



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

**Caracterització per HPLC dels perfils  
d'estructura/composició de la paret cel·lular  
(peptidoglicà) de soques de *Pseudomonas  
aeruginosa* procedents d'infecció aguda vs infecció  
crònica**

Maria Escobar Salom

**Grau de Bioquímica**

Any acadèmic 2017-18

Treball tutelat per Carlos Juan Nicolau

\*Departament de Biologia, Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Física, Química

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

*Pseudomonas aeruginosa*; Fibrosi quística; Bacterièmia; Peptidoglicà; Muropèptids; Cromatografia líquida d'alta resolució (High Performance Liquid Chromatography: HPLC).



# ÍNDIX

1. Resum.....	2
2. Introducció.....	4
2.1. Característiques generals de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	4
2.2. Importància clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	5
2.3. El paper de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en infecció crònica (fibrosi quística) vs infecció aguda (bacterièmia).....	7
2.3.1. Fisiopatologia de la fibrosi quística.....	7
2.3.2. Adaptacions diferencials de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a la infecció aguda vs crònica (fibrosi quística).....	9
2.4. Estructura del peptidoglicà a Gram negatiu.....	10
2.5. Adaptacions / modificacions del peptidoglicà a Gram negatiu. Implicacions inflamatòries.....	13
3. Objectiu.....	15
4. Materials i mètodes.....	16
5. Resultats i discussió.....	21
6. Conclusió.....	27
7. Referències.....	28

## 1. RESUM

*Pseudomonas aeruginosa* (PA) és un dels principals microorganismes causants de infeccions nosocomials, tant cròniques com podrien ser les que afecten als pulmons de pacients amb fibrosi quística (FQ), com infeccions agudes. S'ha suggerit en diferents treballs que PA, durant la FQ, sofreix una sèrie de modificacions o adaptacions (a través de la selecció de mutacions) útils per tal d'evadir el sistema immunològic de l'hoste i a més, altres que li confereixen resistència a determinats antibiòtics i/o avantatges metabòlics per sobreviure en un hàbitat tan particular. Totes aquestes condicions, un cop seleccionades, afavoririen la seva persistència crònica. Això fa pensar que, tot i que el peptidoglicà (PGN) de PA no es trobi en contacte directe amb l'hoste, degut a la membrana externa pròpia dels Gram negatius que el recobreix, aquest podria sofrir modificacions com a conseqüència de les esmentades adaptacions durant la FQ, que es pretenen visualitzar experimentalment mitjançant aquest treball. De fet, existeixen exemples a la bibliografia que recolzen la idea de que el PGN Gram negatiu no és una estructura immutable, sinó que es pot modificar en algunes espècies per millorar l'adaptació a l'hoste, idea que suporta la pertinència d'aquest treball.

Per analitzar l'estructura i la composició del PGN s'utilitza habitualment la tècnica HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), que permet separar els diferents components del PGN (muropeptids) en funció del temps de retenció. El temps de retenció obtingut per a cada fragment dins una mostra es compara amb bases de dades per correlacionar els fragments amb els temps de retenció de muropeptids coneguts, permetent així la seva identificació i quantificació. L'objectiu d'aquest treball va ser fer, mitjançant aquesta tècnica, un anàlisi descriptiu dels PGNs procedents de dues col·leccions de soques clíniques de PA [de infecció aguda (bacterièmia) vs crònica (FQ)], per tal de veure si existeixen diferències significatives en les característiques estructurals i de composició en comparar soques d'una i altra col·lecció. Addicionalment, es va voler comprovar si existien característiques diferencials en els PGNs d'aïllats de FQ obtinguts en una fase inicial del procés crònic en contraposició amb els d'aïllats tardans, potencialment reveladores d'adaptacions del PGN de PA al llarg de la FQ. A part d'aportar dades potencialment útils per entendre les diferents dinàmiques d'adaptació del PGN de PA, aquest treball té interès intrínsec ja que mai s'havia fet un estudi descriptiu del PGN de col·leccions tan àmplies de soques clíniques de PA.

A part de la llargària mitja de les cadenes glucídiques, no s'han observat diferències significatives entre els PGNs de les soques de infecció crònica i les de infecció aguda, i per tant sembla que no hi ha una tendència observable de modificació en el PGN de les mostres

de FQ lligada per exemple, a una baixa detecció immunològica o a una millora en l'adaptació a aquest tipus de infecció a lo llarg del temps. Per tant, aquest treball permet identificar al PGN de PA com una estructura molt estable dins les soques clíniques, a on rarament es veuen reflectides les diferents adaptacions que pot patir aquesta espècie. No obstant, cal destacar que s'han trobat canvis puntuals a determinades soques, que en el futur ens podrien permetre entendre millor l'adaptació del PGN de PA, i ajudar en la identificació de noves dianes terapèutiques.

## 2. INTRODUCCIÓ

### 2.1. Característiques generals de *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (PA) és un bacteri que pertany a la classe *Gamma Proteobacteria* i a la família *Pseudomonaceae*. És un bacil recte o lleugerament corbat, classificat com a Gram negatiu, i que per tant, consta d'una membrana externa i d'una membrana interna o citoplasmàtica, enmig de les quals es troba l'espai periplàsmic. A l'interior d'aquest últim és situa el peptidoglicà (PGN). Les cèl·lules de PA tenen una mida aproximada d'entre 2-4 x 0.5-1 µm i habitualment presenten un únic flagel polar (tot i que s'han aïllat soques que en presenten dos o més, i d'altres que no en presenten) que li confereix mobilitat. Es caracteritza per un metabolisme aerobi (tot i que pot desenvolupar-se en condicions anaeròbies amb l'ús de nitrat) i per un resultat positiu en les proves de la catalasa i l'oxidasa. És una espècie no formadora d'espores, que es caracteritza, en gran proporció de soques, per la producció de pigments com per exemple la piocianina (de color blau verdós), la pioverdina (que dóna fluorescència verda-groguenca quan s'il·lumina amb llum U.V.), la piorrubina (color vermell) o la piomelanina (marró). El creixement d'aquest bacteri es òptim a una temperatura de 37 °C; no obstant, al ser termotolerant sobreviu en un ampli rang de temperatures, des de 4°C, arribant a 45 °C – 50 °C.<sup>1</sup>

Les colònies de PA aïllades de mostres clíniques es caracteritzen, majoritàriament, per ser grans i tenir una olor dolça que recorda al raïm. Les colònies poden ser mucoses o més seques, i a més, com hem dit abans, poden presentar diferents coloracions gràcies a la síntesi de pigments, encara que també és relativament habitual aïllar soques no pigmentades. En determinats medis de cultiu, com el Sellers o el Muller-Hinton, també es pot observar la producció de fluoresceïna, que pot augmentar si la incubació es realitza entre 20-30 °C en comptes de 37 °C. Per identificar les soques de PA que no produeixen piocianina es solen detectar les següents característiques: creixement a 42 °C, alcalinització d'acetamina i desnitrificació de composts nitrogenats (nitrats i nitrits).<sup>2</sup>

PA és pràcticament ubiqüa: es pot trobar en l'ambient natural [sòl, diversitat d'aigües com rius, llacs, etc. (de fet, s'ha documentat que pot sobreviure fins a 70 dies en aigua destil·lada) i també a plantes i fruits], en l'ambient domèstic (banyeres, piques, dutxes, piscines, etc.) i en l'hospitalari (dispositius de ventilació mecànica, aparells de diàlisi, catèters, solucions de neteja, etc...). També es pot trobar en la microbiota normal sapròfita de les zones humides de la nostra pell (axil·les, mucoses, etc...), però amb baixa freqüència.

Com s'ampliarà en l'apartat següent, és extensament conegut que PA no sol causar infeccions en individus sans, la qual cosa la identifica com un típic patogen oportunista. En canvi, es considera una de les principals causes de infeccions nosocomials, i es pot transmetre per la ingestió d'aliments o aigua contaminats, per exposició a instrumental mèdic i solucions sanitàries contaminades, per mecanismes invasius (sondes, catèters, respiradors artificials) o lesions penetrants (intervencions quirúrgiques, cremades, etc...), així com per la disseminació entre pacients a través de les mans del personal assistencial. Dins l'ambient hospitalari sol afectar amb més freqüència a individus immunodeficients i/o ingressats a les UCIs, i pot donar lloc a una gran varietat de infeccions agudes: urinàries, de ferides, del torrent sanguini (bacterièmia), del sistema nerviós central, pneumònies, etc.. També és el típic causant de infecció respiratòria crònica en pacients amb malalties cròniques de base a l'aparell respiratori, com la fibrosi quística (FQ) o la malaltia pulmonar obstructiva crònica (EPOC).<sup>1,3</sup>

## **2.2. Importància clínica de *Pseudomonas aeruginosa***

PA és el patogen oportunista per excel·lència en humans gràcies, entre d'altres factors, a la seva capacitat d'adaptació i supervivència tant en la naturalesa com en els ambients humanitzats (entre els quals estan naturalment els hospitals), tant en superfícies inertes com en solucions aquoses o les mans del personal sanitari, per la qual cosa és un dels principals causants de infeccions nosocomials, constituint un greu problema clínic i epidemiològic. Aquestes infeccions es solen produir en pacients que estan sotmesos a ventilació mecànica, sondatge, tractament antibiòtic, quimioteràpia o cirurgia, tot i que el microorganisme també es pot adquirir en la comunitat i ser una font de infecció, encara que poc habitual.<sup>4</sup> A la comunitat, les infeccions solen ser de poca importància (com per exemple fol·liculitis), encara que ocasionalment poden ser més greus (diferents tipus d'otitis i al teixit ocular, com la queratitis severa, l'escleritis i l'endoftalmitis).<sup>4,5</sup>

Dins l'ambient hospitalari PA causa infeccions en pràcticament qualsevol part del cos que es trobi exposada a aquest microorganisme i en la majoria de casos el compromís en les defenses de l'hoste sol ser un factor de risc molt gran associat a la infecció per PA. Les principals infeccions que causa PA són en el tracte respiratori com la pneumònia associada amb la ventilació mecànica, o infeccions pulmonars cròniques com les associades a la FQ o la EPOC. PA també causa infeccions en el tracte urinari, les quals solen aparèixer en pacients hospitalitzats amb sonda urinària. Les infeccions oportunistes per PA també es donen en la pell o a parts blanques (cremades, ectima gangrenosa, ferides quirúrgiques, úlceres per posició, etc...). Desgraciadament, és habitual que una infecció oportunista aguda

localitzada com les esmentades, s'acabi estenent al torrent circulatori (bacterièmia), implicant elevades taxes de mortalitat.<sup>4,5</sup>

Aquesta àmplia varietat de infeccions que origina es deu al gran ventall de factors de virulència que PA produeix i a la seva gran capacitat d'adaptació a l'estrès, desenvolupant mecanismes de multi-resistència que fan que sigui un microorganisme molt difícil d'erradicar amb antibiòtics. Per això, la detecció del patogen en el moment més primerenc possible en malalties cròniques, en el que encara és més susceptible als antibiòtics, augmenta les probabilitats d'èxit del tractament.<sup>6</sup> Així doncs, a banda de les esmentades característiques en relació a la importància clínica, un dels trets que confereixen més rellevància a PA és la seva extraordinària capacitat per desenvolupar resistència als antibiòtics.

L'elevadíssima resistència intrínseca que PA presenta en front a un gran nombre d'antibiòtics limita el ventall de tractaments contra les infeccions que produeix. Així, entre les característiques que contribueixen a aquesta resistència intrínseca podríem destacar l'alta impermeabilitat de la membrana externa, que impedeix el pas de molècules grans i de molècules petites hidrofíliques, tot i que els  $\beta$ -lactàmics i les quinolones poden penetrar-la a través de canals aquosos constituïts per proteïnes conegudes com porines, de les quals la OprF i OprD són les que PA produeix en major nombre. A banda d'això, PA té altres mecanismes que contribueixen a aquesta resistència intrínseca, com per exemple les bombes d'eflux, que són un sistema que permet l'expulsió activa dels antibiòtics com tetraciclina, novobicina o trimetoprima entre d'altres, o la producció de la  $\beta$ -lactamasa AmpC que hidrolitza certs  $\beta$ -lactàmics conferint resistència contra ells.

Addicionalment, PA pot patir la selecció de mutacions a gens cromosòmics que causen una ampliació dels nivells intrínsecs de resistència. Aquestes mutacions, naturalment es veuran seleccionades positivament gràcies a la pressió selectiva que exerceix un tractament antibiòtic. Aquestes mutacions principalment poden traduir-se en la inactivació de porines com OprD (per la qual cosa l'entrada de l'antibiòtic serà menor), o en majors nivells d'expressió estable de les esmentades bombes d'eflux o d'AmpC.

Finalment, també és habitual a PA l'adquisició d'altres mecanismes de resistència no per selecció de mutacions sinó per via horitzontal, sobre tot de gens de  $\beta$ -lactamases o enzims modificants d'aminoglicòsids en plasmidis i/o transposons. Exemples d'aquestes  $\beta$ -lactamases són les carbapenemases de classe B (també denominades metal·lo- $\beta$ -lactamases), que requereixen cations divalents per a la seva activitat enzimàtica i poden ser inhibides per agents quelants com EDTA, o també les  $\beta$ -lactamases d'espectre estès (BLEE), que en conjunt conferirien resistència a pràcticament tots els  $\beta$ -lactàmics



disponibles, incloent penicilines, carbapenèmics, monobactàmics i cefalosporines de 3<sup>a</sup> i 4<sup>a</sup> generació.<sup>7</sup>

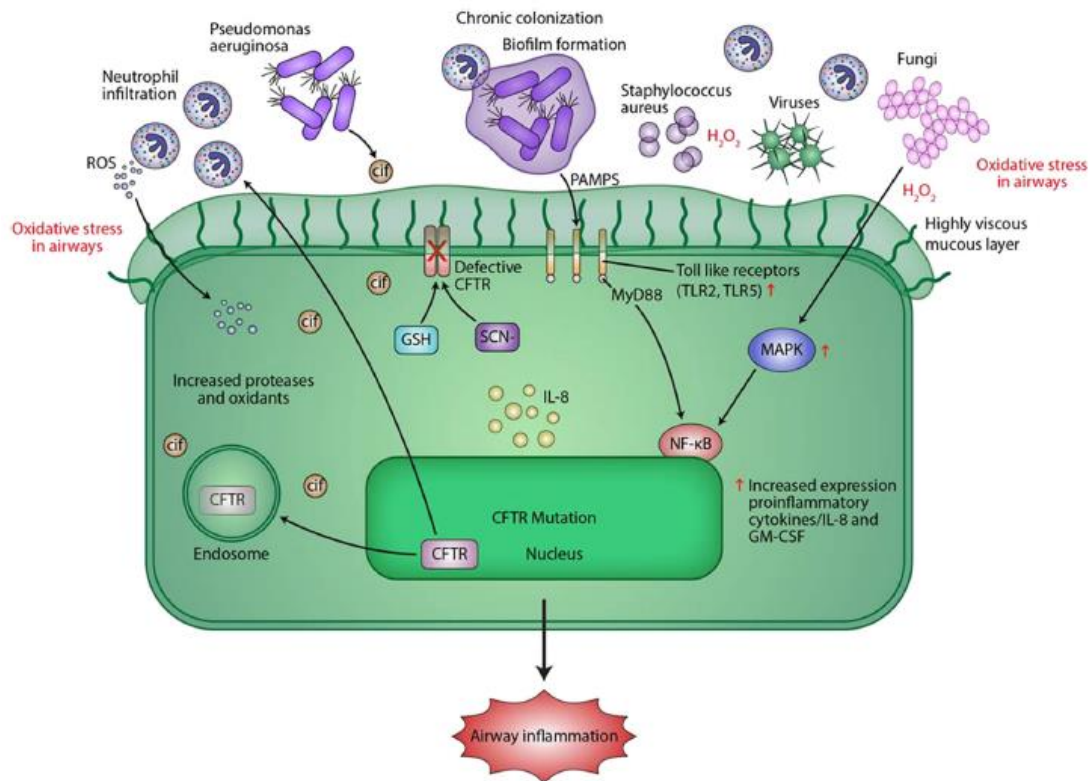
### **2.3. El paper de *Pseudomonas aeruginosa* a infecció crònica (fibrosi quística) vs infecció aguda (bacterièmia)**

#### **2.3.1. Fisiopatologia de la fibrosi quística**

La fibrosi quística (FQ) és una malaltia genètica d'herència autosòmica recessiva que es caracteritza per una mutació en el gen que codifica per a la proteïna CFTR (de l'anglès *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) originant una proteïna disfuncional. El gen es troba en el braç llarg del cromosoma 7 i consta de 27 exons. S'han trobat més de 2000 mutacions en pacients amb aquesta malaltia, tot i que la major part d'aquests presenten homozigosis per a la mutació Phe508del o almenys un al·lel amb aquesta. La proteïna per la que codifica el gen es troba en diversos teixits com els ronyons, el pàncrees, l'intestí, el cor, els vasos deferents i els pulmons. El CFTR és un membre de les *ATP-binding cassette* de la subfamília C (ABCC7), pel que aquest canal és dependent d'ATP i permet la regulació del transport dels electròlits com el potassi, el bicarbonat sòdic, el clor, etc... Quan CFTR es troba mutat impedeix el correcte transport de clor, originant secrecions cel·lulars defectuoses, incloent les secrecions digestives, la suor, però també el moc. Aquest es caracteritza als pacients amb FQ per tenir una osmolaritat i salinitat alterades, i una major densitat i espessor en els pulmons del pacient, el que confereix un medi idoni pel creixement de bacteris, concretament de PA, entre d'altres.<sup>8,9</sup> PA infecta més d'un 90% de pacients adults amb FQ, i pot sobreviure varies dècades en el tracte respiratori, casos en els que s'ha vist l'elevada freqüència de mutabilitat que té aquest bacteri, suggerint un vincle entre aquest fenotip i l'adaptació de PA en general i la resistència als antibiòtics en particular.<sup>6</sup>

La mencionada producció de mucosa més espessa i densa, la conseqüent interferència per al moviment dels cilis de l'epiteli essencial per a la expulsió mecànica, i la disminució de la capa de líquid que cobreix la superfície del tracte respiratori condueixen a la colonització microbiana per PA i altres espècies. Com es detallarà a continuació, en el context de la FQ, PA sol adquirir entre d'altres característiques, un estil de vida en biofilm, que és una matriu d'un polisacàrid produït pel propi bacteri (anomenat alginat), que conjuntament amb el moc, dificulten la difusió dels components del sistema immune. La constant activació del sistema immunitari, donada la incapacitat per eliminar PA, contribueix a la inflamació crònica de les vies respiratòries. Aquesta inflamació crònica es veu combinada amb episodis puntuals d'exacerbacions inflamatòries agudes degudes a un sobrecreixement bacterià, que

empitjoren molt la funció pulmonar i posen en perill la vida del pacient. Aquests fenòmens estan sustentats per una sèrie d'esdeveniments representats en la *Figura 1*.<sup>8</sup>



**Figura 1:** Resposta de les cèl·lules de l'epiteli respiratori en la FQ en front a l'adaptació de PA. Extret de: Bhagirath, A. Y. *et al.* Cystic fibrosis lung environment and Pseudomonas aeruginosa infection. *BMC Pulm. Med.* **16**, 174 (2016).<sup>8</sup>

Resumidament, aquests esdeveniments serien: els patrons moleculars associats a patògens (PAMPs: *Pathogen-associated molecular patterns*) de PA i altres espècies són reconeguts principalment pels receptors Toll (TLR: *Toll-like receptor*) induint la producció de la interleuquina-8 (IL-8), i altres citocines pro-inflamatòries, que condueixen al reclutament de neutròfils. L'acumulació de neutròfils, incapaços d'accedir a PA degut al moc i alginat que el protegeixen, i l'exocitosis dels productes antimicrobians dels seus grànuls, originen un estat d'estrès oxidatiu: augment de la concentració d'espècies reactives d'oxigen (ROS, la funció dels quals seria inicialment microbicida), que són tòxiques per l'epíteli pulmonar, i que estimulen la via de la proteïna quinasa originant una retroalimentació positiva activant la producció de IL-8 per part del teixit i reclutant més neutròfils. El dèficit de funció del CFTR impedeix el correcte funcionament dels antioxidants glutatió (GSH) i tiocinat (SCN), pel que no es pot contrastar l'estrès oxidatiu generat. En conjunt, tots aquests esdeveniments contribueixen a la inflamació crònica, que té un paper molt important en la patologia de la infecció per PA a la FQ, conjuntament amb la pròpia acció nociva dels factors de virulència del patogen (*Figura 1*).<sup>8</sup>

### 2.3.2. Adaptacions diferencials de *Pseudomonas aeruginosa* a la infecció aguda vs crònica (fibrosi quística)

Les soques de PA produeixen una àmplia sèrie de factors de virulència (lipopolisacàrid, pili, flagel, sideròfors, proteases, etc...) entre els quals destaquen els sistemes de secreció de toxines, que són necessaris per iniciar la infecció aguda, com és el cas de la bacterièmia, i que causen danys ràpidament en els teixits i als leucòcits de l'hoste. No obstant, aquests factors de virulència semblen atenuar-se (és a dir, deixen d'expressar-se o s'expressen en menor mesura gràcies a la selecció de mutacions) en una situació crònica com la FQ, es suposa que per tal d'aconseguir un menor nivell d'activació del sistema immune de l'hoste i així poder persistir en convivència amb aquest. També s'ha proposat que la pèrdua o determinades modificacions de certs PAMPs mitjançant mutació, els quals actuen com a lligands per a certs components immunes, també estarien positivament seleccionades degut a que aquests mateixos patrons moleculars també són lligands de determinats antibiòtics. Així, en presència de pressió selectiva per tractament antibiòtic, les mutacions seleccionades conferirien simultàniament, resistència a aquests antibiòtics i menor immunogènecitat.<sup>10</sup> Cal recalcar que a banda de mutacions que confereixen resistència a antibiòtics o menor capacitat d'activació del sistema immune, PA també selecciona, al llarg del temps, mutacions que milloren el seu rendiment metabòlic en un ambient tan particular com el descrit per al pulmó amb FQ: elevada salinitat i osmolaritat, baixa difusió de nutrients i gasos, alta presència de ROS, etc..., situació en la qual també pareix interessant la selecció de mutacions que condueixin a l'estalvi energètic, com per exemple, deixar d'expressar certs factors de virulència, o la mobilitat flagel·lar.

Les diferents modificacions que PA sofreix per adaptar-se a aquest nínxol ecològic tan concret de la infecció crònica al pulmó amb FQ (causades per mutacions puntuals en el genoma) afecten principalment a gens de virulència disminuint la seva funció, conduint, entre d'altres, a un descens en l'activació immunitària, i per tant, a una baixada en la capacitat inflamatòria. Entre aquestes mutacions/adaptacions trobam<sup>11</sup>:

- Modificació de reguladors de la biosíntesi de l'alginat conduint a una sobreproducció d'aquest. L'alginat és un component essencial per la formació, el manteniment i la propagació de biofilms, com s'ha esmentat. Les soques híper-productores d'alginat acaben mostrant morfologia i aspecte mucoides. L'alginat s'ha descrit com una barrera física, juntament amb el moc del pacient, per a la difusió d'antibiòtics i components immunes.<sup>12</sup>
- Mutacions en gens implicats en la modificació del lipopolisacàrid (LPS), que milloren la resistència a certs antibiòtics, a canvi de disminuir la resistència en front a la

cascada del complement o a anticossos, que difonen molt pobrament a través del moc i alginat.

- Disminució o falta de la motilitat (pèrdua del flagel), lo qual que sembla dificultar la fagocitosi.
- Pèrdua d'expressió de pigments.
- Defectes en la regulació del *quorum-sensing*: com podria ser mitjançant la inactivació del gen *lasR*, que és el principal regulador d'aquest *quorum-sensing* i de l'expressió de funcions invasives, pel que es condueix a que el bacteri sigui deficitari en aquesta característica.
- Defectes en la biosíntesi de certs components del T3SS (*Type III secretion System*): Sistemes de secreció que formen canals entre la doble membrana del bacteri fins a la membrana de la cèl·lula hoste permetent el transport de toxines i actuant així com un dels principals factors de virulència.<sup>13</sup>
- Aparició de soques de creixement lent, també anomenades *small colony variants* o colònies puntiformes, que milloren la seva resistència a certs antibiòtics i s'adapten millor a la pobresa de nutrients.
- Mutacions que condueixen a la pèrdua de porines, o a la hiperproducció de les bombes d'eflux i/o AmpC, millorant la resistència a certs antibiòtics.
- Modificació estructural dels PAMPs, fent que siguin menys detectables per l'hoste.
- Mutacions en el sistema de reparació d'errors del DNA (*Mismatch Repair System*, MMR), que condueix a una major taxa de mutació general (soques híper-mutadores). La híper-mutació funciona com a força impulsora de l'aparició de la resta de mutacions recent esmentades, i a la vegada, està mediada per la selecció de mutacions al MMR, conformant un cicle viciós que sembla millorar l'adaptació crònica a la FQ.

En contraposició a totes aquestes adaptacions, les soques de bacterièmia solen ser plenament virulentes, ja que el context d'una infecció aguda seria incompatible amb la selecció de mutacions que conduïssin a l'atenuació dels mecanismes de patogenicitat. Així, una soca atenuada pròpia de FQ, probablement seria inviable com a causant d'una infecció aguda, ja que el sistema immune la eliminaria abans de poder créixer i disseminar-se per l'hoste.<sup>8,14</sup>

#### **2.4. Estructura del peptidoglicà a Gram negatius**

El peptidoglicà (PGN) és una macromolècula que es troba en l'espai periplàsmic en la part exterior de la membrana citoplasmàtica, sent un component essencial de la paret cel·lular dels Gram negatius. Per tant, a diferència del PGN dels Gram positius, més gruixat i

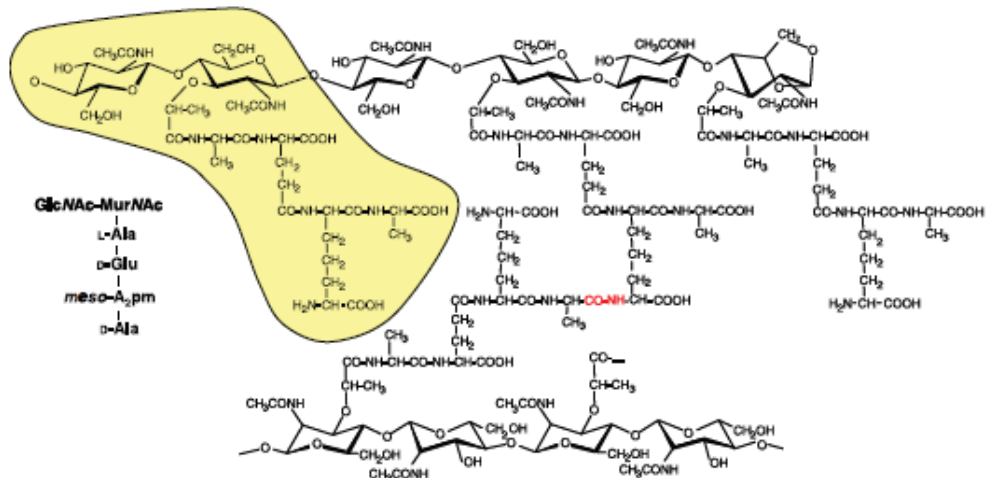
exposat, el PGN Gram negatiu és més prim i es troba protegit per la membrana externa i el LPS. Sembla que té una composició bastant específica per a cada gènere bacterià, però amb cert grau de variabilitat entre soques, fet que volem investigar en aquest estudi a PA.<sup>14</sup>

Té diverses funcions, totes essencials per a la viabilitat bacteriana<sup>14</sup>:

- La seva funció principal és mantenir la integritat de l'estructura i la paret cel·lular (incloent el LPS), raó per la qual els elements que inhibeixen la seva síntesi o duen a terme la seva degradació (com els antibiòtics  $\beta$ -lactàmics o la liozima) conduiran a la lisi cel·lular.
- Definir la forma cel·lular i permetre resistir la pressió osmòtica i les variacions d'aquesta al medi natural, aportant també cert grau de resistència a la permeabilitat de certes molècules.
- Permetre l'ancoratge d'altres components de la cèl·lula, com per exemple lipoproteïnes (Braun's lipoprotein o Lpp) que uneixen el PGN a la membrana externa.
- Participació als processos de creixement i divisió cel·lular.

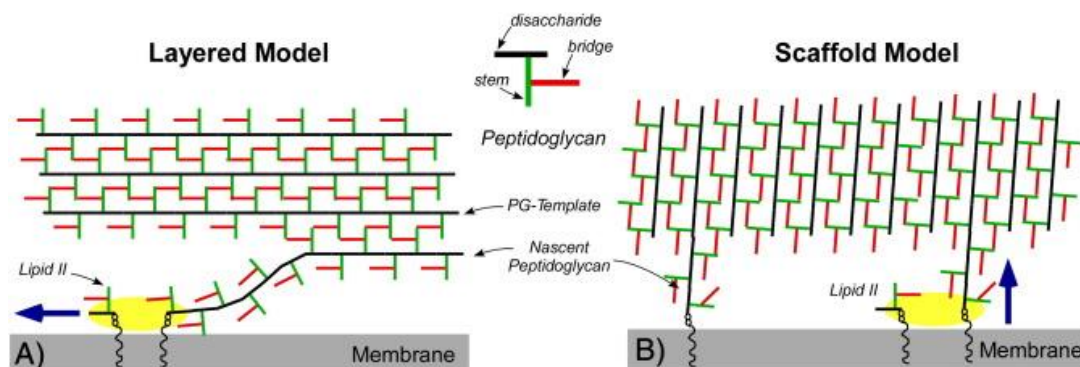
El PGN consta d'una estructura bàsica (*Figura 2*) de cadenes glucídiques lineals formades per repeticions del disacàrid N-acetilglucosamina-N-acetilmuràmic (GlcNAc-MurNAc) i un pentapèptid unit al MurNAc, element que es coneix com a unitat monomèrica del PGN. Aquests monòmers són sintetitzats al citosol i són importats al periplasma per incorporar-se al PGN pre-existent mitjançant reaccions que duen a terme uns enzims denominats Penicillin Binding Proteïns (PBPs). En sentit contrari, el PGN es va degradant a través de la ruptura de determinats enllaços dins o entre els citats monòmers durant el creixement bacterià i, sobre tot, per permetre la divisió cel·lular, permetent així la seva necessària remodelació. Tornant a l'estructura bàsica, la unió entre el residu de GlcNAc i el residu de MurNAc és mitjançant un enllaç  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4. Al MurNAc es troba unit inicialment un pentapèptid que sol estar format per L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-DAP-D-Ala-D-Ala (DAP, àcid meso-diaminopimèlic). Les cadenes de disacàrids lineals es troben unides unes a les altres mitjançant aquests pèptids laterals, majoritàriament gràcies a enllaços que es produeixen entre el grup D-amino del DAP d'un monòmer i el grup carboxil terminal del residu D-Ala en posició 4 de l'altre muropèptid (d'una altra cadena glucídica). Perquè es dugui a terme aquesta unió, anomenada *cross-linking* o també trans-peptidació (duta a terme per les PBPs a través de la seva activitat trans-peptidasa) és necessari partir de pentapèptids, ja que durant el procés, l'enllaç entre D-Ala-D-Ala es romp (activitat carboxipeptidasa també duta a terme per les PBPs) i el darrer residu D-Ala s'escindeix. Per tant, a partir d'un tetrapèptid no es podrà donar aquesta trans-peptidació. No obstant, en algunes circumstàncies sembla que es pot

dur a terme el *cross-linking* DAP-DAP, entre el grup L-carboxil d'un DAP i el grup D-amino de l'altre.



**Figura 2:** Estructura bàsica del PGN a Gram negatius on es pot veure, destacat en color groc, la unitat monomèrica de les cadenes glucídiques esmentada abans (conformada pel disacàrid GlcNAc-MurNAc i el pentapèptid unit a MurNAc) i, en color vermell, l'enllaç resultant de la trans-peptidació mediada per les PBP. Extret de: Vollmer, W., Blanot, D. & De Pedro, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 149–167 (2008).<sup>14</sup>

Encara que existeixen diversos models en quant a les capes que conformen el PGN i l'orientació de les cadenes glucídiques i peptídiques laterals, el model més acceptat és el que defineix al PGN com una estructura amb poques capes superposades (3-5 per a *E. coli*, per exemple) de cadenes glucídiques, com es pot observar en la *Figura 3* (A), amb regions puntuals a on el gruix de capes es pot veure augmentat<sup>14,15,16</sup>



**Figura 3:** Models d'orientació de les cadenes glucídiques i peptídiques laterals que conformen el PGN. El model representat en la part esquerra de la figura és el més acceptat. Extret de: Kim, S. J., Chang, J. & Singh, M. Peptidoglycan architecture of Gram-positive bacteria by solid-state NMR. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1848**, 350–362 (2015).<sup>16</sup>

## 2.5. Adaptacions / modificacions del peptidoglicà a Gram negatius. Implicacions inflamatòries

El PGN dels Gram negatius, donada la seva menor gruixa, i sobretot, el fet d'estar protegit per la membrana externa i el LPS, és una estructura que clàssicament s'ha infravalorat en quant a la seva interacció amb l'hoste (incloent implicacions inflamatòries, de resistència front a lisozima, complement, entre altres), en contraposició amb el PGN dels Gram positius.<sup>17</sup> No obstant això, s'ha vist durant els darrers anys que el PGN Gram negatiu sí que es troba biològicament actiu i que és capaç d'alliberar fragments que promouen la reacció inflamatòria, estimulants també el sistema immune innat a través de receptors específics, a banda de tenir altres implicacions relacionades amb l'hoste i la patogènesi.<sup>18</sup>

En aquest context, per tant, es poden citar una sèrie d'exemples, incloent potencials modificacions del PGN per a una millor adaptació a l'hoste, entre els quals podem destacar:

El cas de *Bordetella pertussis*, que allibera un conjunt de fragments solubles del PGN, entre els quals destaca la citotoxina traqueal (disacàrid-tetrapèptid) que promou danys a l'epiteli respiratori ciliat. Aquests danys es veuen relacionats amb la producció i alliberació excessiva de la interleuquina-1, factor pro-inflamatori que acaba sent perjudicial pel propi hoste i sent un dels factors inductors de la citopatologia de la tos ferina.<sup>19,20</sup> Aquest mecanisme d'alliberació de fragments solubles del PGN durant el creixement també s'ha observat en *Neisseria gonorrhoeae*.<sup>21,22</sup> Un altre possible exemple és el cas de *Salmonella enterica*, que en presència d'una concentració subletal de desoxicolat de sodi (l'àcid desoxicòlic és un àcid biliar) selecciona certs canvis en l'estructura del PGN que condueixen a una reducció de la unió de la Lpp al PGN i menor incidència d'enllaços entrecruats DAP-DAP. Aquests canvis pareix que augmenten la resistència del bacteri a la bilis, i s'ha observat que un mutant *knock-out* (K.O.) pels gens *YbiS*, *ErfK* i *YcfS*, que codifiquen per enzims que participen en la formació d'enllaços amb Lpp i/o DAP-DAP, és híper-resistent a la bilis. Per tant, sembla clar que la remodelació de la paret cel·lular és una de les respostes adaptatives que permeten la supervivència de *S. enterica* en presència de bilis.<sup>23</sup>

Els Gram negatius poden evadir la resposta antibacteriana de l'hoste mitjançant una varietat de mecanismes, entre els quals podem trobar la resistència a enzims lítics de l'hoste, com la lisozima. *Helicobacter pylori* té diversos enzims implicats en la resistència a la lisozima, com la N-desacetilasa o la O-acetiltransferasa (codificada per *patA*). En l'estudi realitzat per Wang i altres s'ha vist que les soques que expressen aquest gen tenen una quantitat reduïda de muropèptids acetilats, la qual cosa s'associà amb una pobra activitat de la lisozima. En canvi, el mutant K.O. per dos enzims de modificació de PGN, *pgdA* i el

mencionat *patA*, demostrà una alta sensibilitat a la lisozima, pel que es dedueix que protegeixen el bacteri de la degradació a través de diferents activitats de modificació del PGN.<sup>24</sup> En altres espècies com *Campylobacter jejuni* també s'han vist modificacions en el PGN com l'acumulació de O-acetilació d'aquest com a mecanisme adaptatiu.<sup>25</sup>

Finalment, cal destacar l'estudi realitzat per Cigana i altres<sup>26</sup> en el que s'analitza l'activitat biològica dels PAMPs en un aïllat primerenc i un aïllat tardà del mateix clon de PA d'un pacient amb FQ. Els seus resultats mostren com aquesta soca concreta de PA, a través de modificacions en el lípid A i la seva composició de muropèptids del PGN, és capaç d'evadir la detecció per part del sistema immune, disminuint la resposta inflamatòria de l'hoste, per així persistir en la infecció crònica. El nostre treball no es basarà en un únic aïllat, sinó en dues col·leccions molt més àmplies, permetent arribar a una conclusió sobre si això només va ocórrer en la soca aïllada en l'estudi esmentat o és un mecanisme generalitzat com a mètode d'adaptació de PA.

Per tant, podem concloure que el PGN dels Gram negatius no és una estructura immutable, sinó capaç de patir una sèrie de modificacions per adaptar-se al medi. La coneguda capacitat d'adaptació de PA en la infecció crònica, i la capacitat observada d'adaptació del PGN en diferents ambients condueix a realitzar-se el plantejament d'aquest treball: la possibilitat de que certs canvis en l'estructura/composició del PGN regulessin l'adaptació de PA en un ambient tan característic com el de la infecció crònica de FQ.



### **3. OBJECTIU**

Donades les evidències que s'acaben d'enumerar, en quant a la capacitat que té PA per adaptar-se a diferents nínxols, però també en quant a la potencialitat que té el PGN Gram negatiu per patir modificacions adaptatives (incloent implicacions inflamatòries), sembla lògic pensar que el PGN de PA podria ser susceptible d'albergar canvis que condueixin a una millor adaptació del bacteri en funció del tipus d'infecció.

Per comprovar aquesta idea, l'objectiu del treball va ser fer un anàlisi descriptiu de la composició i l'estructura del PGN en dues àmplies col·leccions de soques de PA aïllades en infeccions agudes (bacterièmia) vs infeccions cròniques (FQ) mitjançant HPLC. Això ens podria ajudar a comprendre l'adaptació que sofreix PA en front a l'hoste / nínxol ocupat i observar si hi ha diferències significatives en les característiques del PGN en comparar els diferents tipus de infecció, aguda i crònica, i inclús, si existeixen tendències en la modificació del PGN al llarg del temps en el procés crònic, al comparar aïllats inicials vs tardans procedents de la col·lecció de FQ.

## 4. MATERIALS I METODOLOGIA

### Soques bacterianes utilitzades

Per a la realització del treball es van utilitzar dues col·leccions de soques de PA, una de 12 parelles d'aïllats procedents de 10 pacients amb FQ (per tant, de 2 dels pacients es varen obtenir dues parelles d'aïllats), i una segona col·lecció de 12 aïllats de pacients amb bacterièmia. Ambdues col·leccions havien estat descrites en treballs previs.<sup>27,28</sup>

Les 12 parelles d'aïllats de la col·lecció de FQ es van obtenir de la següent forma: un dels aïllats es va obtenir en un estat primerenc o inicial del procés crònic, i el segon, en un estat tardà de cada pacient. Així, l'interval de temps que passà entre l'obtenció de la mostra inicial i la tardana varia segons la parella en un interval des de 3 fins a 8 anys (aquest interval concret es pot veure a la data d'aïllament de cada mostra a la *Taula 1*). La tècnica PFGE (electroforesis en gel de camp polsat) va permetre identificar 9 clons diferents entre totes les parelles, dels quals un (el clon FQSE-A) es trobà disseminat en quatre pacients diferents (veure *Taula 1*). D'aquesta forma, cada parella d'aïllats constituïa un llinatge clonal en cada cas, el que va permetre la comparació entre inicials-tardans a cada parella per analitzar potencials adaptacions del PGN a lo llarg de la infecció crònica.<sup>27</sup>

La col·lecció de soques de pacients amb bacterièmia prové d'un estudi multicèntric realitzat a Espanya durant els anys 2008 i 2009<sup>28</sup>. Igual que a l'altre col·lecció, la relació clonal es realitzà mitjançant PFGE, que va revelar que cada aïllat pertanyia a un clon diferent (veure *Taula 2*).

Tant a la *Taula 1* com a la *Taula 2* també es mostra a quin ST (*Sequence type*) pertanyia cada mostra. Aquest paràmetre ve definit per la tècnica MLST (*Multi Locus Sequence Typing*), que permet classificar les soques en funció de llinatges epidèmics de distribució planetària, i sol ser menys discriminatòria que el PFGE.

També s'utilitzaren les soques PAO1 i PA14, soques tipus de PA àmpliament usades a la bibliografia, com a referència.

**TAULA 1:** Parelles d'aïllats procedents dels pacients amb FQ.

<b>Parelles d'aïllats (PACIENT)</b>	<b>Denominació</b>	<b>Data d'aïllament</b>	<b>Clon PFGE</b>	<b>ST</b>
<b>05</b>	FQSE05-0403	04-2003	FQSE-E	1108
	FQSE05-0111	01-2011	FQSE-E	1108
<b>06</b>	FQSE06-0403	04-2003	FQSE-A	274
	FQSE06-0610	06-2010	FQSE-A	274
<b>10</b>	FQSE10-0503	05-2003	FQSE-A	274
	FQSE10-0111	01-2011	FQSE-A	274
<b>11</b>	FQSE11-0603	06-2003	FQSE-K	701
	FQSE11-1010	10-2010	FQSE-K	701
<b>12</b>	FQSE12.299-0603	06-2003	FQSE-C	299
	FQSE12.299-1206	12-2006	FQSE-C	299
<b>12</b>	FQSE12.146-1007	10-2007	FQSE-B	146
	FQSE12.146-1110	11-2010	FQSE-B	146
<b>15</b>	FQSE15-0803	08-2003	FQSE-A	274
	FQSE15-0110	01-2010	FQSE-A	274
<b>16</b>	FQSE16-0803	08-2003	FQSE-M	1073
	FQSE16-0710	07-2010	FQSE-M	1073
<b>21</b>	FQSE21.1088-1003	10-2003	FQSE-H	1088
	FQSE21.1088-0410	04-2010	FQSE-H	1088
<b>21</b>	FQSE21.1109-0505	05-2005	FQSE-I	1109
	FQSE21.1109-1110	11-2010	FQSE-I	1109
<b>24</b>	FQSE24-0304	03-2004	FQSE-A	1089
	FQSE24-1010	10-2010	FQSE-A	1089
<b>28</b>	FQSE28-1006	10-2006	FQSE-J	1071
	FQSE28-1110	11-2010	FQSE-J	1071

**TAULA 2:** Aïllats procedents dels pacients amb bacterièmia.

<b>Identificació</b>	<b>Clon PFGE</b>	<b>ST</b>
<b>12</b>	PAMB-12	175
<b>19</b>	PAMB-19	111
<b>28</b>	PAMB-28	244
<b>37</b>	PAMB-37	699
<b>43</b>	PAMB-43	175
<b>48</b>	PAMB-48	319
<b>63</b>	PAMB-63	446
<b>100</b>	PAMB-100	1113
<b>120</b>	PAMB-120	1114
<b>142</b>	PAMB-142	1178
<b>181</b>	PAMB-181	385
<b>211</b>	PAMB-211	111

Per a l'obtenció del PGN aïllat i preparat per l'anàlisi mitjançant HPLC que s'explica en els següents apartats es va seguir el protocol descrit per Ropy i col·laboradors.<sup>29</sup> Per a cada mostra es varen fer 3 aïllaments de PGN independents, i de cada un es va determinar la composició per HPLC. A l'apartat de resultats es mostren, per a cada paràmetre, les mitges dels 3 valors obtinguts per a cada aïllat de PA.

### **Cultiu bacterià**

Es va realitzar un pre-inocle per a cada soca, en 10mL de medi LB, i es va incubar *overnight* en agitació a 37°C. Al dia següent es va fer una dilució 1:100 per un volum total de 250mL de medi de cultiu, en un matrau de 1 L. Aquest nou cultiu es va deixar créixer a 37 °C en agitació fins obtenir una D.O. (600nm) entre 0.75-0.9 (fase exponencial). Llavors es va centrifugar a 2000 g per obtenir el *pellet* de PA, descartant el sobrenedant.

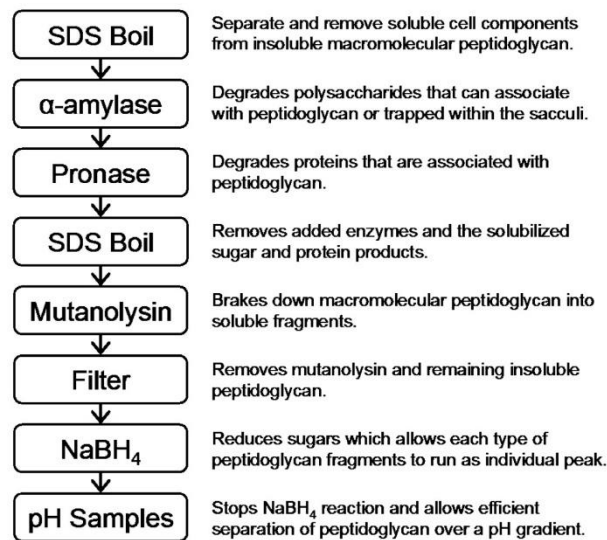
### **Obtenció del PGN**

Per obtenir el PGN es va seguir el protocol descrit per Ropy i col·laboradors.<sup>29</sup> Breument, es va resuspendre el mencionat *pellet* amb 5 mL d'aigua destil·lada i es va mesclar amb 5 mL de SDS 20% i es va incubar de 2 a 4 hores en tubs submergits en aigua bullint, i en agitació gràcies a un imant dins cada tub. Aquest detergent ens permet lisar les membranes, però no lisa el PGN, pel que permet aïllar-lo. Passat aquest temps, es va comprovar que la mostra estava completament cristal·lina (la qual cosa indica la lisi total de les cèl·lules), i es va depositar en tubs especials d'ultracentrifuga (30 mL de volum, aproximadament). Llavors es va centrifugar amb la ultracentrifuga (Beckman Coulter Optima L-100 XP), per fer precipitar el PGN (també conegut com a sàcul de mureïna) amb el rotor 70Ti a 180000 g durant 30' a temperatura ambient. Es va descartar el sobrenedant i es van fer dos rentats addicionals del *pellet* amb H<sub>2</sub>O destil·lada (30 mL aprox. a cada un), fent una resuspensió final en 500 µL de Tris-HCl 10mM, 0.06% de NaCl, pH=7.2.

Seguidament es varen fer una sèrie de digestions (esquematitzat en la *Figura 4*) amb diferents enzims que ens van permetre preparar la mostra de PGN per analitzar-la mitjançant HPLC. Primer es realitzà la digestió amb la α-amilasa (concentració final 100 µg/mL) a 37 °C durant 90 minuts (per eliminar contaminants glucídics) i llavors amb la pronasa-E (prèviament activada per incubació a 60° 30 minuts, concentració final 100 µg/mL) a 60 °C durant 60 minuts (per eliminar contaminants proteics). Aquestes digestions es van aturar afegint 0.4 mL de SDS 20% i bullint-ho durant 20 minuts. Per eliminar el SDS es va repetir el procés de ultracentrifugació i rentats abans esmentat, però la darrera resuspensió es va realitzar en 500 µL de tampó fosfat 50 mM a pH=4.9. Seguidament es va afegir el tercer enzim, la muramidasa, a una concentració final de 20 µg/mL [talla entre els

abans esmentats monòmers del PGN (disacàrids-pèptids), deixant intactes els *crosslinks* entre cadenes peptídiques per així obtenir els muropèptids (*Figura 7*), i es va deixar la digestió a 37 °C *overnight*. El dia següent es va aturar la digestió bullint a 100 °C la mostra durant 20 minuts i es van centrifugar les mostres durant 10 minuts a 14000 g per precipitar les proteïnes desnaturalitzades.

El sobrenedant es va passar a un tub de vidre i es va oxidar afegint 1/10 del volum de tampó borat 1M a pH=0.9 per segrestar els radicals i immediatament es van afegir 10 mg de borohidruir que redueix la mostra (es va deixar reduir durant 30 minuts a temperatura ambient). Finalment es va ajustar el pH a 3-4 amb àcid fosfòric i tires de pH, i es va filtrar (filtres Millex-GV, amb un porus de 0.22 µm) obtenint la mostra preparada per realitzar la HPLC.



**Figura 4:** Esquematització de les digestions i les darreres passes del protocol. En el nostre cas, el pas de filtració es va fer al final. Extret de: Schaub, R. & Dillard, J. Digestion of Peptidoglycan and Analysis of Soluble Fragments. *BIO-PROTOCOL* 7, (2017).<sup>30</sup>

## Tècnica HPLC

La tècnica de cromatografia líquida d'alta resolució o HPLC s'ha usat clàssicament per determinar la composició i els trets generals de l'arquitectura del PGN, ja que ens permet quantificar els diferents components químics d'aquest, i deduir-ne certes característiques estructurals. Aquest mètode separa els diferents muropèptids que es transporten en la fase mòbil, constituïda per dos eluents utilitzats, en funció del seu temps de retenció, el qual depèn, al seu torn, de la polaritat dels muropèptids. Les separacions es varen realitzar en un sistema HPLC *Breeze 2* (Waters), equipat amb un detector UV 2489 (Waters), un injector manual model 7725i (Rheodyne) i una columna *Aeris Peptide XB-C<sub>18</sub>*, amb un porus de 3.6

$\mu\text{m}$  i diàmetre de 4.6 mm (Phenomenex), de fase reversa, pel que la fase immòbil és la apolar i la fase mòbil és la que confereix la polaritat. S'utilitzà un gradient de dos eluents per aconseguir una separació més precisa dels muropèptids segons la seva polaritat permetent la seva elució a diferents temps de retenció. La mostra es va depositar en els vials específics per la HPLC, dels quals es van injectar 100  $\mu\text{L}$ . El gradient es realitzà a 45 °C i consisteix en l'elució a 1.0 ml/min amb 100% de l'eluent "A" durant 5 minuts, seguit d'un canvi lineal del gradient des de 0% fins a 100% de l'eluent "B" durant 60 minuts, i finalment 5 minuts amb el 100% de l'eluent "B". Pel que cada mostra corria durant 70 minuts d'acord amb el gradient esmentat. Els components elucidats van ser detectats a 204 nm.<sup>29</sup>

Eluents utilitzats:

- *Buffer A*: 2g de NaOH i ajustar amb  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a pH=4.35, enrasar 1L i afegir 50  $\mu\text{L}$  d'azida sòdica al 2%. Eluent inorgànic.
- *Buffer B*: 3g de NaOH i ajustar amb  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a pH=4.95, enrasar 1L. Agafar-ne 850 mL i afegir 150 mL de metanol. Eluent més orgànic (més polar).

La HPLC ens proporciona gràfics denominats cromatogrames, on es representa a l'eix X el temps de retenció i a l'eix Y l'absorbància a 204nm, obtenint una sèrie de pics dels quals l'àrea ens permet quantificar la quantitat dels muropèptids als que correspongui cada pic (comparant amb bases de dades segons el temps de retenció) en relació a l'àrea total del cromatograma. Per a tals fins es va usar el *software Empower 3* acoblat a l'equip de HPLC.

### **Anàlisi estadístic**

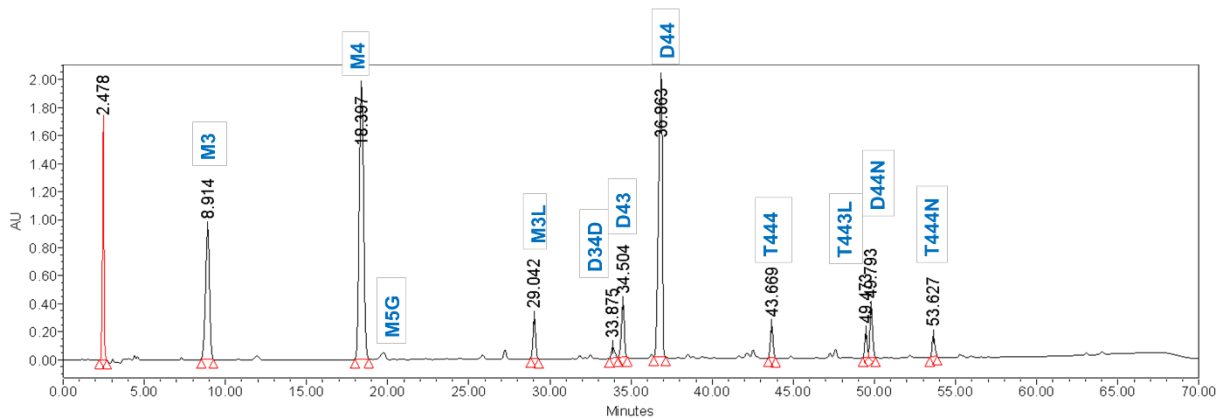
L'anàlisi estadístic i les representacions gràfiques derivades es van realitzar mitjançant el *software GraphPad Prism 5*.

Per una banda, per la comparació dels paràmetres obtinguts a l'HPLC en les diferents soques dins una col·lecció, es va prendre com a punt de tall arbitrari el valor de la mitja de la col·lecció en qüestió multiplicat per 2, i per tant, es van considerar destacables els valors que es trobaven per sobre o molt a prop d'aquest punt de tall.

Per altre banda, un cop assumida la distribució normal (gaussiana) dels valors de les diferents determinacions experimentals, per comparar paràmetres entre els aïllats primerencs i els tardans de FQ, es va realitzar el test *T-Student*, igual que per comparar els valors mitjos de cada paràmetre entre la col·lecció de bacterièmia i la col·lecció de FQ, sempre prenent com a estadísticament significatiu un valor de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Mitjançant la tècnica HPLC es va obtenir un cromatograma (*Figura 5*) per a cada mostra que, comparant-ho amb la base de dades del grup de recerca del Dr. J. A. Ayala (*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa-Universidad Autónoma de Madrid*), expert en anàlisi del PGN, ens va permetre quantificar els muropèptids en què es va digerir cada PGN, i que corresponen als diferents pics obtinguts, les àrees dels quals es van recopilar, quantificar i representar. En la *Figura 7* es descriuen els principals muropèptids analitzats i les propietats que adquireix el PGN en funció de la composició i quantitat d'aquests. En la *Taula 3* es representen els valors obtinguts de la col·lecció de bacterièmia juntament amb les soques de referència PAO1 i PA14, i en la *Taula 4*, els corresponents a la col·lecció de soques obtingudes de pacients amb FQ.



**Figura 5:** Exemple representatiu de cromatograma obtingut mitjançant HPLC. En aquest cas, es mostra un cromatograma de la soca de referència PAO1. L'eix X representa el temps de retenció en minuts i l'eix Y l'absorbància a 204nm. En els requadres en blau s'ha identificat el muropèptid corresponents a cada pic, juntament amb el temps de retenció en minuts. M: monòmer; D: dímer; T: trímer. El número indica els aminoàcids que té la cadena (es) lateral(s). La "G" indica la presència de glicina en posició terminal del pèptid. La "L" indica lligació amb la Braun's lipoprotein (Lpp).

**Taula 3:** Paràmetres obtinguts per HPLC dels PGNs purificats de la col·lecció de bacterièmia. Els valors provenen de les mitges de 3 purificacions i HPLCs independents per cada soca, sent en tots els casos, les desviacions estàndard menors del 10% del valor corresponent (dades no mostrades)

Strain	Abundància relativa (mol%) dels muropèptids <sup>a</sup>								Cross-link <sup>b</sup>	Peptidoglycan length <sup>c</sup>
	Mono	Di	Tri	Gly	D-D	Lpp	Anh	Penta		
PAO1	64,4	33,3	2,2	1,77	<0,5	5,1	4,8	1,1	37,8	21
PA14	66,5	31,8	1,5	1,19	<0,5	3,9	4,2	1,1	34,9	23,9
B12	67,9	30,1	1,9	4,2	0,8	4,4	7,2	4,2	34	13,7
B19	67,7	30	2,1	5,9	2,7	3,4	6,8	3,2	34,4	14,5
B28	62,5	34,7	2,6	<0,5	<0,5	5,8	6,7	0,3	40	14,7
B142	66,5	31,1	2,2	<0,5	<0,5	5,1	6,5	1,1	35,6	15,3
B48	64,1	34,6	1,2	3,5	9,6	8,4	6,3	1,2	37,1	15,6
B63	62,8	34,7	2,4	<0,5	<0,5	5,5	7,2	1,8	39,6	13,7
B120	65,4	32,6	1,9	<0,5	<0,5	4,2	5,1	0,2	36,4	19,4
B100	65	32,9	2	<0,5	<0,5	5,3	5,5	1,2	36,9	18,1
B43	61	35,8	3	<0,5	<0,5	5,8	7,9	0,2	42	12,6
B181	65,9	31,6	2,3	1,60	0,6	2,6	5,7	1	36,4	17,3
B211	71,2	27,3	1,4	<0,5	<0,5	8,4	5,4	2,6	30,2	18,3
B37	62,9	34,7	2,2	3,1	1,8	2,6	4,1	1,2	39,3	24,2
Mitja de la col·lecció <sup>d,e</sup>	65,24	32,51	2,1	-	-	5,13	6,2	1,52	36,83	16,45
Desviació típica	2,84	2,56	0,49	-	-	1,9	1,07	1,24	3,17	3,23

<sup>a</sup> Fracció molar de cada muropèptid sobre el total (mol%); Mono: monòmers (unitat de GlcNAc-MurNAc amb el pèptid); Di: dímers; Tri: trímers; D-D: muropèptids units a través dels dos residus DAP; Lpp: muropèptids units al grup C-terminal procedent de Lpp; Gly: muropèptids que tenen una glicina com a residu terminal; Anh: muropèptids que tenen l'àcid anhydro-1,6-anhydromuramic; és a dir, dóna una idea de la freqüència amb la qual una cadena glucídica queda tallada; Penta: muropèptids que tenen unit un pentapèptid. <sup>b</sup> Cross-link: Percentatge del grau de trans-peptidació del PGN. <sup>c</sup> Mitja del nombre d'unitats de disacàrids per cadena glucídica, sent per tant, inversa del paràmetre "Anh". <sup>d</sup> La mitja i la desviació típica de la col·lecció s'ha calculat sense tenir en compte els valors de les soques de referència. <sup>e</sup> Els valors representats com "<0,5" corresponen a pics no detectats al cromatograma, per això, no s'ha calculat el valor mig de la col·lecció en aquest paràmetre.



**Taula 4:** Paràmetres obtinguts per HPLC dels PGNs purificats de la col·lecció de FQ. Els valors provenen de les mitges de 3 purificacions i HPLCs independents per cada soca, sent en tots els casos, les desviacions estàndard menors del 10% del valor corresponent (dades no mostrades). Els valors representats com “<0,5” corresponen a pics no detectats al cromatograma, per això, no s’ha calculat el valor mig de la col·lecció en aquest paràmetre

Strain	Mono	Di	Tri	Gly	D-D	Lpp	Anh	Penta	Cross-link (%)	Peptidoglycan length
CF6-3	64,0	33,1	2,8	1,91	<0,5	7,1	6,0	2,6	38,8	16,7
CF6-10	64,9	32,8	2,2	1,45	<0,5	7,4	4,0	1,6	37,2	24,6
CF10-3	66,5	31,8	1,6	0,84	<0,5	3,8	2,9	0,5	35,1	33,5
CF10-11	69,6	28,7	1,6	1,67	<0,5	5,7	2,5	2,4	32,0	38,8
CF11-3	62,7	34,0	3,1	0,96	<0,5	3,6	7,5	1,3	40,4	13,5
CF11-10	70,0	28,4	1,4	7,1	<0,5	4,4	3,5	6,3	31,3	28,3
CF16-3	62,3	35,0	2,5	1,70	<0,5	6,8	4,8	1,5	40,2	20,4
CF16-10	60,2	36,6	3,1	2,1	<0,5	4,1	5,9	1,7	42,9	16,8
CF21(1088)-3	61,1	36,3	2,4	7,3	<0,5	5,6	3,9	7,8	41,2	25,6
CF21(1088)-10	65,3	31,9	2,7	3,84	<0,5	3,5	7,2	2,5	37,4	14,1
CF15-3	67,6	30,4	1,9	2,50	<0,5	3,9	8,2	2,5	34,3	12,1
CF15-10	66,9	31,1	1,8	1,09	<0,5	4,5	6,3	1,0	34,9	15,6
CF24-4	68,9	29,8	1,2	1,36	<0,5	3,2	2,6	1,3	32,3	37,3
CF24-10	64,1	33,3	2,4	2,64	<0,5	5,0	6,7	2,6	38,3	14,9
CF12(299)-3	59,4	37,1	3,4	2,30	<0,5	5,0	6,6	2,2	43,9	15,0
CF12(299)-6	60,6	35,7	3,5	2,98	<0,5	3,3	6,0	2,9	42,9	16,3
CF12(146)-7	64,2	33,7	2,0	0,52	<0,5	4,7	3,3	0,9	37,7	30,2
CF12(146)-10	67,8	31,1	1,0	2,52	<0,5	6,3	3,0	2,7	33,2	33,6
CF5-3	58,8	37,6	3,5	1,07	<0,5	5,1	4,9	1,0	44,6	20,1
CF5-11	67,8	29,1	3,0	0,92	<0,5	3,7	5,4	0,5	35,2	18,3
CF28-6	67,6	30,5	1,8	1,13	<0,5	4,0	8,4	1,1	34,2	16,4
CF28-10	65,2	32,7	2,0	1,03	<0,5	6,3	5,7	1,4	36,7	17,2
CF21(1109)-5	63,0	34,1	2,8	0,47	<0,5	6,0	5,4	0,4	39,7	18,4
CF21(1109)-10	64,7	33,1	2,0	4,65	<0,5	5,8	4,5	4,9	37,2	24,2
Mitja de la col·lecció	64,72	32,8	2,3	2,31	-	4,9	5,22	2,23	37,57	21,75
Desviació típica	3,24	2,66	0,7	1,9	-	1,3	1,75	1,8	3,85	7,97

Per detectar els valors de cada paràmetre potencialment rellevants, s’ha pres com a punt de tall aquells valors que superen el valor del doble de la mitja de cada col·lecció (o bé s’hi acosten molt). Aquests valors s’han ressaltat en color vermell a les *Taules 3 i 4*. En la *Taula 3*, en el cas de les columnes “Gly” i “D-D”, no s’han calculat les mitges, donada la presència de soques a on no es va poder quantificar cada pic. No obstant això, també s’han destacat soques en vermell, pel seu elevat valor en relació a la resta.

Hi ha evidències de que el PGN, així com altres estructures com el LPS, es veuen modificades en funció de la fase de creixement i en funció del tipus de infecció. Com s'ha vist a *E. coli*, la llargària de les cadenes disminueix en la fase estacionària mentre que el *cross-linking* entre els muropèptids (especialment les unions DAP-DAP) i la unió a la Lpp augmenta, tot justificat per una menor taxa d'addició de nous monòmers al sàcul.<sup>31</sup> En cap aïllat es compleixen aquestes tres circumstàncies simultàniament, pel que els canvis destacats en soques puntuals no es deuen a determinacions realitzades per algun error en fase estacionària, sinó que realment, els PGNs destacats mostren les característiques en fase exponencial que apareixen a les taules.

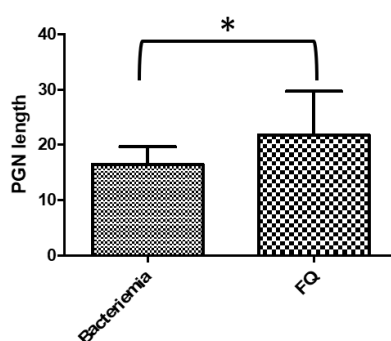
Així doncs, i segons la informació que ens proporciona la bibliografia en relació a característiques estructurals i fenotípiques que es poden inferir de l'anàlisi dels resultats d'un HPLC de PGN (resumida en la *Figura 7* i el seu peu<sup>15</sup>), podríem destacar: en la *Taula 3* destacarien els muropèptids que tenen com a residu terminal la glicina en les soques B12, B19, B48 i B37, entre les quals les dues primeres també destaquen per l'elevat nombre de pentapèptids, el que es correlacionaria amb una, almenys teòrica, major possibilitat no materialitzada de trans-peptidació, i la tercera pel *cross-linking* DAP-DAP, pel que la soca B37 tindria menor distància entre cadenes (es troben més pròximes), el que s'ha relacionat amb major resistència als  $\beta$ -lactàmics. Per altra banda, en la *Taula 4* les soques CF11-10, CF21(1088)-3 i CF21(1109)-10 presenten un elevat contingut en pentapèptids i, de manera correlacionada, un elevat nombre de muropèptids que tenen la glicina com a residu terminal.

En relació a aquest darrer fet, no hem trobat a la bibliografia dades que ens permetin inferir quines potencials implicacions té la presència de glicina en posició terminal dels pèptids, una adició que sembla ocórrer de forma natural, sobre tot als pentapèptids.<sup>32</sup> Només sembla existir, a les nostres dades, una relació entre la proporció augmentada de pentapèptids i una major possibilitat de tenir glicina en posició terminal del pèptid, com es lògic.

Per altre banda, per comparar els valors entre col·leccions s'ha realitzat el test *T-Student* utilitzant els valors de les mitges. Es va obtenir una diferència significativa en la llargària del PGN, on la mitja d'aquest valor per a la col·lecció de FQ és de 21,75 disacàrids, mentre que la mitja de bacterièmia és de 16,45 (veure *Figura 6*), donant un *p-value* de 0.0347. També s'han comparat els valors obtinguts dels aïllats inicials dels pacients amb FQ i els valors dels tardans dins l'interval de 3 a 8 anys, però no s'ha obtingut cap diferència estadísticament significativa (*p-value*>0,05). És curiosa la tendència en tots els sentits en aquesta comparació; existeixen parelles a les quals ambdós aïllats tenen pràcticament la mateixa llargària, parelles a on l'aïllat inicial té més llargària, i parelles a on el tardà és el que té

cadena glucídica més llarga. Per altra part, no hem trobat a la bibliografia evidències clares de que una major o menor llargària de les cadenes, per sí sola, tingui un efecte adaptatiu per al PGN. Teòricament, com més llarga és la cadena de disacàrids menys elàstic serà el PGN, ja que més pèptids laterals tindrà, i més possibilitats de *cross-linking* oferirà, sent conseqüentment més rígid (Figura 7). Això no obstant, de moment no sabem com podria influir positivament aquesta suposada major rigidesa del PGN a les soques de FQ.

En la resta de paràmetres, no es va detectar cap diferència estadísticament significativa en comparar les dues col·leccions, o els aïllats inicials amb els tardans de FQ.



**Figura 6:** Representació del valor mitjà de la llargària de les cadenes glucídiques (nº de disacàrids GlcNAc-MurNAc per cadena) dels PGNs, comparant la col·lecció de bacterièmia i la col·lecció de FQ. \* Indica un  $p$ -value < 0,05 en el test *T Student*.

A	Family	Representative member	Common feature	Consequence of higher values to PG properties
	Monomers (M4)		Stem peptide remains free	More elastic PG
	Dimers (D44)		Stem peptides from two glycan strands connected by peptide bond	Stiffer PG
	Trimers and tetramers (T443)		Same as dimers but connecting three or four glycan strands	Same as dimers; strand cross-over points
	Anhydro (D44N)		Presence of 1,6-anhydro-MurNAc glycan terminals	Shorter strands, more elastic PG
	LD-crosslinked (D33D)		Stem peptides connected by 3-3 bond of LD stereochemistry	Shorter average distance between strands; resistance to beta-lactams
	Lpp-linked (M3L)		Presence of C-terminal fragment from Braun's lipoprotein	Stronger OM/PG interaction
	Pentapeptides (M5)		Presence of D-Ala-D-Ala at end of peptide	Potential donors for transpeptidation; binding of vancomycin-like compounds; lack of carboxypeptidases

**Figura 7:** Muropèptids del PGN analitzats mitjançant la HPLC. La quantitat de cada un dels muropèptids confereix diferents propietats al PGN. Una major quantitat de monòmers indica un menor nivell de *cross-linking* pel que el PGN serà més elàstic, mentre que una major quantitat de dímers (unió covalent entre 2 monòmers a través del pèptid), trímers o tetràmers condueix a un PGN més rígid. Una major quantitat del grup *anhydro* indica la presència de cadenes curtes (degut a l'acció de transglicosilases lítiques que hidrolitzen l'enllaç entre el residu

MurNac i el GlcNac), conferint major elasticitat. A major prevalença de reaccions de trans-peptidació entre els dos residus DAP (D33D) fa que la distància entre les cadenes glucídiques sigui menor i això s'ha relacionat amb increments a la resistència als  $\beta$ -lactàmics. Els muropèptids en ocasions es poden trobar units a la lipoproteïna de *Braun'* (Lpp) de la membrana externa, fet que es quantifica gràcies a la digestió amb proteasa realitzada, ja que deixa un oligopèptid C-terminal unit a DAP que confereix més hidrofobicitat a aquests muropèptids. A major presència del grup C-terminal major força d'interacció entre el PGN i la membrana externa, i es suposa que major estabilitat front a agents desnaturalitzadors. I, finalment, la presència de pentapèptid (pèptids terminals amb dos residus de D-Ala) permet saber que hi ha major possibilitat de trans-peptidació i llocs d'unió per components similars a la vancomicina. Extret de: Desmarais, S. M., De Pedro, M. A., Cava, F. & Huang, K. C. Peptidoglycan at its peaks: how chromatographic analyses can reveal bacterial cell wall structure and assembly. *Mol. Microbiol.* **89**, 1–13 (2013).<sup>15</sup>

## 6. CONCLUSIÓ

L'evidència a la bibliografia en quant a l'existència de potencials modificacions adaptatives al PGN dels Gram negatius, així com a la capacitat d'adaptació de PA a lo llarg de la FQ, conduïen a demanar-se si l'alteració de la composició del PGN i de la seva estructura podrien ser un d'aquests factors que es seleccionen per tal de proporcionar a PA la capacitat d'evitar les defenses de l'hoste per conviure amb aquest i disminuir així la inflamació produïda al context de la FQ, en contraposició a una infecció aguda. També ens va motivar a fer aquest estudi descriptiu l'absència de treballs que determinessin la composició del PGN de PA a un ampli nombre de soques clíniques.

No obstant, a banda de l'excepció descrita a continuació, no s'han observat alteracions constants o generals quan s'han comparat les dues col·leccions (bacterièmia vs FQ), ni comparant els aïllats que conformen les parelles de infecció primerenca i tardana de FQ, que permetin arribar a la conclusió d'una menor immunogènecitat ni una millor adaptació en els diferents tipus de infeccions. En canvi, sí que s'ha vist una diferència significativa en la llargària de les cadenes glucídiques del PGN, sent major en les soques de FQ que en les de bacterièmia. Mentre que el valor de les de FQ s'assembla més a les soques de referència PAO1 i PA14, la llargària del PGN de les soques de bacterièmia s'allunya del valor de referència, encara que la significació biològica d'aquesta tendència encara s'ha de determinar en el futur. Dins la col·lecció de FQ no hi ha una tendència clara en quan a la longitud de les cadenes glucídiques en comparar aïllats inicials/tardans.

Per altre banda, sí que s'han observat alteracions puntuals en altres paràmetres en una minoria de determinades soques que podrien ajudar a comprendre la importància d'aquests canvis en el PGN de PA i la capacitat adaptativa que té aquest component. A més, entendre com aquestes modificacions puntuals i minoritàries dins les col·leccions podrien influir en la fisiologia de PA (incloent la seva sensibilitat a la lisozima, complement, a determinats antibiòtics, entre d'altres), podria conduir a la identificació de nous tractaments o de noves teràpies en un futur.

No obstant, la conclusió general a la que arribam en aquest treball és que el PGN de PA és una estructura molt estable dins les soques clíniques, a on rarament es veuen reflectits canvis que potencialment milloren l'adaptació de les soques al seu entorn.

## 7. REFERÈNCIES

1. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo: *Pseudomonas aeruginosa*. *DATABiO*. DB-B-P.a-16. Fichas de agentes biológicos (2017).
2. Winn, W. C. & Koneman, E. W. *Koneman diagnóstico microbiológico : texto y atlas en color*. (Editorial Médica Panamericana, 2008).
3. Forbes, B. A. *et al*. *Bailey & Scott diagnóstico microbiológico*. (Panamericana, 2009).
4. Berthelot, P. *et al*. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med.* **27**, 503–12 (2001).
5. Driscoll, J. A., Brody, S. L. & Kollef, M. H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* **67**, 351–68 (2007).
6. Alatraktchi, F. A. *et al*. Paper-based sensors for rapid detection of virulence factor produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **13**, e0194157 (2018).
7. Federación de Especialistas de Análisis Biológicos de la Provincia de Buenos Aires., D. Á. & Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* **48**, ([Federación de Especialistas de Análisis Biológicos de la Provincia de Buenos Aires], 2014).
8. Bhagirath, A. Y. *et al*. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm. Med.* **16**, 174 (2016).
9. Ferri, F. F. & Preceded by: Ferri, F. F. *Ferri's clinical advisor 2018 : 5 books in 1*.
10. Nguyen, D. & Singh, P. K. Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 8305–6 (2006).
11. Lorè, N. I. *et al*. Cystic Fibrosis-Niche Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* Reduces Virulence in Multiple Infection Hosts. *PLoS One* **7**, e35648 (2012).
12. Boyd, A. & Chakrabarty, A. M. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *J. Ind. Microbiol.* **15**, 162–8 (1995).
13. Deng, W. *et al*. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion

- systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 323–337 (2017).
14. Vollmer, W., Blanot, D. & De Pedro, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 149–167 (2008).
  15. Desmarais, S. M., De Pedro, M. A., Cava, F. & Huang, K. C. Peptidoglycan at its peaks: how chromatographic analyses can reveal bacterial cell wall structure and assembly. *Mol. Microbiol.* **89**, 1–13 (2013).
  16. Kim, S. J., Chang, J. & Singh, M. Peptidoglycan architecture of Gram-positive bacteria by solid-state NMR. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1848**, 350–362 (2015).
  17. Boneca, I. G. The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 46–53 (2005).
  18. Cloud-Hansen, K. A. *et al.* Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 710–716 (2006).
  19. Rosenthal, R. S., Nogami, W., Cookson, B. T., Goldman, W. E. & Folkening, W. J. Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin. *Infect. Immun.* **55**, 2117–20 (1987).
  20. Heiss, L. N., Moser, S. A., Unanue, E. R. & Goldman, W. E. Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. *Infect. Immun.* **61**, 3123–8 (1993).
  21. Cloud, K. A. & Dillard, J. P. A lytic transglycosylase of *Neisseria gonorrhoeae* is involved in peptidoglycan-derived cytotoxin production. *Infect. Immun.* **70**, 2752–7 (2002).
  22. Lenz, J. D., Hackett, K. T. & Dillard, J. P. A Single Dual-Function Enzyme Controls the Production of Inflammatory NOD Agonist Peptidoglycan Fragments by *Neisseria gonorrhoeae*. *MBio* **8**, e01464-17 (2017).
  23. Hernández, S. B. *et al.* Bile-induced peptidoglycan remodelling in *Salmonella enterica*. *Environ. Microbiol.* **17**, 1081–1089 (2015).
  24. Wang, G., Lo, L. F., Forsberg, L. S. & Maier, R. J. *Helicobacter pylori* peptidoglycan modifications confer lysozyme resistance and contribute to survival in the host. *MBio* **3**, e00409-12 (2012).
  25. Ha, R. *et al.* Accumulation of Peptidoglycan O-Acetylation Leads to Altered Cell Wall

- Biochemistry and Negatively Impacts Pathogenesis Factors of *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem.* **291**, 22686–22702 (2016).
26. Cigana, C. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Exploits Lipid A and Muropeptides Modification as a Strategy to Lower Innate Immunity during Cystic Fibrosis Lung Infection. *PLoS One* **4**, e8439 (2009).
  27. López-Causapé, C. *et al.* Clonal Dissemination, Emergence of Mutator Lineages and Antibiotic Resistance Evolution in *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Chronic Lung Infection. *PLoS One* **8**, e71001 (2013).
  28. Cabot, G. *et al.* Overexpression of AmpC and Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Bloodstream Infections: Prevalence and Impact on Resistance in a Spanish Multicenter Study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 1906–1911 (2011).
  29. Ropy, A. *et al.* Role of *Pseudomonas aeruginosa* low-molecular-mass penicillin-binding proteins in AmpC expression,  $\beta$ -lactam resistance, and peptidoglycan structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 3925–34 (2015).
  30. Schaub, R. & Dillard, J. Digestion of Peptidoglycan and Analysis of Soluble Fragments. *BIO-PROTOCOL* **7**, (2017).
  31. Alvarez, L., Espaillet, A., Hermoso, J. A., de Pedro, M. A. & Cava, F. Peptidoglycan remodeling by the coordinated action of multispecific enzymes. *Microb. Drug Resist.* **20**, 190–8 (2014).
  32. Ottolenghi, A. C., Caparrós, M. & de Pedro, M. A. Peptidoglycan tripeptide content and cross-linking are altered in *Enterobacter cloacae* induced to produce AmpC beta-lactamase by glycine and D-amino acids. *J. Bacteriol.* **175**, 1537–42 (1993).