna banda de hibridación cuando se emplean los genes *orf1* y/o *orf2* en experimentos de 'Northern blot'; aunque no se puede excluir la posibilidad de que el mRNA que pudiera sintetizarse tenga una vida media muy corta.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo demuestran que los genes capsulares específicos del serotipo 3 se agrupan en una única unidad transcripcional, lo que establece una clara diferencia respecto a la organización génica sugerida en otros serotipos capsulares, como el serotipo 19F (Guidolin y cols., 1994), o en otros microorganismos,

como estreptococos del grupo B (Rubens y cols., 1993), en los que ambos tipos de genes, comunes y específicos, se disponen aparentemente en una única unidad de transcripción.

Por otro lado, y con el fin de examinar el grado de participación de los diferentes genes estudiados en la biosíntesis capsular de neumococo se utilizó la técnica de inserción-duplicación (Morrison y cols., 1984) para interrumpir la secuencia de lectura. Como ya se ha comentado, tanto *dexB* como *cap3C* resultaron ser prescindibles para la biosíntesis del polisacárido capsular (apartado 5 de Resultados). Se ha demostrado (apartado 7.3.2. de Resultados) que Cap3C es la enzima encargada de la síntesis de UDP-Glc, es decir, de uno de los precursores de la biosíntesis y, por tanto, es muy probable que esta enzima esté realmente implicada en la biosíntesis capsular pero su actividad pueda ser complementada por otra u otras enzimas del metabolismo celular. Observaciones análogas se han descrito en el caso de *P. aeruginosa*, en donde se ha observado que la enzima dTDP-Glc pirofosforilasa muestra cierta actividad UDP-Glc pirofosforilasa (Melo y Glaser, 1965). Esta podría ser la razón por la que hasta ahora no se hayan podido aislar mutantes en el gen *cap3C*, ya que éstos serían fenotípicamente indistinguibles de la estirpe salvaje. También es posible que, en alguna región diferente del cromosoma de neumococo, exista otro gen que codifique también una UDP-Glc pirofosforilasa. Este hipotético gen no debería ser homólogo con *cap3C* y muy posiblemente debería estar también presente en estirpes de *S. pneumoniae* de otros serotipos. Se puede especular que una posible función de tal gen sería asegurar la síntesis de UDP-Glc necesaria, por ejemplo, para la síntesis de los polisacáridos de la pared celular.

Por otro lado, no se pudo llevar a cabo la inactivación completa de *cap3B* en estirpes con un gen *cap3A* funcional. No obstante, el uso de un mutante *cap3A* (M24), sí permitió la inactivación de *cap3B*. Esta observación podría indicar que la acumulación de UDP-GlcA, producto de la actividad de Cap3A, resulta tóxico para la bacteria. Hay que resaltar el hecho de que de un total de 21 mutantes no capsulados de neumococo tipo 3, sólo uno de ellos estaba mutado en el gen de la polisacárido-sintasa pero un detallado análisis genético demostró que, en realidad, se trataba de un mutante con una delección que afectaba tanto al gen de la UDP-GlcDH como a la sintasa (Bernheimer y cols., 1968). Sin embargo, Dillard y cols. (1995) han sido capaces de aislar, mediante inserción-duplicación, un mutante afectado exclusivamente en el gen *cps3S* (*cap3B*). En nuestro laboratorio hemos realizado repetidos intentos para construir un mutante análogo, pero sin éxito hasta el momento.

Una vez estudiada la distribución de los genes entre los diferentes serotipos, así como su participación en la biosíntesis del polisacárido capsular de serotipo 3 de neumococo, estudiamos la localización de estos genes en el cromosoma de *S. pneumoniae*, a partir del mapa físico realizado por Gasc y cols. (1991) (Fig. 47). Mediante PFGE de DNAs de estirpes pertenecientes a distintos serotipos y de su posterior hibridación con sondas que abarcan diferentes regiones de los genes comunes o específicos, encontramos que los genes capsulares se encuentran situados en el fragmento de 290 kb *Sma*I (nº 3) (Figs. 19 y 20), en el que también residen los genes *pbp1a* y *pbp2x*. Por otra parte, observamos que existen genes, o fragmentos de genes, que se encuentran repetidos en otras regiones del cromosoma de neumococo; concretamente, una de estas repeticiones se encuentra localizada en el fragmento *Sma*I de 52 kb en el que también se sitúa el gen *recP* (Rhee y Morrison, 1988). Datos obtenidos a partir de experimentos de transformación genética habían sugerido la existencia de tales zonas repetidas como medio para explicar el comportamiento de estirpes de neumococo de fenotipo 'binario' (Austrian y cols., 1959; Bernheimer y cols., 1967; Bernheimer y Wermundsen, 1969; 1972) (ver apartado 7.2 de Introducción). La duplicación de genes capsulares ha sido observada en otros microorganismos, como *E. coli* (Drake y cols., 1993), *N. meningitidis* (Hammerschmidt y cols., 1994) o, muy recientemente, en *S. aureus* (Sau y Lee, 1996).

Con el fin de determinar con más precisión la localización de los genes capsulares en el genoma de neumococo utilizamos, además de *Sma*I, las enzimas de restricción *Sac*II y *Apa*I y observamos que los fragmentos producidos por *Sac*II, al ser hibridados con el plásmido pKER2, que contiene los genes específicos de serotipo 3, daban lugar a una banda de hibridación que corresponde al fragmento de 60 kb (nº 12), mientras que hibridando con los genes comunes, situados a ambos lados del sitio de corte *Sac*II (Fig. 10) obtuvimos una banda adicional que corresponde a un fragmento de 118 kb (nº 6) (Fig. 20). Estos resultados permiten situar los genes capsulares en uno de los extremos del fragmento *Sac*II nº 12, concretamente en el extremo adyacente al fragmento nº 6 (Fig. 47).

Mientras nos encontrábamos en el periodo de redacción de esta tesis, Watson y cols. (1995) afirmaron, basándose en experimentos de mutagénesis por inserción de Tn916 sobre una estirpe de neumococo de serotipo 3, que la región situada en posición 3' con respecto al gen *lytA*, —ubicada, por tanto, en el fragmento *Sma*I nº 10 del genoma de neumococo (Fig. 47)— interviene de algún modo aún por determinar en la biosíntesis del polisacárido

capsular de serotipo 3 de neumococo. Esta localización de los genes capsulares totalmente diferente a la encontrada por nosotros, podía poner en tela de juicio el modelo de casete ampliamente documentado. Para aceptar o rechazar estos resultados estudiamos la posible implicación de esta región genómica en la producción y/o regulación del polisacárido capsular de serotipo 3 de neumococo. Para ello, transformamos la cepa M31 —que contiene una delección de, al menos, 5,5 kb que incluye el gen *lytA* y la región supuestamente implicada en la biosíntesis capsular (Sánchez-Puelles y cols., 1986b) (Fig. 44)— con DNA de la estirpe 406 y seleccionamos transformantes de fenotipo S3'. Mediante experimentos de hibridación del DNA de estos transformantes con sondas que incluían genes capsulares o zonas incluidas en el fragmento deleccionado de M31 (Figs. 45A y B), observamos que tales transformantes poseen la misma delección que la cepa parental a pesar de haber adquirido el fenotipo capsulado. Este resultado demuestra que la región situada en posición 3' con respecto al gen *lytA* no desempeña ninguna función en la biosíntesis capsular de serotipo 3 de neumococo.

2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES COMUNES

Como ya se ha comentado Guidolin y cols. (1994) sugirieron que los genes comunes que preceden a los específicos de serotipo 19F (Fig. 46) podían estar implicados en la síntesis del polisacárido capsular de neumococo y más concretamente, en el transporte del polisacárido a través de la membrana celular (*cps19fC* y *cps19fD*) o en la regulación de la expresión génica (*cps19fA*). Sin embargo, en nuestro trabajo hemos observado que estos genes aparentemente no son necesarios para la formación de cápsula de serotipo 3, ya que la estirpe 406 que no produce estas proteínas sintetiza, no obstante, una cápsula muy abundante (Fig. 22, apartado 4.1 y apartado 1.9 de Resultados). La implicación de estos genes en la síntesis capsular sugerida por Guidolin y cols. (1994) está basada en experimentos de mutagénesis por inserción de transposones y las posibles funciones han sido deducidas en función del parecido de las secuencias de aminoácidos con las de proteínas caracterizadas como transportadoras o reguladoras en la síntesis capsular en otros microorganismos; por tanto, al disponerse los genes comunes y específicos en una misma unidad de transcripción no se puede descartar que los genes realmente implicados en la

formación de cápsula sean únicamente éstos últimos, produciéndose una pérdida de la encapsulación debida a un efecto de inactivación polar.

Nuestros resultados sugieren que la formación de cápsula, al menos en el caso del serotipo 3, no necesita de la presencia de proteínas transportadoras específicas de polisacárido capsular sino que, probablemente, el transporte del polisacárido a la superficie celular pueda ser realizado mediante transportadores no específicos para esa función. Esta afirmación se ve apoyada por la observación de que una estirpe de *E. coli* en la que se ha introducido un sólo gen capsular de neumococo, *cap3B*, es capaz de sintetizar y transportar a través de la membrana interna un polisacárido inmunológicamente idéntico al polisacárido capsular de serotipo 3 (Fig. 31B, apartado 7.2.4 de Resultados). En este microorganismo no existe, lógicamente, ningún transportador específico de este polisacárido aunque sí posee dos proteínas, KpsT y KpsM, que forman un sistema de transporte a través de la membrana interna para su propio polisacárido capsular (ver apartado 5.3 de Introducción). También es posible que, dada la simplicidad estructural del polisacárido de serotipo 3, éste no necesite un sistema de transporte determinado, que podría estar formado por las proteínas codificadas por los genes comunes antes mencionados, y que sí sea imprescindible en el caso de polisacáridos de estructura y composición más compleja.

Hasta el momento no se ha identificado ninguna proteína implicada en la regulación de la síntesis capsular en microorganismos Gram-positivos, aunque recientemente se ha descrito un mecanismo de regulación a nivel transcripcional de la síntesis de ácido hialurónico en *S. pyogenes* (Crater y van de Rijn, 1995). En este microorganismo se ha descrito un fenómeno de control de la síntesis de ácido hialurónico, consistente en la pérdida de la cápsula al llegar a la fase estacionaria de crecimiento (van de Rijn, 1983), mientras que en el caso de neumococo se ha observado que gran parte del polisacárido de serotipo 3 se desprende de la célula al llegar ésta a la fase estacionaria de crecimiento, aunque hasta el momento se desconocen las causas de este fenómeno (Wood y Smith, 1949), además de ir disminuyendo la producción de cápsula de tipo 3 a lo largo de las fases de crecimiento del cultivo, hasta cesar dicha producción (Bukantz y cols., 1941). Asimismo, la implicación de la proteína Cps19fA en la regulación —sugerida a partir de su parecido con la proteína LytR, reguladora a nivel transcripcional de la expresión de los genes *lytABC* en *B. subtilis* (Lazarevic y cols., 1992)— no ha sido comprobada y según nuestras observaciones su presencia no es esencial para la formación de cápsula (apartado 1.9 de Resultados), aunque

no puede descartarse que desempeñe un papel como regulador negativo de la expresión génica.

3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES CAPSULARES

El análisis comparativo de secuencias de aminoácidos de la proteína Cap3C con las secuencias existentes en los bancos de datos reveló una gran semejanza con proteínas caracterizadas como UDP-Glc pirofosforilasas (Fig. 16). Además, en su extremo N-terminal contiene una secuencia de nueve aminoácidos que posee una similitud notable con una zona de la UDP-Glc pirofosforilasa de patata, enzima con la que también comparte la presencia de un residuo de lisina que ha sido identificado como esencial para el funcionamiento de dicha enzima (apartado 1.8 de Resultados). Estos datos apuntaban a que Cap3C daría cuenta de una actividad UDP-Glc pirofosforilasa; para comprobar esta sugerencia disponíamos de la estirpe FF4001 de *E. coli* que contiene una mutación en el gen *galU*, que codifica la UDP-Glc pirofosforilasa de este microorganismo. Según se ha comentado anteriormente (apartado 7.3.2 de Resultados) las mutaciones *galU* producen fenotipos muy característicos, uno de los cuales se manifiesta en la incapacidad que poseen estas cepas para utilizar la galactosa como fuente de carbono (Sundararajan y cols., 1962), debido a que el metabolismo bacteriano de la galactosa se lleva a cabo a través de la ruta mostrada en la Figura 47, descrita por Leloir (1956) y Kalckar (1958).

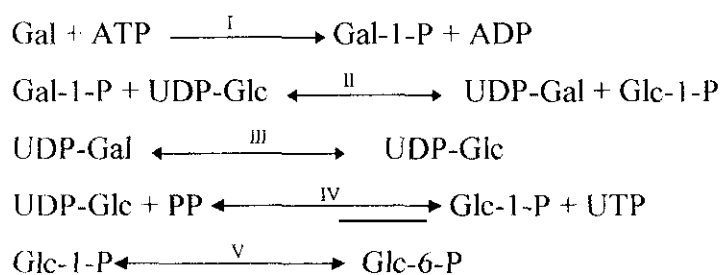


Figura 47. Ruta de conversión de galactosa en un intermediario glicolítico (Glc-6-P). I, galactoquinasa; II, Gal-1-P uridilil transferasa; III, UDP-Gal epimerasa; IV, UDP-Glc pirofosforilasa; V, fosfoglucomutasa.

Los genes que codifican las tres primeras enzimas de la ruta forman el operón *gal*, que constituye un sistema inducible y, cuando la célula se incubaba en presencia de galactosa la tasa de síntesis de dichas enzimas se incrementa hasta 15 veces, inhibiéndose dicha síntesis en presencia de glucosa (Adhya, 1987). Por tanto, las estirpes *galU* acumulan Gal-1-P cuando se incuban en un medio de cultivo cuya única fuente de carbono es galactosa; dicha acumulación de Gal-1-P en el citoplasma resulta tóxica para la célula y produce la inhibición del crecimiento (Sundararajan y cols., 1962). De este modo, cuando se cultiva la estirpe FF4001 en medio MacConkey suplementado con galactosa como única fuente de carbono, se observa la aparición de colonias diminutas e incoloras, en contraste con lo que sucede con la estirpe parental, MC4100, (*galU'*), que forma colonias grandes con un color rojo intenso, debido a la disminución del pH como consecuencia de la fermentación del azúcar. La transformación de la estirpe FF4001 con un plásmido recombinante (pKAL1) que contenía el gen *cap3C* bajo el control del promotor del operón *lac* (Fig. 35, apartado 7.3.1 de Resultados) dió lugar a la aparición de transformantes que mostraban un fenotipo idéntico al silvestre (Fig. 36, apartado 7.3.2 de Resultados). lo que indicaba que la mutación *galU* era complementada por Cap3C y demostraba que ésta proteína era una UDP-Glc pirofosforilasa. Sin embargo, en los extractos celulares de esta estirpe, no observamos la aparición de ninguna banda proteica adicional con respecto a los extractos utilizados como control, lo que nos indicaba que la producción de la proteína Cap3C no era lo suficientemente abundante como para permitir su detección en un gel de poli(acrilamida)-SDS, aunque era adecuada para suplir la deficiencia en mutantes *galU*. Con el fin de conseguir una mejor caracterización de la proteína Cap3C se construyó un nuevo plásmido recombinante (pTNC41) que contenía el gen *cap3C* bajo el control del sistema de expresión del fago T7 (Fig. 37, apartado 7.3.3 de Resultados) y se pudo observar la producción de una proteína de unos 35 kDa, cuya secuencia N-terminal coincidió con la deducida para Cap3C a partir de la secuencia de nucleótidos (Fig. 38, apartado 7.3.4 de Resultados). Desgraciadamente, no fue posible producir la proteína Cap3C en *E. coli* en condiciones nativas para poder ensayar su actividad bioquímica.

A partir de la comparación de la secuencia de aminoácidos deducida del gen *cap3A* con las de las bases de datos obtuvimos información que nos permitió asignar una posible función a la proteína Cap3A. Así, encontramos una gran similitud en su secuencia, concretamente un 57% de identidad, con la de la proteína HasB de *S. pyogenes* (Fig. 14)

(Dougherty y van de Rijn, 1993), caracterizada como UDP-GlcDH, además de observar la presencia de una secuencia muy parecida a la del péptido tríptico de la UDP-GlcDH bovina que contiene el centro activo de la enzima (Franzen y cols., 1981) y de un motivo de unión a NAD en su extremo N-terminal, característico de muchas deshidrogenasas (apartado 1.8 de Resultados) (Wierenga y cols., 1986). Por otra parte, estudiando los 13 mutantes rugosos que habíamos aislado en el laboratorio, encontramos que en 12 de ellos la mutación había tenido lugar en el gen *cap3A* (Tabla 8, apartado 6 de Resultados), lo cual apoyaba la hipótesis de que este gen codificaba una UDP-GlcDH, ya que se había descrito que la gran mayoría de las mutaciones espontáneas sufridas por estirpes capsuladas de serotipo 3 que producían un fenotipo rugoso habían tenido lugar en un locus denominado *capD* (Bernheimer y Wermundsen, 1972) e implicaban una deficiencia en esta actividad enzimática (Bernheimer y cols., 1968) (ver apartado 7.2 de Introducción). Una evidencia más directa se obtuvo transformando con el gen *cap3A* uno de estos mutantes, denominado A66R2, al comprobarse que se obtenían transformantes capsulados (Tabla 8).

Todos estos resultados indicaban que Cap3A era una UDP-GlcDH, pero la demostración directa de esta función requería la comprobación de su actividad enzimática *in vitro*. Sin embargo, se había descrito previamente la presencia en extractos celulares de neumococo, de una elevada actividad NADH oxidasa (Smith y cols., 1958b) que interfiere con la detección de la formación de NADH, que constituye el parámetro mensurable relacionado con la actividad UDP-GlcDH. Asimismo, se había observado que dicha actividad NADH oxidasa no puede ser separada de la actividad UDP-GlcDH mediante el fraccionamiento de los extractos celulares de neumococo (Smith y cols., 1959b). Por tanto, la comprobación de la actividad bioquímica de Cap3A requería la expresión del gen en un sistema heterólogo, lo que podría, al menos en principio, acarrear notables dificultades como ya se ha puesto en evidencia para buen número de genes de neumococo (Dillard y Yother, 1991). Así, ya habíamos observado repetidamente que el gen *cap3A* no podía ser clonado intacto en *E. coli*, ya que durante la clonación del fragmento *EcoRI* de 10 kb (apartados 1.2 y 1.4 de Resultados), éste sufría repetidas deleciones que se producían indefectiblemente en el gen *cap3A*. Esto nos llevó a pensar en un posible efecto tóxico del producto génico de *cap3A* en *E. coli* similar al descrito en el caso del gen *hasB* de *S. pyogenes* (Dougherty y van de Rijn, 1993), por lo que abordamos su clonación mediante el empleo de un sistema bien regulado, basado en la utilización de un promotor fágico reconocible únicamente por la RNA

polimerasa del fago T7 (Fig. 27, apartado 7.1.1 de Resultados). Este sistema nos permitió clonar un plásmido recombinante (pTVU1) que contenía el gen *cap3A*, en una estirpe de *E. coli* que no sintetiza la RNA polimerasa fágica eliminando así la posibilidad de expresión del gen de neumococo. Para ello, prescindimos previamente del promotor del operón *cap3*. A continuación, introduciendo este plásmido pTVU1 en una cepa de *E. coli* que sintetiza la RNA polimerasa del fago T7 observamos la producción de una proteína de 47 kDa que identificamos como Cap3A mediante la secuenciación de su extremo N-terminal (Fig. 28, apartado 7.1.2 de Resultados). Sin embargo, cuando realizamos el fraccionamiento de los extractos celulares encontramos que la proteína Cap3A se hallaba prácticamente en su totalidad en la fracción insoluble. Estos extractos mostraron una actividad enzimática muy reducida, debido probablemente a la desnaturalización de la enzima como consecuencia de la formación de cuerpos de inclusión. Por tanto, procedimos a llevar a cabo los cultivos a menor temperatura (30°C) y con ello obtuvimos, como era de esperar, una producción de Cap3A menor; en este caso, sin embargo, la proteína se encontraba mayoritariamente en forma soluble y observamos, en efecto, una actividad UDP-GlcDH significativamente más alta que en el caso anterior (Tabla 9, apartado 7.1.3 de Resultados). En contraposición a resultados previos (Mills, 1969), se determinó que la actividad UDP-GlcDH de neumococo de tipo 3 no requiere Mg^{2+} y que el pH óptimo era 9,0, en lugar de 8,4. Por otra parte, encontramos que la adición de ácido iodoacético, agente inactivante de los residuos de cisteína, provoca la reducción drástica de la actividad UDP-GlcDH, lo cual indica la intervención de grupos sulfidrilo en la catálisis enzimática, tal y como se había postulado anteriormente (Mills, 1969). En apoyo de esta idea está el hecho de que la eliminación del tioglicolato, un agente estabilizante de grupos reductores, provoca una pérdida notable de la actividad UDP-GlcDH. Es probable que uno de los residuos de cisteína implicados sea Cys²⁵⁹ (Fig.10), es decir, el situado en la secuencia que supuestamente forma el centro catalítico de la enzima (Franzen y cols., 1981). Por último, llevamos a cabo la confirmación directa de que el producto de la reacción de Cap3A es UDP-GlcA mediante HPLC (Fig. 29).

El análisis comparativo de secuencias de aminoácidos había mostrado que Cap3B contiene un 25% de aminoácidos idénticos a los de la hialuronato-sintasa HasA de *S. pyogenes* (Figs. 15B y C, apartado 1.8 de Resultados), la enzima que cataliza la unión de GlcA y GlcNAc (DeAngelis y cols., 1993b). Cap3B muestra un perfil de hidrofobicidad

compatible con el de una proteína de membrana. Por otra parte, habíamos aislado un mutante *cap3B* que producía una cantidad de polisacárido capsular significativamente más baja que la de la cepa parental (Fig. 30, apartado 7.2.1 de Resultados). Todas estas observaciones indicaban que *cap3B* estaba implicado en la biosíntesis capsular, probablemente en la formación de, al menos, uno de los dos tipos de enlaces presentes en el polisacárido de tipo 3, dado que estudios ya clásicos habían puesto de manifiesto que la actividad responsable de la síntesis del polisacárido capsular de serotipo 3 se encontraba asociada a la membrana de la bacteria (Smith y cols., 1961b). Analizando el mutante *cap3B* encontramos que, a pesar de que su mutación conllevaría la síntesis de una proteína truncada de únicamente 41 aminoácidos —17 de los cuales no corresponderían con los originales— sintetiza, no obstante, cierta cantidad de polisacárido capsular lo que podría explicarse mediante un fenómeno de salto o deslizamiento del ribosoma de tipo +1 en el marco de lectura (Engelberg-Kulka y Schoulaker-Schwarz, 1994).

Con el fin de determinar de forma inequívoca la función que desempeña la proteína Cap3B durante la biosíntesis capsular, estudiamos su efecto tanto en *E. coli* como en estirpes de neumococo pertenecientes a otros serotipos. La transformación de la estirpe de *E. coli* productora de T7 RNA polimerasa con el plásmido que contiene el gen *cap3B* (pTBP3) (Fig. 31, apartado 7.2.2 de Resultados) no producía transformantes, con lo que concluimos que la expresión de *cap3B* en *E. coli* conlleva un efecto nocivo para la célula, como ya habían observado otros investigadores (Dillard y cols., 1995). Con el fin de tratar de reducir al menos este efecto deletéreo, transformamos con el plásmido pTBP3 una estirpe de *E. coli* productora de la T7 RNA polimerasa y que sintetiza de manera constitutiva, a partir del plásmido pLysS, la enzima lítica del bacteriófago T7 que posee un efecto inhibitorio de la actividad RNA polimerasa de T7 (Moffatt y Studier, 1987). De esta manera, se sintetizó una proteína de 50 kDa que fue identificada como Cap3B mediante la secuenciación de su extremo N-terminal (Fig. 32A, apartado 7.2.3 de Resultados).

En los extractos obtenidos a partir de la estirpe de *E. coli* productora de Cap3B observamos la síntesis de un polisacárido inmunológicamente indistinguible del producido por las estirpes de neumococo de serotipo 3 (Fig. 32B, apartado 7.2.4 de Resultados). Esta síntesis tenía lugar incluso en cultivos no inducidos indicando la existencia de un nivel basal de expresión como consecuencia de una represión incompleta. El polisacárido sintetizado, con un peso molecular similar al producido en neumococo tal y como observamos mediante

filtración en gel, se encuentra mayoritariamente en el citoplasma y en el espacio periplásmico, aunque una pequeña proporción también se localiza en la fracción de membrana. Según se ha comentado anteriormente, en el genoma de *E. coli* se distinguen tres regiones implicadas en la biosíntesis capsular; una de ellas, la región 3, está formada por los genes *kpsM* y *kpsT* que codifican dos proteínas cuya función es la translocación del polisacárido a través de la membrana interna; estas proteínas pertenecen a la familia de los transportadores 'ABC' que, aparentemente, son capaces de translocar una cierta variedad de polisacáridos cargados negativamente. No obstante, la posible implicación de KpsM y KpsT en el transporte del polisacárido de neumococo, aunque constituye una hipótesis atractiva, requiere todavía confirmación experimental.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que Cap3B posee las dos actividades necesarias para la síntesis capsular, es decir, que cataliza la transferencia al polisacárido tanto de los residuos de Glc como de los de GlcA. Un hecho similar ha sido descrito también en el caso de la proteína HasA de *S. pyogenes*, puesto que es la única enzima imprescindible —suponiendo que el huésped contenga los precursores requeridos— para la formación de ácido hialurónico, tanto en *E. coli* como en *E. faecalis* (DeAngelis y cols., 1993a; DeAngelis y Weigel, 1994). Así, Cap3B sintetizaría el polisacárido capsular de serotipo 3 a partir de UDP-Glc, presente en todos los microorganismos ya que desempeña un papel fundamental en el metabolismo de la gran mayoría de oligo y polisacáridos, y de UDP-GlcA, cuya presencia ya había sido descrita en *E. coli* (Lieberman y cols., 1970).

La producción máxima de polisacárido de serotipo 3 obtenida en *E. coli* correspondería a un 1 a 5% de la observada en la cepa original 406 de neumococo (apartado 7.2.4 de Resultados). Asimismo, encontramos que la síntesis capsular de la cepa 406 da lugar a la formación de 10 a 50 μg de polisacárido por cada 10^8 células, lo cual coincide con observaciones previas que señalaban una producción de 15 μg por cada 10^8 células (MacLeod y Krauss, 1953). La diferencia observada entre la producción de polisacárido de serotipo 3 observada en neumococo y en *E. coli* podría deberse a una diferente actividad de la UDP-GlcDH en ambos sistemas, que haría de la concentración de UDP-GlcA el factor limitante en la producción de polisacárido en *E. coli*. Esta sugerencia supondría que la actividad de Cap3A en neumococo debe ser significativamente mayor que la de la UDP-GlcDH de *E. coli* aunque este punto no ha podido ser comprobado experimentalmente. Schiller y cols. (1973) midieron la actividad UDP-GlcDH en extractos crudos de *E. coli*,

encontrando una actividad específica de 0,026 U por mg de proteína; sin embargo, una valoración similar no se ha podido realizar utilizando extractos de neumococo, debido a la presencia, ya comentada, de una elevada actividad NADH oxidasa en *S. pneumoniae*.

Por otro lado, se obtuvo el plásmido recombinante pLSE3B, por clonación del gen *cap3B* en el plásmido pLSE1, capaz de replicar en neumococo (Fig. 33, apartado 7.2.5 de Resultados). En este plásmido recombinante la transcripción del gen *cap3B* se encuentra bajo el control del promotor del gen que determina la resistencia a tetraciclina. Este plásmido fue introducido por transformación en estirpes de neumococo pertenecientes a cuatro serotipos distintos: 1, 2, 5 y 8. Las estirpes de los serotipos 2, 5 y 8 contienen GlcA en su polisacárido capsular, mientras que las de serotipo 1 contienen GalA (Tabla 1, apartado 7 de Introducción), cuyo precursor, UDP-GalA, se sintetiza a partir de UDP-GlcA en una reacción catalizada por la enzima UDP-GalA epimerasa (Smith y cols., 1958a). Observamos que las cepas transformantes, que contienen el plásmido pLSE3B, presentan un fenotipo ‘binario’, es decir, sintetizan polisacárido capsular perteneciente a dos serotipos distintos, el original de la cepa parental y el de serotipo 3 (Fig. 34). La formación de fenotipos ‘binarios’ ya había sido observada anteriormente, como se indica en el apartado 7.2 de Introducción, pero en aquel caso, dicho fenotipo era consecuencia de un proceso de recombinación inusual mediante el cual los genes capsulares del DNA donador se insertan en el cromosoma en un lugar distinto al que contiene los genes capsulares de la cepa receptora. Por tanto, esta recombinación no implica la sustitución de un grupo de genes capsular por otro, sino que los dos grupos están presentes en la misma célula y cada uno dirige la síntesis de su propio polisacárido. En nuestro caso, por el contrario, el fenotipo ‘binario’ se debe a que la proteína Cap3B sintetiza el polisacárido capsular de serotipo 3 a partir de UDP-Glc y UDP-GlcA producidos por la cepa receptora. La aparición de estas estirpes ‘binarias’ apoya nuevamente la sugerencia de que el polisacárido capsular en neumococo es transportado mediante sistemas que no son específicos de un determinado serotipo. Por tanto, al igual que sucede en microorganismos Gram-negativos, los genes que dirigen las funciones de transporte podrían ser comunes a diferentes serotipos aunque no se ha demostrado que sean adyacentes a los genes biosintéticos, como ocurre en el caso de las bacterias Gram-negativas. En cualquier caso, nuestros resultados y los obtenidos en *S. pyogenes* (DeAngelis y cols., 1993a; DeAngelis y Weigel, 1994) sugieren la existencia de sistemas alternativos para transportar los polisacáridos a la superficie bacteriana en cepas

que tiene inactivadas las ORFs que flanquean a los genes específicos. Cuando se utilizaron como cepas receptoras las estirpes M11 y M31, dos estirpes rugosas derivadas de R6 (Tabla 3), los transformantes Lin^R obtenidos con pLSE3B sólo expresaron una cápsula de tipo 3 (Fig. 34). La cepa R6 es un clon altamente transformable obtenido a partir de R36A [la estirpe clásica S2⁻ aislada por Avery y cols. (1944)] (Ottolenghi y Hotchkiss, 1962). Algunos investigadores han sugerido que tanto R36A como R6 podrían ser mutantes de delección (Ravin, 1959; Kohoutova, 1961) y estar tal vez afectados al menos en el gen (o genes) de polimerización del polisacárido de tipo 2 (Bernheimer y cols., 1967). De hecho, Smith y cols. (1957a; 1959a, b) no encontraron en estas cepas defecto bioquímico alguno que indicara la carencia de alguno de los monosacáridos componentes de ese tipo de cápsula. Por otra parte, previamente se había afirmado que lo que se denominaba 'sistema sintetizador' de la cápsula de serotipo 3 —es decir, la proteína Cap3B— requiere para su actividad la presencia de polisacárido capsular de serotipo 3 preformado, que actuaría como cebador de la polimerización, y que esta actividad estaría relacionada con la cantidad de polisacárido presente (Smith y cols., 1961b). Sin embargo, en nuestro trabajo hemos comprobado que la enzima Cap3B actúa sin necesidad de dicho cebador ya que, lógicamente, tanto *E. coli* como las estirpes de neumococo de los serotipos 1, 2, 5 y 8 no contienen polisacárido de serotipo 3.

VI.- CONCLUSIONES

- 1.- Los genes capsulares se encuentran situados en un fragmento *SacII* de 60 kb del cromosoma de *S. pneumoniae* —correspondiente al nº 12 del mapa físico del genoma de la estirpe R6— que, a su vez, está incluido en un fragmento *SmaI* de 290 kb. Al contrario de lo que han afirmado otros autores, la región de DNA situada en posición 3' con respecto al gen *lytA* de neumococo no contiene ningún gen implicado en la biosíntesis capsular de serotipo 3.
- 2.- En el cromosoma de *S. pneumoniae* existen repeticiones de algunos fragmentos de la zona situada en posición 5' respecto a los genes capsulares. Ésta —o éstas— repeticiones se encuentran localizadas en el fragmento *SmaI* de 52 kb que contiene el gen *recP*.
- 3.- A ambos lados del operón de síntesis capsular existen regiones comunes a algunos serotipos, que no parecen estar implicados en los procesos de biosíntesis de la cápsula de serotipo 3.
- 4.- La región situada en posición 3' con respecto a los genes capsulares contiene restos de genes que parecen ser consecuencia de una serie de eventos de inserción o escisión génica, posiblemente mediados por una secuencia de inserción, la cual también ha resultado truncada posteriormente. Uno de los genes afectados por estos sucesos es el que habría constituido anteriormente el cuarto gen del operón *cap3*, que ha resultado truncado en su extremo 3'.
- 5.- Los genes responsables de la síntesis del polisacárido capsular de serotipo 3 de *S. pneumoniae* constituyen una única unidad de transcripción, denominada operón *cap3*, que consta de tres genes específicos. Únicamente los dos primeros genes del operón, *cap3A* y *cap3B*, son imprescindibles para la biosíntesis capsular mientras que el tercero de ellos, *cap3C*, aunque prescindible, interviene también en los procesos que conducen a la formación de la cápsula.

- 6.- El gen *cap3C* codifica una proteína de aproximadamente 35 kDa con actividad UDP-Glc pirofosforilasa, es decir, que cataliza la síntesis de UDP-Glc a partir de Glc-1-P y UTP.
- 7.- El gen *cap3A* codifica una enzima de aproximadamente 47 kDa que ha sido expresada en *E. coli* siendo identificada como una UDP-Glc deshidrogenasa que cataliza la oxidación de UDP-Glc a UDP-GlcA.
- 8.- Confirmando resultados clásicos, se ha visto que la gran mayoría de las mutaciones espontáneas que producen un fenotipo rugoso en estirpes de serotipo 3 tiene lugar en el gen *cap3A*. Ello es probablemente consecuencia de que la pérdida total de la actividad de Cap3B sólo es posible previa mutación de *cap3A*.
- 9.- La proteína Cap3A utiliza NAD como cofactor en la reacción de formación de UDP-GlcA, reduciéndolo a NADH; tiene un pH óptimo de 9 y una temperatura óptima de 30°C. La catálisis enzimática llevada a cabo por Cap3A está mediada por grupo(s) sulfidrilo.
- 10.- El gen *cap3B* codifica una proteína de aproximadamente 50 kDa con doble actividad glicosil transferasa, es decir, que cataliza la transferencia de los dos azúcares componentes del polisacárido capsular de tipo 3, Glc y GlcA, a la cadena polisacáridica en formación.
- 11.- La proteína Cap3B, cuando se sintetiza en una estirpe de *E. coli*, dirige la producción de polisacárido capsular de serotipo 3 de neumococo, a partir de UDP-Glc y UDP-GlcA de la propia bacteria. Una parte sustancial de este polisacárido es transportado a través de la membrana interna hasta el espacio periplásmico.
- 12.- La proteína Cap3B cataliza la producción de cápsula de tipo 3 en estirpes de neumococo de otros serotipos capaces de sintetizar UDP-GlcA. Esta síntesis es simultánea a la del polisacárido capsular del serotipo original en estirpes receptoras capsuladas, lo cual conlleva la aparición de estirpes con un fenotipo 'binario'.

VI.- BIBLIOGRAFÍA

- Adhya, S.** 1987. The galactose operon. En Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, K. Brooks Low, B. Magasanik, M. Schateter, y H.E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. pp. 1503-1512. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Andersson, B., J. Dahmén, T. Frejd, H. Leffler, G. Magnusson, G. Noori, y C. Svaborg-Edén.** 1983. Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J. Exp. Med.* **158**:559-570.
- Andersson, B., E.H. Beachey, A. Tomasz, E. Tuomanen, y C. Svanborg-Eden.** 1988. A sandwich adhesin on *Streptococcus pneumoniae* attaching to oropharyngeal epithelial cells in vitro. *Microb. Pathog.* **4**:267-268.
- Angel, C.S., M. Ruzek, y M.K. Hostetter.** 1994. Degradation of C3 by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **170**:600-608.
- Appleyard, R.K.** 1954. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* **39**:440-452.
- Austrian, R.** 1981. Pneumococcus: The first one hundred years. *Rev. Infect. Dis.* **3**:183-189.
- Austrian, R.** 1985. Polysaccharide vaccines. *Ann. Inst. Pasteur. Microbiol.* **136B**:295-307.
- Austrian, R.** 1986. Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J. Antimicrob. Chemother.* **18**:35-45.
- Austrian, R., y H.P. Bernheimer.** 1959. Simultaneous production of two capsular polysaccharides by pneumococcus. I. Properties of a pneumococcus manifesting binary capsulation. *J. Exp. Med.* **110**:571-584.
- Austrian, R., H.P. Bernheimer, E.E.B. Smith, y G.T. Mills.** 1959. Simultaneous production of two capsular polysaccharides by pneumococcus. II. The genetic and biochemical bases of binary capsulation. *J. Exp. Med.* **110**:585-602.
- Avery, O.T., C.M. MacLeod, y M. McCarthy.** 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* **79**:137-157.
- Avery, O.T., y R. Dubos.** 1931. The protective action of a specific enzyme against type III pneumococcus infection in mice. *J. Exp. Med.* **54**:73-89.

- Bachmann, B.J.** 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**:130-197.
- Baker, C.J., y D.L. Kasper.** 1985. Group B streptococcal vaccines. *Rev. Infect. Dis.* **7**:458-467.
- Barany, F., y A. Tomasz.** 1980. Genetic transformation of *Streptococcus pneumoniae* by heterologous plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **144**:698-709.
- Barany, F., J.F. Boeke, y A. Tomasz.** 1982. Staphylococcal plasmids that replicate and express erythromycin resistance in both *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:2991-2995.
- Batshon, B.A., H. Baer, y M.F. Shaffer.** 1963. Immunologic paralysis produced in mice by *Klebsiella pneumoniae* type 2 polysaccharide. *J. Immunol.* **90**:121-126.
- Bernheimer, H.P., I.E. Wermundsen, y R. Austrian.** 1967. Qualitative differences in the behavior of pneumococcal deoxyribonucleic acids transforming to the same capsular type. *J. Bacteriol.* **93**:320-333.
- Bernheimer, H.P., I.E. Wermundsen, y R. Austrian.** 1968. Mutation in pneumococcus type III affecting multiple cistrons concerned with the synthesis of capsular polysaccharide. *J. Bacteriol.* **96**:1099-1102.
- Bernheimer, H.P., y I.E. Wermundsen.** 1969. Unstable binary capsulated transformants in pneumococcus. *J. Bacteriol.* **98**:1073-1079.
- Bernheimer, H.P., y I.E. Wermundsen.** 1972. Homology in capsular transformation reactions in pneumococcus. *Mol. Gen. Genet.* **116**:68-83.
- Berry, A.M., J.C. Paton, E.M. Glare, D. Hansman, y D.E.A. Catcheside.** 1988. Cloning and expression of the pneumococcal neuraminidase gene in *Escherichia coli*. *Gene* **71**:299-305.
- Berry, A.M., J. Yother, D.E. Briles, D. Hansman, y J.C. Paton.** 1989a. Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**:2037-2042.
- Berry, A.M., R.A. Lock, D. Hansman, y J.C. Paton.** 1989b. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**:2324-2330.
- Berry, A.M., J.C. Paton, y D. Hansman.** 1992. Effect of insertional inactivation of genes encoding pneumolysin and autolysin on the virulence of *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Microb. Pathog.* **12**:87-93.

- Bhakdi, S., y J. Trandum-Jensen.** 1986. Membrane damage by pore-forming bacterial cytolysins. *Microb. Pathog.* **1**:5-14.
- Birnboim, H.C., y J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
- Bitter, T., y H.M. Muir.** 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* **4**:330-334.
- Bolívar, F.** 1978. Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique *EcoRI* sites for selection of *EcoRI* generated recombinant molecules. *Gene* **4**:121-136.
- Boucher, J.C., J. Martínez-Salazar, M.J. Schurr, M.H. Mudd, H.Yu, y V. Deretic.** 1996. Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis encode homologs of the serine protease HtrA. *J. Bacteriol.* **178**:511-523.
- Boulnois, G.J.** 1992. Pneumococcal proteins and pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **138**:249-259.
- Boulnois, G.J., I.S. Roberts, R. Hodge, K.R. Hardy, K.B. Jann, y K.N. Timmis.** 1987. Analysis of the K1 capsule biosynthesis genes of *Escherichia coli*: definition of three functional regions for capsule production. *Mol. Gen. Genet.* **208**:242-246.
- Boulnois, G.J., y I.S. Roberts.** 1990. Genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **150**:1-18.
- Boulnois, G.J., y K.B. Jann.** 1989. Bacterial polysaccharide capsule synthesis, export and evolution of structural diversity. *Mol. Microbiol.* **3**:1819-1823.
- Bracco, R.M., M.R. Krauss, A.S. Roe, y M. MacLeod.** 1957. Transformation reactions between pneumococcus and three strains of streptococci. *J. Exp. Med.* **106**:247-259.
- Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Briese, T., y R. Hakenbeck.** 1985. Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. *Eur. J. Biochem.* **146**:417-427.
- Brown, E.J.** 1985. Interaction of Gram-positive microorganisms with complement. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **121**:159-187.

- Brown, E.J., K.A. Joiner, R.M. Cole, y M. Berger.** 1983. Localization of complement component 3 on *Streptococcus pneumoniae*: anti-capsular antibody causes complement deposition on the pneumococcal capsule. *Infect. Immun.* **39**:403-409.
- Bruyn, G.A.W., y R. van Furth.** 1991. Pneumococcal polysaccharide vaccines: indications, efficacy and recommendations. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**:897-910.
- Brzin, B.** 1969. Reversion of α - into β -hemolysis of *Diplococcus pneumoniae* by low concentration of optochin. *Experientia* **25**:985-986.
- Bukantz, S.C., A. Cooper, y J.G.M. Bullowa.** 1941. The elaboration of soluble capsular polysaccharide by pneumococcus III in relation to growth phases *in vitro*. *J. Bacteriol.* **42**:29-49.
- Cámara, M., G.J. Boulnois, P.W. Andrews, y T.J. Mitchell.** 1994. A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect. Immun.* **62**:3688-3695.
- Cámara, M., T.J. Mitchell, P.W. Andrew, y G.J. Boulnois.** 1991. *Streptococcus pneumoniae* produces at least two distinct enzymes with neuraminidase activity: cloning and expression of a second neuraminidase gene in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **59**:2856-2858.
- Canvin, J.R., A.P. Marvin, M. Sivakumaran, J.C. Paton, G.J. Boulnois, P.W. Andrew, y T.J. Mitchell.** 1995. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J. Infect. Dis.* **172**:119-123.
- Cohen, M.L.** 1992. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* **257**:1050-1055.
- Corn, P.G., J. Anders, A.K. Takala, H. Käyhty, y S.K. Hoiseth.** 1993. Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are frequently amplified. *J. Infect. Dis.* **167**:356-364.
- Courtney, H.S.** 1991. Degradation of connective tissue proteins by serin proteases from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**:1023-1028.
- Crater, D.L., B.A. Dougherty, y I. van de Rijn.** 1995. Molecular characterization of *hasC* from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. *J. Biol. Chem.* **270**:28676-28680.

- Crater, D.L., y I. van de Rijn.** 1995. Hyaluronic acid synthesis operon (*has*) expression in group A streptococci. *J. Biol. Chem.* **270**:18452-18458.
- Cross, A.S.** 1990. The biological significance of bacterial encapsulation. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **150**:87-95.
- Cundell, D.R., y E.I. Tuomanen.** 1994. Receptor specificity of adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human type-II pneumocytes and vascular endothelial cells *in vitro*. *Microb. Pathog.* **17**:361-374.
- Cheetham, B.F., y M.E. Katz.** 1995. A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol. Microbiol.* **18**:201-208.
- Chester, F.D.** 1901. A manual of determinative bacteriology. The MacMillan Co., New York.
- de los Toyos, J.R., F.J. Méndez, J.F. Aparicio, F. Vázquez, M.M. García Suárez, A. Fleites, C. Hardisson, P.J. Morgan, P.W. Andrew, y T.J. Mitchell.** 1996. Functional analysis of pneumolysin by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **64**:480-484.
- DeAngelis, P.L., J. Papaconstantinou, y P.H. Weigel.** 1993a. Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria. *J. Biol. Chem.* **268**:14568-14571.
- DeAngelis, P.L., J. Papaconstantinou, y P.H. Weigel.** 1993b. Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* **268**:19181-19184.
- DeAngelis, P.L., N. Yang, y P.H. Weigel.** 1994. The *Streptococcus pyogenes* hyaluronan synthase: sequence comparison and conservation among various group A strains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**:1-10.
- DeAngelis, P.L., y P.H. Weigel.** 1994. Immunochemical confirmation of the primary structure of streptococcal hyaluronan synthase and synthesis of high molecular weight product by the recombinant enzyme. *Biochemistry* **33**:9033-9039.
- Deretic, V., C.D. Mohr, y D.W. Martin.** 1991. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: signal transduction and histone-like elements in the regulation of bacterial virulence. *Mol. Microbiol.* **5**:1577-1583.
- DeVault, J.D., W. Hendrickson, J. Kato, y A.M. Chakrabarty.** 1991. Environmentally regulated algD promoter is responsive to the cAMP receptor protein in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**:2503-2509.

- Devereux, J., P. Haerberli, y O. Smithies.** 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the Vax. *Nucleic Acids Res.* **12**:387-395.
- Dillard, J.P., M.W. Vandersea, y J. Yother.** 1995. Characterization of the cassette containing genes for type 3 capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Exp. Med.* **181**:973-983.
- Dillard, J.P., y J. Yother.** 1991. Analysis of *Streptococcus pneumoniae* sequences cloned into *Escherichia coli*: effect of promoter strength and transcriptions terminators. *J. Bacteriol.* **173**:5105-5109.
- Dillard, J.P., y J. Yother.** 1994. Genetic and molecular characterization of capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Mol. Microbiol.* **12**:959-972.
- Distler, J., B. Kaufman, y S. Roseman.** 1966. Formation of pneumococcal Type XIV polysaccharide. *Methods Enzymol.* **VIII**:450-455.
- Distler, J., y S. Roseman.** 1964. Polysaccharide and glycolipid synthesis by cell-free preparations from type XIV pneumococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**:897-905.
- Dougherty, B.A., y I. van de Rijn.** 1992. Molecular characterization of a locus required for hyaluronic acid capsule production in group A streptococci. *J. Exp. Med.* **175**:1291-1299.
- Dougherty, B.A., y I. van de Rijn.** 1993. Molecular characterization of *hasB* from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. Demonstration of UDP-glucose dehydrogenase activity. *J. Biol. Chem.* **268**:7118-7124.
- Dougherty, B.A., y I. van de Rijn.** 1994. Molecular characterization of *hasA* from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. *J. Biol. Chem.* **269**:169-175.
- Dower, W.J., J.F. Miller, y C.W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**:6127-6145.
- Dowson, C.G., A. Hutchinson, J.A. Brannigan, R.C. George, D. Hansman, J. Liñares, A. Tomasz, J. Maynard Smith, y B.G. Spratt.** 1989. Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:8842-8846.

- Dowson, C.G., T.J. Coffey, y B.G. Spratt.** 1994. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to b-lactam antibiotics. *Trends Microbiol.* **2**:361-365.
- Drake, C.R., G.J. Boulnois, y I.S. Roberts.** 1993. The *Escherichia coli ser-A* linked locus and its flanking sequences are polymorphic, genetic evidence for the existence of more than two groups of capsule gene clusters. *J. Gen. Microbiol.* **139**:1707-1714.
- Drake, C.R., I.S. Roberts, B. Jann, K. Jann, y G.J. Boulnois.** 1990. Molecular cloning and expression of the genes encoding the *Escherichia coli* K4 capsular polysaccharide, a fructose substituted chondroitin. *FEMS Microbiol. Lett.* **66**:227-230.
- Duane, P.G., J.B. Rubins, H.R. Weisel, y E.N. Janoff.** 1993. Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect. Immun.* **61**:4392-4397.
- Echarti, C., B. Hirschel, G.J. Boulnois, J.M. Varley, F. Waldvogel, y K.N. Timmis.** 1983. Cloning and analysis of the K1 capsule biosynthesis genes of *Escherichia coli*: lack of homology with *Neisseria meningitidis* group B DNA sequences. *Infect. Immun.* **41**:54-60.
- Edwards, M.S., D.L. Kasper, H.J. Jennings, C.J. Baker, y A. Nicholson-Weller.** 1982. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. *J. Immunol.* **128**:1278-1283.
- Engelberg-Kulka, H., y R. Schoulaker-Schwarz.** 1994. Regulatory implication of translational frameshifting in cellular gene expression. *Mol. Microbiol.* **11**:3-8.
- Ephrussi-Taylor, H.** 1951a. Genetic aspects of transformation of pneumococci. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **16**:445-456.
- Ephrussi-Taylor, H.** 1951b. Transformations allogènes du pneumocoque. *Exptl. Cell Res.* **2**:589-607.
- Fath, M.J., y R. Kolter.** 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**:995-1017.
- Feldman, C., T.J. Mitchell, P.W. Andrew, G.J. Boulnois, R.C. Read y cols.** 1990. The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium *in vivo*. *Microb. Pathog.* **9**:275-284.

- Fenoll, A., C. Martin-Bourgon, R. Muñoz, D. Vicioso, Y J. Casal.** 1991. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1989. *Rev. Infect. Dis.* **13**:56-60.
- Fenoll, A., R. Muñoz, E. García, y A.G. de la Campa.** 1994. Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F₀ complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H⁺-ATPases. *Mol. Microbiol.* **12**:587-598.
- Finke, A., B. Jann, y K. Jann.** 1990. CMP-KDO synthetase activity in *Escherichia coli* expressing different capsular polysaccharides. *FEMS Microbiol. Lett.* **69**:129-134.
- Fischer, W., T. Behr, R. Hartmann, J. Petr-Katalinic, y H. Egge.** 1993. Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoic acid (C-polysaccharide). *Eur. J. Biochem.* **215**:851-857.
- Franzen, B., C. Carrubba, D.S. Feingols, J. Ashcom, y J.S. Franzen.** 1981. Amino acid sequence of the tryptic peptide containing the catalytic-site thiol group of bovine liver uridine diphosphate glucose dehydrogenase. *Biochem. J.* **199**:599-602.
- Friedland, I.R., M.M. Paris, S. Hickey, S. Shelton, K. Olsen, J.C. Paton, y G.H. McCracken.** 1995. The limited role of pneumolysin in the pathogenesis of pneumococcal meningitis. *J. Infect. Dis.* **172**:805-809.
- Frosch, M., U. Edwards, K. Bousset, B. Krausse, y C.E. Weisgerber.** 1991. Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. *Mol. Microbiol.* **5**:1251-1263.
- Fukasawa, T., K. Jokura, y K. Kurahashi.** 1963. Mutations in *Escherichia coli* that affect uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity and galactose fermentation. *Biochim. Biophys. Acta* **74**:608-620.
- García, E., P. García, y R. López.** 1993. Cloning and sequencing of a gene involved in the synthesis of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Mol. Gen. Genet.* **239**:188-195.
- García, E., y R. López.** 1995. *Streptococcus pneumoniae* type 3 encodes a protein highly similar to the human glutamate decarboxylase (GAD₆₅). *FEMS Microbiol. Lett.* **13**:113-118.

- García, J.L., E. García, J.M. Sánchez-Puelles, y R. López.** 1988. Identification of a lytic enzyme of *Clostridium acetobutylicum* that degrades choline-containing pneumococcal cell walls. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**:133-138.
- García, J.L., E. García, y R. López.** 1987. Overproduction and rapid purification of the amidase of *Streptococcus pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **149**:52-56.
- Gasc, A.M., P. Kauc, M. Barraillé, M. Sicard, y S. Goodgal.** 1991. Gene localization, size and physical map of the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **173**:7361-7367.
- Gervais, F.G., y G.R. Drapeau.** 1992. Identification, cloning, and characterization of *rscF*, a new regulator gene for exopolysaccharide synthesis that suppresses the division mutation *ftsZ84* in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**:8016-8022.
- Gervais, F.G., P. Phoenix, y G.R. Drapeau.** 1992. The *rscB* gene, a positive regulator of colanic acid biosynthesis in *Escherichia coli*, is also an activator of *ftsZ* expression. *J. Bacteriol.* **174**:3964-3971.
- Gjæver, H.M., O.B. Styrvold, I. Kaasen, y A.R. Strøm.** 1988. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:2841-2849.
- Gibson, T.J.** 1984. Tesis Doctoral. Universidad de Cambridge, Reino Unido.
- Gottesman, S., y V. Stout.** 1991. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12. *Mol. Microbiol.* **5**:1599-1606.
- Granoff, D.M.** 1993. Induction of immunologic memory in infants primed with *Haemophilus influenzae* type b conjugates vaccines. *J. Infect. Dis.* **168**:663-671.
- Griffith, F.** 1928. The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* **27**:113-159.
- Guidolin, A., J.K. Morona, R. Morona, D. Hansman, y J.C. Paton.** 1994. Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 19F. *Infect. Immun.* **62**:5384-5396.
- Haft, R.F., M.R. Wessels, M. Fisk Mebane, N. Conaty, y C.E. Rubens.** 1996. Characterization of *cpsF* and its product CMP-*N*-acetylneuraminic acid synthetase, a group B streptococcal enzyme that can function in K1 capsular polysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **19**:555-563.
- Hammerschmidt, S., C. Birkholz, U. Zähringer, B.D. Robertson, J. van Putten, O. Ebeling, y M. Frosch.** 1994. Contribution of genes from the capsule gene complex (*cps*)

- to lipooligosaccharide biosynthesis and serum resistance in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **11**:885-896.
- Hammerschmidt, S., R. Hilse, J.P.M. van Putten, R. Gerardy-Schahn, A. Unkmeir, y M. Frosch.** 1996. Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO J.* **15**:192-198.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Hashimoto, Y., N. Li, H. Yokoyama, y T. Ezaki.** 1993. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of *ViaB* region encoding Vi antigen in *Salmonella typhi*. *J. Bacteriol.* **175**:4456-4465
- Håvarstein, L.S., G. Coomaraswamy, y D.A. Morrison.** 1995. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11140-11144.
- Hayes, W.** 1966. Genetic transformation: a retrospective appreciation. *J. Gen. Microbiol.* **45**:385-397.
- Henrichsen, J.** 1995. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2759-2762.
- Hoffmann, S., B.C. Sorkin, P.C. White, R. Brackenbury, R. Mailhammer, U. Rutishauser, B.A. Cunningham, y G.M. Edelman.** 1982. Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. *J. Biol. Chem.* **257**:7720-7729.
- Hoiseh, S.K., E.R. Moxon, y R.P. Silver.** 1986. Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are part of an 18-kilobase tandem duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:1106-1110.
- Holstege, A., C. Schulz-Holstege, H. Henninger, K.A. Reiffen, F. Schneider, y D.O.R. Kepler.** 1982. Uridylate trapping induced by the C-2 modified D-glucose analogs glucosone, fluoroglucose, and glucosamine. *Eur. J. Biochem.* **121**:469-474.
- Höltje, J.V., y A. Tomasz.** 1975a. Biological effects of lipoteichoic acids. *J. Bacteriol.* **124**:1023-1027.
- Höltje, J.V., y A. Tomasz.** 1975b. Lipoteichoic acid: A specific inhibitor of autolysin activity in pneumococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:1690-1694.

- Höltje, J.V., y A. Tomasz.** 1975c. Specific recognition of choline residues in the cell wall teichoic acid by the *N*-acetylmuramyl-L-amidase of pneumococcus. *J. Biol. Chem.* **250**:6072-6076.
- Howard, J.G., H. Zola, G.H. Christie, y B.M. Courtenay.** 1971. Studies on Immunological paralysis: V. The influence of molecular weight on the immunogenicity, tolerogenicity and antibody-neutralizing activity of type III pneumococcal polysaccharide. *Immunology* **21**:535-546.
- Humphrey, J.H.** 1944. Hyaluronidase production by pneumococci. *J. Pathol. Bacteriol.* **56**:273-275.
- Isenman, D.E., D.I.C. Kells, N.R. Cooper, H.J. Müller-Eberhard, y M.K. Pangburn.** 1981. Nucleophilic modification of human complement protein C3: correlation of conformational changes with acquisition of C3b-like functional properties. *Biochemistry* **20**:4458-4467.
- Jackson, S.** 1962. Genetic aspects of capsule formation in the pneumococcus. *Brit. Med. Bull.* **18**:24-26.
- Jann, B., y K. Jann.** 1990. Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli*. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **150**:19-42.
- Jansson, P.E., J. Lindberg, K.M. Swarna Wimalasiri, y J. Henrichsen.** 1991. The structure of capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 7B. *Carbohydr. Res.* **217**: 171-180.
- Jennings, H.J.** 1983. Capsular polysaccharides as human vaccines. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **41**:155-208.
- Jennings, H.J.** 1990. Capsular polysaccharides as vaccine candidates. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **150**:97-127.
- Jiang, X-J., B. Neal, F. Santiago, S.J. Lee, L.K. Romana, y P.R. Reeves.** 1991. Structure and sequence of the *rfb* (O antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar *typhimurium* (Strain LT2). *Mol. Microbiol.* **5**:695-713.
- Johnson, M.K.** 1977. Cellular location of pneumolysin. *FEMS Microbiol. Letters.* **2**:243-245.
- Johnston, Jr., R.B.** 1991. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Rev. Infect. Dis.* **13** (Suppl.):S509-S517.

- Joiner, K.A., E.J. Brown, y M.M. Frank.** 1984. Complement and bacteria: chemistry and biology in host defense. *Annu. Rev. Immunol.* **2**:461-492.
- Kalckar, H.M.** 1958. Uridinediphospho galactose: metabolism, enzymology, and biology. *Adv. Enzymol.* **20**:111-134.
- Katsube, T., Y. Kazuta, K. Tanizawa, y T. Fukui.** 1991. Expression in *Escherichia coli* of UDP-glucose pyrophosphorylase cDNA from potato tuber and functional assessment of the five lysyl residues located at the substrate-binding site. *Biochemistry* **30**:8546-8551.
- Käyhty, H., H. Ahman, P.-R. Rönberg, R. Tillikainen, y J. Eskola.** 1995. Pneumococcal polysaccharide-meningococcal outer membrane protein complex conjugate vaccine is immunogenic in infants and children. *J. Infect. Dis.* **172**:1273-1278.
- Kendall, F., M. Heidelberger, y M. Dawson.** 1937. A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic streptococcus. *J. Biol. Chem.* **118**:61-82.
- Kenne, L., y B. Lindberg.** 1983. Bacterial polysaccharides. En G.O. Aspinall (ed.), *The polysaccharides*, vol 2, pp. 287-363. Academic Press, New York.
- Kilian, M., y J. Reinholdt.** 1987. A hypothetical model for the development of invasive infection due to IgA protease producing bacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* **216B**:1261-1269.
- Kilpper-Bälz, R., P. Wenzig, y K.H. Schleifer.** 1985. Molecular relationships and classification of some viridans streptococci as *S. oralis* and emended description of *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**:482-488.
- Klein, D.L.** 1995. Pneumococcal conjugate vaccines: review and update. *Microb. Drug Resist.* **1**:49-58.
- Klein, E.** 1884. Micro-organisms and disease. *Practitioner* **32**:321-352.
- Klugman, K.P.** 1990. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**:171-196.
- Knecht, J.C., G. Schiffman, y R. Austrian.** 1970. Some biological properties of pneumococcus type 37 and the chemistry of its capsular polysaccharide. *J. Exp. Med.* **132**:475-487.
- Kohoutova, D.M.** 1961. Mechanism of the transformation of the polysaccharide capsule in pneumococcus. *Nature* **190**:1171-1173.

- Komeda, Y., T. Icho, y T. Iino.** 1977. Effects of *galU* mutation on flagellar formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **129**:908-915.
- Krivan, H.C., D.D. Roberts, y V. Ginsberg.** 1988. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc β 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:6157-6161.
- Kroll, J.S., I. Hopkins, y E.R. Moxon.** 1988. Capsule loss in *H. influenzae* type b occurs by recombination-mediated disruption of a gene essential for polysaccharide export. *Cell* **53**:347-356.
- Kroll, J.S., B. Loynds, L.N. Brophy, y E.R. Moxon.** 1990. The *bex* locus in encapsulated *Haemophilus influenzae*: a chromosomal region involved in capsule polysaccharide export. *Mol. Microbiol.* **4**:1853-1862.
- Kroll, J.S., B.M. Loynds, y E.R. Moxon.** 1991. The *Haemophilus influenzae* capsulation gene cluster: a compound transposon. *Mol. Microbiol.* **5**:1549-1560.
- Kroll, J.S., y E.R. Moxon.** 1988. Capsulation and gene copy number at the *cap* locus of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Bacteriol.* **170**:859-864.
- Kuhn, H.M., U. Meier-Dieter, y H. Mayer.** 1988. ECA, the enterobacterial common antigen. *FEMS Microbiol. Rev.* **54**:195-222.
- Laakso, D.M., M.K. Homonylo, S.J. Wilmot, y C. Whitfield.** 1988. Transfer and expression of the genetic determinants for O and K antigen synthesis in *Escherichia coli* O9:K(A)30 and *Klebsiella sp.* O1:K20 in *E. coli* K12. *Can. J. Microbiol.* **34**:987-992.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lazarevic, V., P. Margot, B. Soldo, y D. Karamata.** 1992. Sequencing and analysis of the *Bacillus subtilis* *lytRABC* divergon: a regulatory unit encompassing the structural genes of the *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and its modifier. *J. Gen. Microbiol.* **138**:1949-1961.
- Lee, C.-J.** 1987. Bacterial capsular polysaccharides-biochemistry, immunity and vaccine. *Mol. Immunol.* **24**:1005-1019.
- Lee, C.-J., y T.R. Wang.** 1994. Pneumococcal infection and immunization in children. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**:1-12.
- Lee, C.Y.** 1995. Association of staphylococcal type-1 capsule-encoding genes with a discrete genetic element. *Gene* **167**:115-119.

- Lee, C.Y. 1992. Cloning of genes affecting capsule expression in *Staphylococcus aureus* strain M. Mol. Microbiol. **6**:1515-1522.
- Lefevre, J.C., G. Faucon, A.M. Sicard, y A.M. Gasc. 1993. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. **31**:2724-2728.
- Leloir, L.F. 1956. The uridine coenzymes. En Proc. 3rd Intern. Congr. Biochem., Brussels, 1955. pp. 154-162. Academic Press. New York.
- Lieberman, M.M., A. Shaparis, y A. Markovitz. 1970. Control of uridine diphosphate-glucose dehydrogenase synthesis and uridine diphosphate glucuronic acid accumulation by a regulator gene mutation in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **101**:959-964.
- Liles, W.C., y W.C. van Voorhis. 1995. Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. J. Infect. Dis. **172**:1573-1580.
- Lin, W.S., T. Cunneen, y C.Y. Lee. 1994. Sequence analysis and molecular characterization of genes required for the biosynthesis of type 1 capsular polysaccharide in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **176**:7005-7016.
- Liu, H.H., y A. Tomasz. 1985. Penicillin tolerance in multiply drug-resistant natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. J. Infect. Dis. **152**:365-372.
- Lock, R.A., J.C. Paton, y D. Hansman. 1988. Comparative efficacy of pneumococcal neuraminidase and pneumolysin as immunogens protective against *Streptococcus pneumoniae* infection. Microb. Pathog. **5**:461-467.
- Loewus, F.A. 1952. Improvement in the anthrone method for determination of carbohydrates. Anal. Chem. **24**:219-
- López, R., J.L. García, E. Díaz, J.M. Sanz, J.M. Sánchez-Puelles, P. García, y E. García. 1993. Searching for the evolutionary design of the pneumococcal cell wall lytic enzymes. En M.A. de Pedro, J.V. Höltje, y W. Loeffelhardt (ed.), Bacterial growth and lysis. Metabolism and structure of the bacterial sacculus. pp. 253-259. Plenum Press. New York.
- López, R., J.L. García, E. García, C. Ronda, y P. García. 1992. Structural analysis and biological significance of the cell wall lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. FEMS Microbiol. Letters **100**:439-448.

- López, R., J.M. Sánchez-Puelles, E. García, J.L. García, C. Ronda, y P. García.** 1986. Isolation, characterization and physiological properties of an autolytic-deficient mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **204**:237-242.
- Low, B.** 1968. Formation of merodiploids in mating with a class of Rec⁻ recipient strains of *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**:160-163.
- Lowe, A.M., P.A. Lambert, y A.W. Smith.** 1995. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect. Immun.* **63**:703-706.
- Lund, E., y J. Henrichsen.** 1978. Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Methods Microbiol.* **12**:241-262.
- MacLeod, C.M., y M.R. Krauss.** 1947. Stepwise intratype transformation of pneumococcus from R to S by way of a variant intermediate in capsular polysaccharide production. *J. Exp. Med.* **86**:439-453.
- MacLeod, C.M., y M.R. Krauss.** 1950. Relation of virulence of pneumococcal strains for mice to the quantity of capsular polysaccharide formed *in vitro*. *J. Exp. Med.* **92**:1-9.
- MacLeod, C.M., y M.R. Krauss.** 1953. Control by factors distinct from the S transforming principle of the amounts of capsular polysaccharide produced by type III pneumococci. *J. Exp. Med.* **97**:767-771.
- Mäkela, P.H., y B.A.D. Stocker.** 1969. Genetics of polysaccharide biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* **3**:291-322.
- Male, C.J.** 1979. Immunoglobulin A1 protease production by *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **26**:254-261.
- Mallet, C.P., R.J. Boylan, y D.L. Everhart.** 1984. Complement antigen-binding fragment (Fab) from secretory immunoglobulin A using *Streptococcus sanguis* immunoglobulin A protease. *Caries Res.* **18**:201-208.
- Mandrell, R.E., M.A. Apicella, R. Lindstedt, y H. Leffler.** 1994. Possible interaction between animal lectins and bacterial carbohydrates. *Methods Enzymol.* **236**:231-254.
- Mansa, B., y M. Kilian.** 1986. Retained antigen-binding activity of Fab fragments of human monoclonal immunoglobulin A1 (IgA1) cleaved by IgA1 protease. *Infect. Immun.* **52**:171-174.

- Markovitz, A.** (1977). Genetics and regulation of bacterial capsular polysaccharide biosynthesis and radiation sensitivity. En I.W. Sutherland (ed.), Surface carbohydrates of the prokaryotic cell. pp. 415-462. Academic Press, London.
- Markovitz, A., J.A. Cifonelli, y A. Dorfman.** 1959. The biosynthesis of hyaluronic acid by group A *streptococcus*. VI. Biosynthesis from uridine nucleotides in cell-free extracts. J. Biol. Chem. **234**:2343-2350.
- Markovitz, A., y A. Dorfman.** 1962. Syntehsis of capsular polysaccharide(hyaluronic acid) by protoplast membrane preparations of group A *streptococcus*. J. Biol. Chem. **237**:273-279.
- Martin, B., G. Alloing, C. Boucraut, y J.P. Claverys.** 1989. The difficulty of cloning *Streptococcus pneumoniae mal* and *ami* loci in *Escherichia coli*: toxicity of *malX* and *amiA* gene products. Gene **80**:227-238.
- Martin, B., O. Humbert, M. Cámara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhome, G. Alloing, R. Hakenbeck, D.A. Morrison, G.J. Boulnois, y J.P. Claverys.** 1992. A Highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Nucleic Acids Res. **20**:3479-3483.
- McDaniel, L.S., J.S. Sheffield, P. Delucchi, y D.E. Briles.** 1991. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one serotype. Infect. Immun. **59**:222-228.
- Melchod, U., K. Steiner, S. Wettermann, y H. Malke.** 1993. Genetic organization of the streptokinase region in the *Streptococcus equisimilis* H46A chromosome. Mol. Gen. Genet. **241**:129-140.
- Melo, A., y L. Glaser.** 1965. The nucleotide specificity and feedback control of thymidine diphosphate D-glucose pyrophosphorylase. J. Biol. Chem. **240**:398-405.
- Mills, G.T.** 1960. Genetic and biochemical lesions of polysaccharide synthesis in the pneumococcus. Fed. Proc. **19**:991-995.
- Mills, G.T., A.C. Lochhead, y E.E.B. Smith.** 1958. Uridine pyrophosphoglycosyl compounds and the formation of glucuronides by isolated enzymes systems. Biochim. Biophys. Acta **27**:103-111.
- Mills, G.T., y E.E.B. Smith.** 1962. The biosynthesis of pneumococcal capsular polysaccharides. Biochem. J. **82**:38P-39P.

- Mills, G.T., y E.E.B. Smith.** 1965. Biosynthesis of capsular polysaccharides in the pneumococcus. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **47**:1751-1765.
- Mitchell, T.J., P.W. Andrew, F.K. Saunders, A.N. Smith, y G.J. Boulnois.** 1991. Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region homologous to a human acute phase protein. *Mol. Microbiol.* **5**:1883-1888.
- Moffatt, B.A., y F.W. Studier.** 1987. T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* **49**:221-227.
- Morona, J.K., A. Guidolin, R. Morona, D. Hansman, y J.C. Paton.** 1994. Isolation, characterization, and nucleotide sequence of IS1202, an insertion sequence of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **176**:4437-4443.
- Morrison, D.A.** 1978. Transformation in pneumococcus: protein content of eclipse complex. *J. Bacteriol.* **136**:548-557.
- Morrison, D.A., M.C. Trombe, M.K. Hayden, G.A. Waszack, y J.D. Chen.** 1984. Isolation of transformation-deficient *Streptococcus pneumoniae* mutants defective in control of competence, using insertion-duplication mutagenesis with the erythromycin-resistance determinant of pAM β 1. *J. Bacteriol.* **159**:870-876.
- Moxon, E.R., y J.S. Kroll.** 1990. The role of bacterial polysaccharides capsules as virulence factors. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **150**:65-85.
- Mufson, M.A.** 1990. *Streptococcus pneumoniae*. En G.L. Mandell, R. Douglas, y J.E. Benett (ed.), Principles and practice of infectious diseases. pp.1539-1550. Churchill Livingstone, New York.
- Navia, J.L., J. Riesenfeld, W.F. Vann, U. Lindahl, y L. Rodén.** 1983. Assay of *N*-acetylheparosan deacetylase with a capsular polysaccharide from *Escherichia coli* K5 as substrate. *Anal. Biochem.* **135**:134-140.
- Nester, E.W., C.E. Roberts, y M.T. Nester.** 1995. Microbiology. A human perspective. Wm. C. Brown. Pub., Dubuque, Iowa.
- Neu, H.C.** 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**:1064-1073.
- Nielsen, S.V., y J. Henrichsen.** 1992. Capsular types of *Streptococcus pneumoniae* isolated from blood and CSF during 1982-1987. *Clin. Infect. Dis.* **15**:794-798.
- Ørskov, F., y I. Ørskov.** 1990. The serology of capsular antigens. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **150**:43-64

- Ørskov, I., y K. Nyman. 1974. Genetic mapping of the antigenic determinants of two polysaccharide K antigens, K10 and K54, in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **120**:43-51.
- Osborn, M.J., J.E. Gander, E. Parisi, y J. Carson. 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol. Chem. **247**:3962-3972.
- O'Toole, R.D., L. Goode, y C. Howe. 1971. Neuraminidase activity in bacterial meningitis. J. Clin. Invest. **50**:979-985.
- Ottolenghi, E., y R.D. Hotchkiss. 1962. Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. J. Exp. Med. **116**:491-519.
- Ouchterlony, O., y L.A. Nilsson. 1973. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. En D.M. Weir (ed.), Handbook of experimental immunology, 2nd. ed. pp. 19-21. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Paton, J.C., B. Rowan-Kelly, y A. Ferrante. 1984. Activation of human complement by the pneumococcal toxin, pneumolysin. Infect. Immun. **43**:1085-1087.
- Paton, J.C., P.W. Andrew, G.J. Boulnois, y T.J. Mitchell. 1993. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: The role of pneumococcal proteins. Annu. Rev. Microbiol. **47**:89-115.
- Pavelka, M.S. Jr., L.F. Wright, R.P. Silver. 1991. Identification of two genes, *kpsM* and *kpsT*, in region 3 of the polysialic acid gene cluster of *Escherichia coli* K1. J. Bacteriol. **173**:4603-4610.
- Pavelka, M.S.Jr., S.F. Hayes, y R.P. Silver. 1994. Characterization of KpsT, the ATP-binding component of the ABC- transporter involved with the export of capsular polysialic acid in *Escherichia coli* K1. J. Biol. Chem. **269**:20149-20158.
- Pazzani, C., C. Rosenow, G.J. Boulnois, D. Bronner, K. Jann, y I.S. Roberts. 1993. Molecular analysis of region 1 of the *Escherichia coli* K5 antigen gene cluster: a region encoding proteins involved in cell surface expression of capsular polysaccharide. J. Bacteriol. **175**:5978-5983.
- Pearce, B.J., A.M. Naughton, y H.R. Masure. 1994. Peptide permeases modulate transformation in *Streptococcus pneumoniae*. Mol. Microbiol. **12**:881-892.
- Peng, H-L., y H-Y. Chang. 1993. Cloning of a human liver UDP-glucose pyrophosphorylase cDNA by complementation of the bacterial *galU* mutation. FEBS Lett. **329**:153-158.

- Perlman, D., y H.O. Halvorson.** 1983. A putative signal peptidase site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J. Mol. Biol.* **167**:391-409.
- Petit, C, G.P. Rigg, C. Pazzani, A. Smith, V. Sieberth, M. Stevens, G. Boulnois, K. Jann, y I.S. Roberts.** 1995. Region 2 of the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster encoding proteins for the biosynthesis of the K5 polysaccharide. *Mol. Microbiol.* **17**:611-620.
- Plaut, A.G.** 1983. The IgA1 proteases of pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**:603-622.
- Podvin, L., G. Reysset, J. Hubert, y M. Sebald.** 1988. Presence of choline in teichoic acid of *Clostridium acetobutylicum* NI-4 and choline inhibition of autolytic functions. *J. Gen. Microbiol.* **134**:1603-1609.
- Ponder, E.** 1928. The physical factors involved in phagocytosis. *Protoplasma* **3**:611.
- Ragheb, J.A., y R.P. Dottin.** 1987. Structure and sequence of a UDP-glucose pyrophosphorylase gene of *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* **15**:3891-3906.
- Rane, L., y Y. Subborow.** 1940. Nutritional requirements of the pneumococcus. 1. Growth factors for types I, II, V, VII, VIII. *J. Bacteriol.* **40**:695-704.
- Ravin, A.W.** 1959. Reciprocal capsular transformation of pneumococci. *J. Bacteriol.* **77**:296-309.
- Reeves, R.E., y W.F. Goebel.** 1941. Chemoimmunological studies on the soluble specific substance of pneumococcus. V. The structure of the type III polysaccharide. *J. Biol. Chem.* **139**:511-519.
- Rich, A.R., y C.M. McKee.** 1939. The pathogenicity of avirulent pneumococci for animals deprived of leukocytes. *Bull. J. Hopkins Hosp.* **64**:434-436.
- Robbins J.B., R. Austrian, C.J. Lee, S.C. Rastogi, G. Schiffman, J. Henrichsen, H.P. Mäkelä, C.V. Broome, R.R. Facklam, R.H. Tiesjema, y J.C. Parke.** 1983. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J. Infect. Dis.* **148**:1136-1159.
- Robbins, J.B.** 1978. Vaccines for prevention of encapsulated bacterial diseases: current status, problems and prospects for the future. *Immunochemistry* **15**:839-854.
- Roberts, I.S.** 1995. Bacterial polysaccharides in sickness and in health. *Microbiology* **141**:2023-2031.

- Roberts, I.S., F.K. Saunders, y G.J. Boulnois.** 1989. Bacterial capsules and interactions with complement and phagocytes. *Biochem. Soc. Trans.* **17**:462-464.
- Roberts, I.S., R. Mountford, N. High, D. Bitter-Suerman, K. Jann, K.N. Timmis, y G.J. Boulnois.** 1986. Molecular cloning and analysis of the genes for production of the K5, K7, K12 and K92 capsular polysaccharides of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**:1228-1233.
- Roberts, I.S., R. Mountford, R. Hodge, K. Jann, y G.J. Boulnois.** 1988a. Common organization of gene clusters for production of different capsular polysaccharides (K antigens) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:1305-1310.
- Roberts, M., I.S. Roberts, T.K. Korhonen, K. Jann, D. Bitter-Suerman, G.J. Boulnois, y P.H. Williams.** 1988b. DNA probes for K antigen (capsule) typing of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **26**:385-387.
- Rodríguez Sánchez-Beato, A.I.** 1995. Caracterización molecular de genes de *Clostridium acetobutylicum* y *Streptococcus pneumoniae* que codifican para proteínas con dominios de unión a colina. Tesis doctoral (Univ. Complutense de Madrid).
- Roitt, I., J. Brostoff, y D. Male.** 1986. *Inmunología*. Gower Medical Publishing Ltd., London.
- Ronda, C., J.L. García, E. García, J.M. Sánchez-Puelles, y R. López.** 1987. Biological role of the pneumococcal amidase. *Eur. J. Biochem.* **164**:621-624.
- Ronda, C., J.L. García, y R. López.** 1988. Characterization of genetic transformation in *Streptococcus oralis* NCTC 11427: expression of the pneumococcal amidase in *S. oralis* using a new shuttle vector. *Mol. Gen. Genet.* **215**:53-57.
- Rubens, C. E., L. Heggen, R.F. Haft, y M.R. Wessels.** 1993. Identification of *cpsD*, a gene essential for type III capsule expression in group B streptococci. *Mol. Microbiol.* **8**:843-855.
- Russell, H., J.A. Tharpe, D.E. Wells, E.H. White, y J.E. Johnson.** 1990. Monoclonal antibody recognizing a species-specific protein from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2191-2195.
- Russell, R.R.B., y J.J. Ferreti.** 1990. Nucleotide sequence of the dextran glucosidase (*dexB*) gene of *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* **136**:803-810.
- Sahn, F.** 1990. Pneumococcus and influenza. *Lancet* **335**:898-901.

- Saluja, S.K., y J.N. Weiser.** 1995. The genetic basis of colony opacity in *Streptococcus pneumoniae*: evidence for the effect of box elements on the frequency of phenotypic variation. *Mol. Microbiol.* **16**:215-227.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sampson, J.S., S.P. O'Connor, A.R. Stinson, J.A. Tharpe, y H. Russell.** 1994. Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported *Streptococcus sp.* adhesins. *Infect. Immun.* **62**:319-324.
- Sánchez-Puelles, J.M., C. Ronda, E. García, E. Méndez, J.L. García, y R. López.** 1986a. A new peptidoglycan hydrolase in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **35**:163-166.
- Sánchez-Puelles, J.M., C. Ronda, J.L. García, P. García, R. López, y E. García.** 1986b. Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur. J. Biochem.* **158**:289-293.
- Sánchez-Puelles, J.M., J.M. Sanz, J.L. García, y E. García.** 1990. Cloning and expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases. *Gene* **89**:69-75.
- Sanger, F., S. Nicklen, y A.R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
- Sanz, J.M., E. Díaz, y J.L. García.** 1992. Studies on the structure and function of the N-terminal domain of the pneumococcal murein hydrolases. *Mol. Microbiol.* **6**:921-931.
- Sau, S., y C.Y. Lee.** 1996. Cloning of type 8 capsule genes and analysis of gene clusters for the production of different capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**:2118-2126.
- Schiller, J.G., A.M. Bowser, y D.S. Feingold.** 1973. Partial purification and properties of UDPG dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **193**:1-10
- Shapiro, E.D., A.T. Berg, R. Austrian, D. Schroeder, V. Parcells, A. Margolis, R.K. Adair, y J.D. Clemens.** 1991. The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *N. Engl. J. Med.* **325**:1453-1460.
- Shibaev, V.N.** 1986. Biosynthesis of bacterial polysaccharide chains composed of repeating units. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **44**:277-339.

- Siber, G.R.** 1994. Pneumococcal disease: prospects for a new generation of vaccines. *Science* **265**:1385-1387.
- Sieberth, V., G.P. Rigg, I.S. Roberts, y K. Jann.** 1995. Expression and characterization of UDPGlc dehydrogenase (KfiD) which is encoded in the type-specific region 2 of the *Escherichia coli* K5 capsule genes. *J. Bacteriol.* **177**:4562-4565.
- Silhavy, T.J., M.L. Berman, y L.W. Enquist.** 1984. En Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Silver, R.P., C.W. Finn, W.F. Vann, W. Aaronson, R. Schneerson, P.J. Krestschner, y C.F. Garon.** 1981. Molecular cloning of the K1 capsular polysaccharide genes of *Escherichia coli*. *Nature* **289**:696-698.
- Silver, R.P., W. Aaronson, y W.F. Vann.** 1987. Translocation of capsular polysaccharides in pathogenic strains of *Escherichia coli* requires a 60-kilodalton periplasmic protein. *J. Bacteriol.* **169**:5489-5495.
- Silver, R.P., W.F. Vann, y W. Aaronson.** 1984. Genetic and molecular analysis of *Escherichia coli* K1 antigen gene. *J. Bacteriol.* **157**:568-575.
- Silverman, M.** 1991. Structure and function of hexose transporters. *Annu. Rev. Biochem.* **60**:757-794.
- Smith, E.E.B., G.T. Mills, y E.M. Harper.** 1957a. A comparison of the uridine pyrophosphoglycosyl metabolism of capsulated and non-capsulated pneumococci. *J. Gen. Microbiol.* **16**:426-437.
- Smith, E.E.B., G.T. Mills, y E.M. Harper.** 1957b. The isolation of uridine pyrophosphogalacturonic acid from a type I pneumococcus. *Biochim. Biophys. Acta* **23**:662-663.
- Smith, E.E.B., G.T. Mills, H.P. Bernheimer, y R. Austrian.** 1958a. The presence of an uronic acid epimerase in a strain of pneumococcus type I. *Biochim. Biophys. Acta* **29**:640-641.
- Smith, E.E.B., G.T. Mills, H.P. Bernheimer, y R. Austrian.** 1958b. The formation of uridine pyrophosphoglucuronic acid from uridine pyrophosphoglucose by extracts of a noncapsulated strain of pneumococcus. *Biochim. Biophys. Acta* **28**:211-212.
- Smith, E.E.B., B. Galloway, y G.T. Mills.** 1959a. The isolation of uridine pyrophosphorhamnose from two noncapsulated variants of pneumococcus type II. *Biochim. Biophys. Acta* **33**:276-277.

- Smith, E.E.B., G.T. Mills, H.P. Bernheimer, y R. Austrian.** 1959b. A study of some enzyme extracts of a non-capsulated strain of pneumococcus concerned with uridine pyrophosphoglycosyl metabolism. *J. Gen. Microbiol.* **20**:654-669.
- Smith, E.E.B., G.T. Mills, R. Austrian, y H.P. Bernheimer.** 1960a. Uridine pyrophosphoglucose dehydrogenase in capsulated and non-capsulated strains of pneumococcus type I. *J. Gen. Microbiol.* **22**:265-271.
- Smith, E.E.B., G.T. Mills, H.P. Bernheimer, y R. Austrian.** 1960b. The synthesis of type III pneumococcal capsular polysaccharide from uridine nucleotides by a cell-free extract of *Diplococcus pneumoniae* type III. *J. Biol. Chem.* **235**:1876-1880.
- Smith, E.E.B., B. Galloway, y G.T. Mills.** 1961a. The enzymic synthesis by a pneumococcal extract of a serologically reactive polymer from uridine diphosphate galacturonic acid. *Biochem. Biosphys. Res. Commun.* **4**:420-424.
- Smith, E.E.B., G.T. Mills, y H.P. Bernheimer.** 1961b. Biosynthesis of pneumococcal capsular polysaccharides. I. Properties of the system synthesizing type III capsular polysaccharide. *J. Biol. Chem.* **236**:2179-2182.
- Smith, E.E.B., y G.T. Mills.** 1962. Experiments on the biosynthesis of type I pneumococcal polysaccharide. *Biochem. J.* **82**:42P.
- Smith, E.E.B., y G.T. Mills.** 1966. Formation of type 3 pneumococcal capsular polysaccharide. *Methods Enzymol.* **VIII**:446-450.
- Smith, A.N., G.J. Boulnois, y I.S. Roberts.** 1990. Molecular analysis of the *Escherichia coli* K5 *kps* locus: identification and characterization of an inner-membrane capsular polysaccharide transport system. *Mol. Microbiol.* **4**:1863-1869.
- Smyth, C.J., y J.L. Duncan.** 1978. Thiol-activated (oxygen-labile) cytolysins. En J. Jeljaszewicz y T. Wadstrom (ed.), *Bacterial toxins and cell membranes*. pp.129-183. Academic Press. New York.
- Soldo, B., V. Lazarevic, P. Margot, y D. Karamata.** 1993. Sequencing and analysis of the divergon comprising *gtab*, the structural gene of UDP-glucose pyrophosphorylase of *Bacillus subtilis* 168. *J. Gen. Microbiol.* **139**:3185-3195.
- Sørensen, U.B.S., y J. Blom.** 1992. Capsular polysaccharide is linked to the outer surface of type 6A pneumococcal cell walls. *APMIS* **100**:891-893.

- Sørensen, U.B.S., J. Blom, A. Birch-Andersen, y J. Henrichsen. 1988. Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infect. Immun.* **56**:1890-1896.
- Sørensen, U.B.S., J. Henrichsen, H.C. Chen, y S.C. Szu. 1990. Covalent linkage between the capsular polysaccharide and cell wall peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae* revealed by immunochemical methods. *Microb. Pathog.* **8**:325-334.
- Speicher, D.W. 1994. Methods and strategies for the sequence analysis of proteins on PVDF membranes. *Methods* **6**:262-273.
- Spika, J.S., R.R. Facklam, B.D. Plikaytis, M.J. Oxtoby, y the Pneumococcal Surveillance Working Group. 1991. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *J. Infect. Dis.* **163**:1273-1278.
- Spratt, B.G. 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science.* **264**:388-393.
- Stanier, R.Y., J.L. Ingraham, M.L. Wheelis, y P.R. Painter. 1988. *Microbiología*. Ed. Reverté, S.A. Barcelona.
- Steinfort, C., R. Wilson, T. Mitchell, C. Feldman, A. Rutman, y cols. 1989. Effects of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium *in vitro*. *Infect. Immun.* **57**:2006-2013.
- Stevens, P., S.N.H. Huang, W.D. Welch, y L.S. Young. 1978. Restricted complement activation by *Escherichia coli* with the K-1 capsular serotype: a possible role in pathogenicity. *J. Immunol.* **121**:2174-2180.
- Stibitz, S., y T.L. Garletts. 1992. Derivation of a physical map of the chromosome of *Bordetella pertussis* Tohama I. *J. Bacteriol.* **174**:7770-7777.
- Stout, V., y S. Gottesman. 1990. RcsB and RcsC: a two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:659-669.
- Studier, F.W. 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* **219**:37-44.
- Sundararajan, T.A., A.M.C. Rapin, y H.M. Kalckar. 1962. Biochemical observations on *E. coli* mutants defective in uridine diphosphoglucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**:2187-2193.

- Sundberg-Kövamees, M., T. Holme, y A. Sjögren.** 1994. Specific binding of *Streptococcus pneumoniae* to two receptor saccharide structures. *Microb. Pathog.* **17**:63-68.
- Swank, R.T., y K.D. Munkres.** 1971. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.* **39**:462-477.
- Tabor, S.** 1990. Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system, unit 16.2. En F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl (eds.), *Current protocols in molecular biology*, Green Publishing Associates Inc. and John Wiley & Sons, N.Y.
- Tai, S.S., C.J. Lee, y R.E. Winter.** 1993. Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **61**:5401-5405.
- Taylor, H.E.** 1949. Additive effects of certain transforming agents from some variants of pneumococcus. *J. Exp. Med.* **89**:399-424.
- Thornsberry, C., J.K. Marler, y T.J. Rich.** 1992. Increased penicillin (Pen) resistance in recent U. S. isolates of *Streptococcus pneumoniae*, abstr. C-268. p. 465. *En Abstracts of the 92nd General Meeting of the American Society for Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Timmis, K.N., G.J. Boulnois, D. Bitter-Suerman, y F.C. Cabello.** 1985. Surface components of *Escherichia coli* that mediate resistance to the bactericidal activities of serum and phagocytes. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **118**:197-218.
- Tomasz, A.** 1967. Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in pneumococcus. *Science* **157**:694-697.
- Tomasz, A.** 1970. Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci: requirement for protein synthesis during induction of competence. *J. Bacteriol.* **101**:861-871.
- Tomasz, A.** 1981. Surface components of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev. Infect. Dis.* **3**:190-211.
- Tomasz, A., y S. Waks.** 1975. Mechanism of action of penicillin: triggering of pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:4162-4166.

- Tuomanen, E., A. Tomasz, B. Hengstler, y O. Zak.** 1985a. The relative role of bacterial cell wall and capsule in induction of inflammation in pneumococcal meningitis. *J. Infect. Dis.* **151**:535-540.
- Tuomanen, E., H. Liu, B. Hengstler, O. Zak, y A. Tomasz.** 1985b. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J. Infect. Dis.* **151**:859-868.
- Tuomanen, E.I., R. Austrian, y H.R. Masure.** 1995. Pathogenesis of pneumococcal infection. *N. Engl. J. Med.* **332**:1280-1284.
- Tzianabos, A.O., A.B. Onderdonk, B. Rosner, R.L. Cisneros, y D.L. Kasper.** 1993. Structural features of polysaccharides that induce intra-abdominal abscesses. *Science* **262**:416-419.
- Valla, S., D.H. Coucheron, E. Fjærviik, J. Kjosbakken, H. Weinhouse, P. Ross, D. Amikam, y M. Benziman.** 1989. Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: complementation of cellulose-negative mutants by the UDPG pyrophosphorylase structural gene. *Mol. Gen. Genet.* **217**:26-30.
- Vammen, B.** 1939. Serological variants of pneumococcus types 9 and 10. *J. Immunol.* **37**:359-365.
- van Dam, J.E.G., A. Fleer, y H. Snippe.** 1990. Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *A. van Leeuwenhoek* **58**:1-47.
- van de Rijn, I.** 1983. Streptococcal hyaluronic acid: proposed mechanisms of degradation and loss of synthesis during stationary phase. *J. Bacteriol.* **156**:1059-1065.
- van Oss, C.J., y C.F. Gillman.** 1973. Phagocytosis as a surface phenomenon: influence of C1423 on the contact angle and on the phagocytosis of sensitized encapsulated bacteria. *Immunol. Commun.* **2**:415.
- Vieira, J., y J. Messing.** 1982. The pUC plasmids a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**:259-268.
- Vimr, E.R.** 1991. Map position and genomic organization of the *kps* cluster for polysialic acid synthesis in *Escherichia coli* K1. *J. Bacteriol.* **173**: 1335-1338.
- Watson, D.A., V. Kapur, D.M. Musher, J.W. Jacobson, y J.M. Musser.** 1995. Identification, cloning, and sequencing of DNA essential for encapsulation of *Streptococcus pneumoniae*. *Curr. Microbiol.* **31**:251-259.

- Weissborn, A.C., Q. Liu, M.K. Rumley, y E.P. Kennedy. 1994. UTP: α -D-glucose-1-phosphate uridylyltransferase of *Escherichia coli*: isolation and DNA sequence of the *galU* gene and purification of the enzyme. *J. Bacteriol.* **176**:2611-2618.
- Wenger, J.D., A.J. Higtower, R.R. Facklam, S. Gaventa, C.V. Broome, and the Bacterial Meningitis Study Group. 1990. Bacterial meningitis in the United States, 1986: report of a multi state surveillance study. *J. Infect. Dis.* **162**:1316-1323.
- Wessels, M.R., A.E. Moses, J.B. Goldberg, y T.J. DiCesare. 1991. Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:8317-8321.
- Wessels, M.R., V. Pozsgay, D.L. Kasper, y H.J. Jennings. 1987. Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsular polysaccharide of type III group B *Streptococcus*. *J. Biol. Chem.* **262**:8262-8267.
- Whitfield, C., y M.A. Valvano. 1993. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **35**:135-246.
- Wierenga, R.K., P. Terpstra, y W.G.J. Hol. 1986. Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* **187**:101-107.
- Wilkinson, B.J., S.P. Sisson, Y. Kim, y P.K. Peterson. 1979. Localization of the third component of complement on the cell wall of encapsulated *Staphylococcus aureus* M: implications for the mechanism of resistance to phagocytosis. *Infect. Immun.* **26**:1159-1163.
- Winkelstein, J.A. 1981. The role of complement in the host's defence against *Streptococcus pneumoniae*. *Rev. Infect. Dis.* **3**:289-298.
- Winkelstein, J.A., J.A. Bocchini Jr., y G. Schiffman. 1976. The role of capsular polysaccharide in the activation of the alternative pathway by the pneumococcus. *J. Immunol.* **116**:367-370.
- Winkelstein, J.A., y A. Tomasz. 1978. Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal cell wall teichoic acid. *J. Immunol.* **120**:174-178.
- Wood, W.B., y M.R. Smith. 1949. The inhibition of surface phagocytosis by the capsular "slime layer" of pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* **90**:85-96.
- Xiang, S.H., M. Hobbs, y P.R. Reeves. 1994. Molecular analysis of the *rfb* gene cluster of a group D2 *Salmonella enterica* strain: evidence for its origin from an insertion sequence-

- mediated recombination event between group E and D1 strains. *J. Bacteriol.* **176**:4357-4365.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, y J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
- Yeung, M.K., y S.J. Mattingly.** 1986. Covalent linkage of the type- and group-specific antigens to the peptide moiety of the peptidoglycan of serotype III group B *Streptococcus*. *Curr. Microbiol.* **14**:205-211.
- Yother, J., L.S. McDaniel, y D.E. Briles.** 1986. Transformation of encapsulated *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **168**:1463-1465.
- Yother, J., y D.E. Briles.** 1992. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. *J. Bacteriol.* **174**:601-609.
- Zhou, L., F.M. Hui, y D.A. Morrison.** 1995. Characterization of IS1167, a new insertion sequence in *Streptococcus pneumoniae*. *Plasmid* **33**:127-138.
- Zigheboim, S., y A. Tomasz.** 1981. Multiple antibiotic resistance in South African strains of *Streptococcus pneumoniae*: mechanism of resistance to beta-lactam antibiotics. *Rev. Infect. Dis.* **3**:267-276.