

Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía

Facultade de Bioloxía e Instituto de Acuicultura

Caracterización molecular de los sistemas de
transporte de hierro en *Photobacterium damsela*,
análisis de la variabilidad genética y presencia de
elementos móviles

Memoria que presenta

Sandra M^a Juiz Río

para optar al Grado de Doctora en
Ciencias Biológicas

Santiago de Compostela, Enero 2006

Departamento de Microbiología e Parasitología

Manuel L. Lemos Ramos, Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela, y

Carlos Rodríguez Osorio, Investigador Contratado del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMAN: Que la presente Tesis Doctoral titulada “Caracterización molecular de los sistemas de transporte de hierro en *Photobacterium damsela*, análisis de la variabilidad genética y presencia de elementos móviles” que presenta **Dña. Sandra Mª Juiz Río** para optar al Grado de Doctora en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, de la Universidad de Santiago de Compostela, y considerando que se halla concluida autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Santiago de Compostela a 26 de Enero de 2006.

Fdo.: Dr. Manuel L. Lemos Ramos

Fdo.: Dr. Carlos Rodríguez Osorio

La doctoranda,

Fdo.: Sandra Mª Juiz Río

Agradecimientos

Acariciando ya este trabajo su conclusión, es el momento de volver la vista hacia algo más de cuatro años, y tratar de transmitir el profundo agradecimiento que siento hacia quienes me han acompañado en esta etapa de mi vida, y han hecho posible de un modo u otro que hoy esté escribiendo estas últimas líneas.

En primer lugar, debo expresar mi agradecimiento a mis dos directores de tesis, los doctores Manuel L. Lemos Ramos y Carlos Rodríguez Osorio.

Al Dr. Manuel Lemos por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por toda la atención que me dedicó y la confianza que depositó siempre en mi trabajo.

Al Dr. Carlos Rodríguez por tantas horas de debate, tantas ideas discutidas, tantos experimentos diseñados codo con codo, por ayudarme a labrar un pensamiento científico y por haberme regalado tanto conocimiento. Por ser mi compañero, mi amigo, por hacer esta tesis también un poco suya, porque creyó siempre que este trabajo saldría adelante a pesar de tantos “cúmulos de despropósitos”, incluso en los momentos en los que yo perdía la fe.

Al ambos quiero agradecerles la oportunidad que se me brindó hacer cuatro años de hacer realidad mi deseo de ser doctora, sus comentarios y aportaciones, así como la ayuda prestada en la corrección de esta memoria.

También debo agradecer su ayuda y atención durante este tiempo a los profesores Juan Luis Barja y Alicia Estévez Toranzo y a la Dra. Beatriz Magariños.

A mi compañera y amiga Susana por estar constantemente ahí, para lo bueno y lo malo, por tener siempre tiempo para mí, por empujarme a seguir cuando ya no podía más. Gracias por tus consejos y por ayudarme a mejorar en el laboratorio (y por supuesto por introducirme en el apasionante mundo del “timer”).

Quiero mencionar también aquí a mis compañeros del laboratorio de Santiago, a los que estaban cuando llegué y a los que se quedarán cuando me haya marchado: Al Óscar (también por sus consejos de belleza ☺), Lucía, Carmen, Sara, Dani Bolón... gracias por haber contribuido a que estos años sean inolvidables. A la gente de “Viro”, Javi, Juanma, Johny, Carmen, Carlos, Alián, Óscar Colindres y muy especialmente a Inés. A Victoria, Ismael y Placeres. A la gente de “la facultad”, a la Dra. Ysabel Santos, a Manuel, Jesús Arenas, Laura y

Sonia, Santi, Rubén, Rutz, Nuria, Ahmed, Mari y Jose. Al Celsiña por tener siempre un hueco para meter mis “perdidos urgentes” por su sonrisa y su afecto.

Al Sol, que me ayudó a dar mis primeros pasos en la microbiología, por su amistad y porque siempre tuvo tiempo para echarme una mano o dos cuando lo necesité.

Una parte de esta tesis y de mi formación científica se la debo a la gente del Centro Nacional de Biotecnología de Madrid. Al Dr. Víctor de Lorenzo que me acogió y me trató desde el primer día como una más del laboratorio. A todos mis compañeros, Ana, Paco, Mark, Mario, Paola Jurado, Teka, Elvira, Isabel, Joaquín, Nacho, Cecilia, Carlos, Paola Milanésio, Diana, Svenja y David.

Quiero dedicar un espacio además a todos mis amigos, que tanto me han ayudado aún sin ser conscientes la mayor parte de las veces de ello, por estar siempre ahí aunque ya no podamos compartir tantas horas juntos como antes. La lista sería inmensa, pero como sé que todos sabéis quiénes sois, me permitiréis citar tan sólo a quienes por uno u otro motivo me han sido más cercanos estos años. Al Xoán M. Viña, mil gracias por todos estos años de afecto, apoyo y comprensión (y por regalarme tu frase). Gracias de forma muy especial a “mis niñas” Montse, Bea y Elena por tanto tiempo de amistad incondicional y de escucha, a Noa y María de la Riba, a Toño, Pepo, Du, Carmen, Vace, Yago, Abi, Bruno, Marcos, Nunú, Ana, Txetxo, Iván, María y Jose Viña., a Pepe, Emy y José Ma ... y a quienes llenaron y llenan aquí o en mi recuerdo todos mis días de alegría, Mishi, Molli y Haski.

Al Sebas... las palabras se me quedan cortas para expresar lo que ha significado para mí su ayuda sobre todo estos últimos meses. Gracias por haber estado siempre tan cerca aún cuando estabas lejos, por tu gran paciencia, por tu cariño y comprensión, por prestarme un poquito de tu magia...

Al toda mi familia; a Nélida Rozas Iglesias... gracias por aguantarme estos 26 años...

Finalmente, y desde lo más profundo de mi corazón, quiero agradecer y dedicar este trabajo a quienes se lo debo todo: a mis padres Arturo e Isabel y a mi hermano Arturo... gracias por todo vuestro amor, por vuestros ánimos... espero que sepáis que nadie hay para mí como vosotros...

Gracias a todos por ayudarme a hacer realidad mi sueño

Durante la realización de este estudio he disfrutado de una beca F.P.I. asociada al proyecto AGL 2000-0492 en el marco del Programa Nacional de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

*“Busquemos como buscan los que aún no han encontrado,
y encontremos como encuentran los que aún han de
buscar”*

San Agustín

*“Vexo o mundo darredor de min e adoezo por entendelo.
Vexo sombras e luces, nubeiros que viaxan, lume, árbores.
¿Qué é todo isto?. Ninguén me di, poño por caso pra qué
sirven as estrelas, nin onde morren os paxaros”*

Xosé Neira Vilas

A mis padres y hermano

A mis amigos

Resumen

Photobacterium damsela es una γ -proteobacteria perteneciente a la familia *Vibrionaceae* y que actualmente engloba a dos subespecies: *P. damsela* subsp. *piscicida* (agente causal de la pasteurelosis en peces) y *P. damsela* subsp. *damsela*. Si bien en los últimos años se han producido avances importantes en el conocimiento de la biología de este patógeno, las bases genéticas de la virulencia así como la diversidad genética intraespecífica constituyen aspectos todavía muy poco estudiados. Entre los objetivos de la presente Tesis nos planteamos caracterizar genéticamente algunos de los factores que contribuyen a la virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida*, con especial énfasis en los sistemas de adquisición de hierro. Asimismo, hemos analizado la diversidad genética existente entre cepas de esta subespecie, y determinado algunas de las divergencias genéticas entre cepas en las dos subespecies de *P. damsela*.

Como punto de partida hemos identificado en primer lugar el gen que codifica la proteína Fur (*ferric uptake regulator*), cuya secuencia ha mostrado una homología del 99,3% entre las dos subespecies de *P. damsela*, diferenciándose la proteína en un único aminoácido de los 148 de que consta. Además, hemos demostrado que Fur actúa en *P. damsela* como un regulador transcripcional dependiente de las concentraciones de hierro del medio.

Por otra parte se ha identificado y caracterizado un sistema de captación de grupos hemo como fuente de hierro en las dos subespecies de *P. damsela*. Este sistema está compuesto por un receptor de membrana externa (HutA), un sistema de transducción de energía (proteínas TonB, ExbB y ExbD), una proteína de unión de hemina en el periplasma (HutB), un sistema de transporte de tipo ABC constituido por una permeasa (HutC) y una ATPasa (HutD), así como tres proteínas de función no bien conocida (HutWZX). La identidad de los residuos aminoacídicos en las proteínas de este sistema entre las dos subespecies de *P. damsela* varió entre el 94% y el 100%, y dicho sistema mostró también una elevada homología con las proteínas de los sistemas de captación de hemo de otros miembros de la familia *Vibrionaceae*. Sin embargo, hemos detectado indicios de microevolución intraespecífica en este sistema: el gen del receptor de membrana externa, *hutA*, es funcional en todas las cepas de la subsp. *damsela* analizadas, pero se encuentra interrumpido constituyendo un pseudogen en muchas de las cepas de *piscicida*. Curiosamente, las únicas cepas de la subsp. *piscicida* que poseen el gen *hutA* intacto constituyen una posible línea clonal de aislados

procedentes de Japón. El sistema de captación de hemo se expresa *in vivo* durante la infección de *P. damsela* subsp. *piscicida* en rodaballo, tal y como se desprende del análisis de la presencia de mRNA del operón *tonBexbBexbBhutBCD* en muestras de peces infectados. Asimismo, se ha demostrado que no existen sistemas redundantes para captar hemo, dado que la inactivación de *hutCD* conlleva la incapacidad de utilizar grupos hemo como única fuente de hierro.

Aplicando la técnica de Hibridación Sustractiva, hemos identificado 21 regiones del genoma específicas de una cepa virulenta de *piscicida*, y que estaban ausentes en una cepa avirulenta. Al estudiar la distribución de estas regiones de DNA en 28 cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida*, con diferentes orígenes geográficos y aislados de diferentes hospedadores, se pudo constatar que éste es un microorganismo muy heterogéneo desde el punto de vista genético. No se encontraron en ningún caso dos cepas que mostrasen exactamente el mismo patrón de distribución de las 21 regiones analizadas. Asimismo, se han identificado por vez primera en este patógeno genes que codifican transposasas. Estos genes se encuentran en copia múltiple, insertados en el genoma, constituyendo un patrón que resultó ser diferente en cada cepa analizada. Además, se identificaron en una única cepa de *piscicida* secuencias génicas similares al elemento móvil SXT descrito en *V. cholerae*. Este elemento de gran tamaño (aprox 100 kb) es representativo de una familia de transposones conjugativos e integrativos que portan genes de resistencia múltiple a antibacterianos.

Estudios previos habían mostrado que cada subsp. de *P. damsela* produce un sideróforo diferente. La aplicación de la Hibridación Sustractiva para detectar diferencias genéticas entre las dos subespecies posibilitó el aislamiento y caracterización de una región del genoma de aprox. 22 kb en la subsp. *piscicida*, que contiene un operón de genes regulados por hierro entre los que se encuentra un posible receptor de membrana para sideróforos y 2 péptido-sintetasas no ribosómicas (Irp1 e Irp2) de alto peso molecular. Estas proteínas aparecen, en condiciones de limitación de hierro, en preparaciones de membranas totales de cepas de la subsp. *piscicida*, estando ausentes en las cepas de la subsp. *damsela*. La inactivación por inserción del gen *irp1* hace que *P. damsela* subsp. *piscicida* no produzca sideróforos y sea incapaz de crecer en condiciones de limitación de hierro. Además, la mutación del gen *irp1* conllevó un aumento de la LD₅₀ en al menos dos órdenes de magnitud con respecto a la cepa parental, demostrando que el sistema de captación de hierro mediada por sideróforos es un factor que contribuye a la virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* en peces. El

análisis de la presencia de estos genes en una colección de cepas de las dos subespecies demostró que son exclusivos de algunas cepas de la subsp. *piscicida*. Curiosamente, las secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas por este operón muestran una elevada similitud con las proteínas de síntesis del sideróforo yersiniabactina producido por cepas de *Yersinia* spp, cuyos genes se encuentran agrupados constituyendo una isla de patogenicidad. El análisis de los dominios funcionales de las proteínas Irp1 e Irp2 ha aportado evidencias de que el sideróforo producido por *P. damsela* subsp. *piscicida* puede estar estructuralmente relacionado con la yersiniabactina.

A la vista de todo lo expuesto, podemos concluir que los mecanismos de captación de hierro juegan un papel importante en la virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida*. La adquisición por transferencia horizontal de genes y/o elementos móviles, y la inactivación de genes (acumulación de pseudogenes), son procesos que probablemente han contribuido a la generación de diversidad genética y a la especiación de *Photobacterium damsela*.

Capítulo I.- Introducción general

1.1. <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> -----	1
1.1.1. Signos patológicos de la Pasteurelosis -----	2
1.1.2. Modo de transmisión -----	3
1.1.3. Hospedadores y distribución geográfica -----	4
1.1.4. Prevención y tratamiento de la enfermedad -----	5
1.1.5. Características morfológicas, bioquímicas y serológicas -----	6
1.1.6. Posición taxonómica -----	7
1.1.7. Diagnóstico del agente causal -----	9
1.1.8. Mecanismos de virulencia -----	11
1.2. <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> -----	13
1.3. El hierro en los microorganismos -----	16
1.3.1. Disponibilidad de hierro para los microorganismos -----	16
1.3.2. Importancia del hierro para los microorganismos -----	17
1.3.3. Mecanismos de captación de hierro -----	18
1.4. Los mecanismos de captación de hierro como factor de virulencia -----	23

Capítulo II.- Objetivos -----25**Capítulo III.- Identificación y caracterización de los genes *fur* en *Photobacterium damsela***

3.1. Introducción -----	31
3.1.1. La proteína Fur -----	32
3.1.2. La caja Fur o “Fur box” -----	34
3.1.3. Regulación del gen <i>fur</i> -----	36
3.1.4. El regulón Fur -----	37
3.1.5. Genes regulados por Fur -----	37
3.2. Materiales y Métodos -----	41
3.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo -----	41
3.2.2. Extracción del DNA -----	41
3.2.3. Amplificación parcial del gen <i>fur</i> -----	43
3.2.4. Secuenciación del gen <i>fur</i> completo -----	49
3.2.5. Clonaje y secuenciación del gen <i>fur</i> de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> -----	53

3.2.6. Construcción de árboles filogenéticos -----	53
3.2.7. Experimento de complementación del gen <i>fur</i> en la cepa de <i>E. coli</i> H1681 -----	54
3.2.8. Ensayo de titulación de Fur (FURTA) -----	55
3.2.9. Análisis informático de las secuencias -----	56
3.3. Resultados -----	57
3.3.1. Clonación y secuenciación de una parte del gen <i>fur</i> de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> -----	57
3.3.2. Clonación y secuenciación de los genes <i>fur</i> y <i>orf1</i> , completos y obtención de la secuencia parcial de los genes <i>glnS</i> y <i>fldA</i> -----	58
3.3.3. Clonación y secuenciación del gen <i>fur</i> de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> -----	61
3.3.4. Complementación de <i>E. coli</i> H1681 -----	64
3.3.5. Ensayo FURTA -----	66
3.3.6. Construcción de árboles filogenéticos -----	66
3.4. Discusión -----	70
3.5. Anexos -----	76

Capítulo IV.- Mecanismos de captación de grupos hemo en *P. damsela*

4.1. Introducción -----	77
4.1.1. El grupo hemo y las hemoproteínas -----	77
4.1.2. Mecanismos de captación de hemo -----	79
4.1.3. Mecanismos de captación de hemo en la Familia <i>Vibrionaceae</i> -----	80
4.1.4. Transporte de hemo y virulencia -----	87
4.2. Materiales y Métodos -----	89
4.2.1. Clonación y secuenciación de los genes responsables del transporte y la internalización del grupo hemo en <i>P. damsela</i> -----	89
4.2.2. Análisis funcional del sistema de transporte de hemo de <i>P. damsela</i> -----	94
4.2.3. Búsqueda del receptor de membrana externa responsable de la captación de grupos hemo del medio extracelular -----	101
4.2.4. Análisis transcripcional del sistema de captación de grupos hemo -----	106
4.3. Resultados -----	111
4.3.1. Identificación de los genes que intervienen en la captación del grupo hemo en <i>P. damsela</i> -----	111
4.3.2. Análisis funcional del sistema de transporte de hemo de <i>P. damsela</i> -----	136

4.3.3. Caracterización del receptor responsable de la captación de hemo del medio extracelular de <i>P. damsela</i>	143
4.3.4. Análisis transcripcional del sistema de captación de grupos hemo	166
4.4. Discusión	174
4.4.1. Organización genética del sistema de transporte de hemo en <i>P. damsela</i>	174
4.4.2. El Receptor de Membrana Externa HutA	179
4.4.3. Análisis funcional del sistema de captación de grupos hemo	183
4.4.4. Regulación transcripcional del sistema	185
4.5. Anexos	189

Capítulo V.- Aplicación de la Hibridación sustractiva al estudio de la diversidad genética en *P. damsela* subsp. *piscicida*

5.1. Introducción	193
5.2. Materiales y Métodos	199
5.2.1. Cepas bacterianas y extracción del DNA genómico	199
5.2.2. Hibridación sustractiva entre las cepas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> PC554.2 y EPOY 8803-II	200
5.2.3. Clonaje, purificación y análisis por restricción de los productos resultantes de la hibridación sustractiva	209
5.2.4. Análisis preliminar mediante hibridación tipo dot Blot de los productos	209
5.2.5. Secuenciación de los clones (pRDAs)	210
5.2.6. Análisis por hibridación DNA-DNA (dot blot y Southern blot) de los fragmentos	210
5.2.7. Análisis por PCR de los fragmentos	211
5.2.8. Diseño de oligonucleótidos en el elemento SXT de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	211
5.3. Resultados	213
5.3.1. Productos iniciales resultantes de la hibridación sustractiva	213
5.3.2. Análisis preliminar de los fragmentos resultantes de la hibridación sustractiva	213
5.3.3. Análisis inicial de los clones por dot blot	215
5.3.4. Secuenciación de los clones pRDAs seleccionados	215
5.3.5. Análisis de los fragmentos por hibridación DNA-DNA	222
5.3.6. Análisis por hibridación Southern blot de los clones que codifican para transposasas	227
5.3.7. Identificación y descripción de un elemento similar al SXT de <i>V. cholerae</i> en la cepa <i>tester</i> PC554.2	229

5.4. Discusión	235
5.5. Anexos	243
 Capítulo VI.- Identificación de un sistema genético de síntesis de sideróforos en <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	
6.1. Introducción	245
6.1.1. Los Sideróforos	245
6.1.2. Biosíntesis de sideróforos: mecanismos básicos	247
6.1.3. Transporte de sideróforos	249
6.1.4. Sideróforos en la familia <i>Vibrionaceae</i>	249
6.1.5. Estado actual del tema en <i>P. damsela</i>	251
6.2. Materiales y Métodos	251
6.2.1. Análisis de las proteínas de membrana inducidas en condiciones de limitación de hierro	251
6.2.2. Hibridación sustractiva	252
6.2.3. Análisis bioinformático de las secuencias de proteínas	253
6.2.4. Construcción de un mutante del gen <i>irp1</i>	253
6.2.5. Análisis del mutante <i>irp1</i> ⁻	254
6.2.6. Análisis transcripcional del sistema	254
6.2.7. Análisis de la presencia de los genes del operón de síntesis de sideróforos en cepas de las dos subespecies de <i>P. damsela</i>	255
6.2.8. Determinación de la virulencia para peces del mutante <i>irp1</i> ⁻	255
6.3. Resultados	256
6.3.1. Análisis de las proteínas inducidas en condiciones de limitación de hierro	256
6.3.2. Aislamiento de fragmentos de un gen relacionado con la síntesis de sideróforos mediante hibridación sustractiva	258
6.3.3. Secuenciación de un operón regulado por hierro relacionado con la síntesis y el transporte de sideróforos	259
6.3.4. Caracterización de un sistema de biosíntesis de sideróforos mediada por NRPS en <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	273
6.3.5. Generación y estudio del mutante <i>irp1</i> ⁻	289
6.3.6. Estudio transcripcional del sistema	293
6.3.7. Presencia de los genes del operón de síntesis de sideróforos en cepas de las dos subespecies de <i>P. damsela</i>	295
6.3.8. Similitud del sistema de biosíntesis de sideróforos de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> con otras especies bacterianas	296

6.4. Discusión	298
6.5. Anexos	312
 Capítulo VII.- Conclusiones	 313
 Anexo	 317
 Bibliografía	 321
 Artículos	 355

Abreviaturas

ATCC	Colección americana de cultivos tipo
BHI	Caldo infusión cerebro corazón
BHIA	Agar infusión cerebro corazón
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DO	Densidad Óptica
dNTP	Deoxinucleósidos trifosfato
ddNTP	Dideoxinucleósidos trifosfato
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetra-acético
EDDA	Ácido etilén-diamino-di-o-(hidroxifenil-acético)
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
HDTMA	Hexadeciltrimetilamonio
IPTG	Isopropil- β -D-thiogalactopiranosido
LB	Luria Bertani
MOPS	Ácido 4-morfolinpropanosulfónico
ORF	Pauta de lectura abierta
PBS	Tampón fosfato salino
p/v	Relación peso-volumen
rpm	Revoluciones por minuto
RBS	Ribosomal binding site
SDS	Dodecil sulfato sódico
SSC	Tampón Citrato Sódico Salino
HS	Hibridación sustractiva
TAE	Tampón tris-acetato-EDTA
TE	Tampón tris-EDTA
TSA-1	Agar de Soja Trypticaseína suplementado con 1% de NaCl
TSC-1	Caldo de soja Trypticaseína suplementado con 1% de NaCl
TM	Melting Temperature
U	Unidades de enzima
Vol.	Volumen
v/v	Relación volumen-volumen

Capítulo I

Introducción general

La acuicultura constituye un sector que se ha desarrollado considerablemente durante las últimas décadas, y actualmente representa alrededor del 20% de la producción pesquera a escala mundial. La acuicultura de agua dulce supone todavía más del 50% de la producción total en piscifactorías. En la acuicultura marina, la producción de peces representa un porcentaje menor con respecto a la de moluscos, pero el valor comercial de las especies de peces cultivadas, así como la inversión de capital necesario para su cultivo, han motivado que se incremente el interés científico por las enfermedades que afectan a los peces.

Los patógenos microbianos tienen en la acuicultura una especial importancia por el impacto económico que causan. Entre ellos se incluyen virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos, y no sólo afectan a la piscicultura por su capacidad de debilitar o matar a los peces, sino también porque pueden disminuir su valor comercial. Sin lugar a dudas, esta importancia económica ha estimulado el estudio científico de los patógenos bacterianos de peces, contribuyendo a que, actualmente, la microbiología de los peces cultivados constituya un campo de estudio muy amplio y activo.

1.1. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

La bacteria marina *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (antes *Pasteurella piscicida*) es el agente etiológico de la septicemia bacteriana denominada pasteurelosis. Esta enfermedad es también conocida comúnmente como “pseudotuberculosis” debido a que, en los casos crónicos, los peces enfermos muestran gránulos blancos prominentes en los órganos internos, consistentes en una acumulación de células bacterianas. El reciente cambio en su posición taxonómica, de *Pasteurella* a *Photobacterium* (Gauthier *et al.*, 1995), ha motivado que últimamente algunos autores se refieran a esta septicemia como photobacteriosis. La enfermedad fue descrita inicialmente en poblaciones salvajes de perca (*Morone americanus*) y lubina (*Morone saxatilis*) americanas (Snieszko *et al.*, 1964); sin embargo, actualmente los hospedadores naturales de *P. damsela* subsp. *piscicida*, abarcan una amplia variedad de peces marinos. Desde 1969, esta enfermedad ha sido una de las más importantes en Japón, afectando principalmente a los cultivos de seriola (*Seriola quinqueradiata*) (Kusuda y Salati, 1993) y a partir de 1990 se ha convertido en un importante problema en Europa, causando grandes pérdidas económicas en cultivos marinos de dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus*

labrax) y más recientemente lenguado (*Solea senegalensis*) (Toranzo *et al.*, 1991; Magariños *et al.*, 1996c; Magariños *et al.*, 2003).

1.1.1. Signos patológicos de la pasteurelosis

Los signos clínicos de esta enfermedad han sido descritos en detalle por Kubota *et al.* (1970) y por Fukuda y Kusuda (1981) en seriola cultivada en Japón, resultando ser similares a los producidos en las epizootias de dorada cultivada en Galicia y en el área mediterránea (Toranzo *et al.*, 1991). Los signos externos de la enfermedad son difícilmente apreciables, únicamente algunos de los peces afectados muestran un ligero oscurecimiento de la piel y distensión abdominal, al tiempo que en algunos casos pueden presentar áreas hemorrágicas en cabeza y branquias (Tung *et al.*, 1985; Toranzo *et al.*, 1991). Los cambios patológicos internos pueden variar dependiendo de si la enfermedad se presenta en forma aguda o crónica. La forma aguda presenta generalmente pocos cambios patológicos. Histológicamente, el hígado el riñón y el bazo presentan una necrosis multifocal y acumulación bacteriana fuera y dentro de los fagocitos, en los capilares y en los espacios intersticiales. Por otro lado, la forma crónica de la enfermedad se caracteriza por la presencia en los órganos internos de los típicos tubérculos blancos de unos 0,5-3,5 mm de diámetro. Esta no es sin embargo una característica general, ya que la producción de estos granulomas parece depender de la especie de pez infectado, de si la infección ha sido inducida experimentalmente o si surgió de forma natural, y de si ha habido o no administración previa de antibióticos. El estudio histopatológico de estos granulomas mostró la presencia de colonias bacterianas y fagocitos necróticos. Además, bazo, hígado y riñón muestran acumulaciones de macrófagos que contienen numerosas bacterias intactas, muchos de los cuales están necrotizados (Nelson *et al.*, 1989; Noya *et al.*, 1995). Este hecho podría indicar que *P. damsela* subsp. *piscicida* es capaz de sobrevivir en el interior de los macrófagos del hospedador sin ser destruida. Además, las branquias presentan también numerosos macrófagos degenerados con bastantes células de *P. damsela* subsp. *piscicida* en su interior y necrosis de varios tipos de células capaces de producir la inhibición de la función respiratoria del pez (Noya *et al.*, 1995).

1.1.2. Modo de transmisión

Tanto la forma de transmisión, como la ruta de infección de *P. damsela* subsp. *piscicida* no están todavía demasiado claras. Los datos existentes apuntan a que la pasteurelosis parece ser una enfermedad de mayor prevalencia en los meses de verano (Frerichs y Roberts, 1989) a altas temperaturas del agua (mayores de 23 °C) y alta salinidad (20-30%) (Hawke *et al.*, 1987) y cuando la calidad del agua es baja (Fryer y Rohovec, 1984). En cuanto a la supervivencia en el agua, experimentos llevados a cabo por Janssen y Surgalla (1968) y Toranzo *et al.* (1982) demostraron que la bacteria permanece en estado viable en este medio durante sólo 4 ó 5 días. Ambas referencias indican que el agua no debe ser un reservorio primario. Estudios posteriores (Magariños *et al.*, 1994b), en los que se describió la estabilidad de *P. damsela* subsp. *piscicida* durante un período de un mes, tanto en agua de mar como en sedimento a diferentes temperaturas (6 y 20 °C), demostraron también que la bacteria sólo podía ser detectada por recuento en placa durante los primeros 6-12 días, persistiendo durante más tiempo en el sedimento que en el agua y mejor a 20 °C, aunque con variaciones dependiendo de la cepa utilizada. La actividad metabólica de estas células bacterianas se veía reducida durante este período en más de un 80%. Sin embargo, cuando se realizaron experimentos para evaluar la cantidad de células viables utilizando la técnica del naranja de acridina, así como medidas de actividad metabólica y citometría de flujo, se demostró que *P. damsela* subsp. *piscicida* era capaz de entrar en un estado viable no cultivable, ya que durante el período experimental se mantenía prácticamente invariable el número inicial de células. Si a estos microcosmos estudiados se les adicionaba después medio de cultivo fresco, se producía la reactivación de muchas de las células bacterianas en principio “dormidas”, tal y como quedó reflejado al realizar un recuento de células cultivables similar al realizado con naranja de acridina; estas bacterias recuperadas, mantenían la misma tasa respiratoria que las células de partida al inicio del experimento y prácticamente la misma infectividad potencial para los peces que las cepas originales utilizadas en los experimentos de supervivencia. Estos resultados, junto con los experimentos realizados posteriormente (Magariños *et al.*, 1995), en los que se conseguía infectar a los peces mediante baño en agua con la bacteria, sugieren que aunque *P. damsela* subsp. *piscicida* es un microorganismo lábil, el medio acuático constituye un reservorio y un vehículo de transmisión para este patógeno, y por lo tanto su transmisión por el agua no debe ser descartada. La existencia de este estado viable no

cultivable plantea un problema a la hora de detectar este microorganismo con la suficiente especificidad y sensibilidad. Por ello, para poder llevar a cabo un diagnóstico rápido y a la vez fiable de la pasteurelosis, se han puesto a punto en los últimos años, técnicas de detección por PCR (Aoki *et al.*, 1997; Osorio *et al.*, 1999).

De momento, no se ha podido demostrar la existencia de un portador asintomático de esta enfermedad, ya que no se ha podido aislar la bacteria de peces supervivientes a una exposición experimental (Toranzo *et al.*, 1991), aunque no se puede descartar que la bacteria se encuentre en estos casos a una concentración por debajo de los límites de detección clásicos, o en estado viable no cultivable.

1.1.3. Hospedadores y distribución geográfica

Actualmente, los hospedadores de *P. damsela* subsp. *piscicida*, incluyen una amplia variedad de especies de peces marinos, tanto salvajes como de cultivo. La primera epizootia de esta bacteria tuvo lugar durante el verano de 1963, en la región de Chesapeake Bay (Maryland, USA), y afectó a poblaciones salvajes de perca blanca (*Morone americanus*), y en menor grado de lubina americana (*Morone saxatilis*). La epizootia comenzó en junio, en el estuario del Potomac, y se extendió ampliamente durante el verano causando pérdidas de aproximadamente un 50% de la población de perca blanca. Snieszko *et al.* (1964) aislaron de la sangre y los órganos de los peces afectados una única bacteria que fue incluida dentro del género *Pasteurella*, en base a sus características morfológicas y bioquímicas. En el verano de 1964, se volvieron a producir nuevas epizootias en Japón debidas al mismo patógeno. Cuatro años más tarde, Janssen y Surgalla (1968) llegaron a la conclusión de que este microorganismo reunía suficientes características serológicas y fisiológicas para distinguirlo de otras especies del género *Pasteurella*, y propusieron la inclusión dentro de la nueva especie *Pasteurella piscicida*.

En 1970, *P. damsela* subsp. *piscicida* fue la responsable de importantes pérdidas en poblaciones salvajes de *Brevoortia tyrannus* y *Mugil cephalus* en Galveston Bay, Texas (Lewis *et al.*, 1970). A pesar de esto, en la caracterización de estos aislados, se indicó que estos microorganismos eran probablemente *Vibrio* sp. Un poco después, dos epizootias, una en Chesapeake Bay y otra en Long Island Sound (USA), produjeron importantes mortalidades en cultivos de lubina americana. Paralelamente, Kusuda y

Miura (1972) describen las primeras epizootias en poblaciones cultivadas de ayu (*Plecoglossus altivelis*), y Muroga *et al.* (1977) en las de sargo del Pacífico.

A partir de 1980 se han descrito muchos casos de mortalidad producida por *P. damsela* subsp. *piscicida* en peces cultivados. Dentro de las epizootias descritas, se incluyen una amplia variedad de peces como el besugo (*Acanthopagrus schlegeli*) (Ohnishi *et al.*, 1982), el mero del pacífico (*Epinephelus akaara*) (Ueki *et al.*, 1990), pargo (*Pagrus major*) e híbridos de lubina (*Morone sp.*).

No existen referencias anteriores a 1990 de casos de pasteurelosis en Europa; es en 1991 cuando Toranzo *et al.* (1991) describen el primer brote de esta enfermedad en España, asociada a grandes mortalidades de dorada cultivada en Galicia. A partir de este momento, empiezan a aparecer los primeros problemas en cultivos tanto de dorada como de lubina en otras regiones de España (Balebona *et al.*, 1992), Italia (Ceschia *et al.*, 1991), Francia (Baudin Laurencin *et al.*, 1991), Israel, Portugal (Baptista *et al.*, 1996), Malta, Turquía (Magariños *et al.*, 1996c) y Grecia. En 1999 *P. damsela* subsp. *piscicida* fue descrito como el agente causal de una mortalidad en masa del pez *Girella punctata* (Kawakami *et al.*, 1999). El primer aislado en España a partir del lenguado (*Solea senegalensis*) se produjo también en 1999 (Zorrilla *et al.*, 1999). En estudios posteriores, se aislaron y caracterizaron diversas cepas procedentes de lenguado en distintos puntos de España y se realizaron estudios comparativos entre éstas y otras cepas aisladas de diferentes especies de peces (Magariños *et al.*, 2003).

1.1.4. Prevención y tratamiento de la enfermedad

La quimioterapia ha sido efectiva para el tratamiento de la pasteurelosis hasta 1980. Desde entonces se han observado resistencias, no se sabe si ligadas a plásmidos o al cromosoma bacteriano, a distintos antibióticos como por ejemplo a la ampicilina o a la tetraciclina (Magariños *et al.*, 1992b). De todas formas, se han empleado otro tipo de nuevos quimioterápicos como el florfenicol y la fosfomicina para controlar los brotes de esta enfermedad. Se ha descrito que *P. damsela* subsp. *piscicida* tiene un período de parasitismo intracelular durante el proceso de la infección (Kusuda y Salati, 1993), que podría explicar la poca eficacia de los tratamientos utilizados en algunos brotes de la enfermedad.

A lo largo de los últimos 20 años ha habido diversos intentos de búsqueda de un método eficaz de inmunización para prevenir la enfermedad (Romalde y Magariños,

1997). La mayoría de estos intentos presentaron problemas tanto en su reproducibilidad como en la producción de vacunas a gran escala. La inmunización pasiva también se evaluó (Fukuda y Kusuda, 1981), pero los resultados mostraron un tiempo muy corto de protección.

Los mejores resultados en la protección contra la pasteurelisis, se obtuvieron utilizando bacterinas enriquecidas con productos extracelulares (ECPs), consiguiendo tasas de supervivencia (RPS) superiores al 75% cuando la vacunación se llevaba a cabo con peces de 0,5 a 2 g (Magariños *et al.*, 1994a). Estos estudios demostraron que la vacunación en estado larvario era también efectiva, con valores RPS comprendidos entre el 84 y el 90% (Magariños *et al.*, 1999). De todos modos, el programa recomendado de vacunación consiste en una primera inmunización cuando las larvas pesan alrededor de 50 mg y una posterior cuando los peces alcanzan unos 2 g. Esta vacuna está disponible actualmente y ha sido empleada con éxito en varios países europeos, incluidos España, Portugal y Grecia.

La investigación en busca de vacunas más efectivas, se ha dirigido también hacia el uso de bacterias vivas atenuadas (Kusuda y Hamaguchi, 1988), aunque su utilización todavía no está permitida, y el uso de proteínas de la envuelta celular (Magariños *et al.*, 1994c) como antígenos protectores.

1.1.5. Características morfológicas, bioquímicas y serológicas

P. damsela subsp. *piscicida* es un bacilo (0,8-1,3 x 1,4-4 µm) gram negativo, inmóvil, anaerobio facultativo y sensible al agente vibriostático 0/129. Presenta una característica tinción bipolar y puede mostrar pleomorfismo, variando su forma dependiendo de las condiciones de cultivo. Es oxidasa y catalasa positiva, pero negativa para la producción de indol, ureasa, gelatinasa y amilasa. La temperatura óptima de crecimiento está entre los 22,5 °C y los 30 °C aunque puede crecer en un rango entre los 15 °C y los 32,5 °C. Presenta un carácter halófilo obligado, mostrando un buen crecimiento en medios con una concentración de 1,5-2% de NaCl. Este crecimiento se inhibe completamente a concentraciones de NaCl por encima del 5%. Las características fenotípicas de *P. damsela* subsp. *piscicida* se recogen en la tabla I.1.

En cuanto a los análisis serológicos, *P. damsela* subsp. *piscicida* se describió como un microorganismo muy homogéneo en el que no se pueden diferenciar serotipos

(Kusuda y Fukuda, 1980; Magariños *et al.*, 1992a). Esta homogeneidad serológica fue confirmada al estudiar los patrones de lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa (Nomura y Aoki, 1985; Magariños *et al.*, 1992a).

Por otra parte, el análisis del contenido plasmídico de varias cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* procedentes de Japón, USA y Europa mostró que el perfil plasmídico de este microorganismo puede variar dependiendo del origen geográfico de las cepas (Magariños *et al.*, 1992a), siendo muy diferente el encontrado en las cepas japonesas, del resto de los aislados europeos y americanos.

1.1.6. Posición taxonómica

A pesar de ser la pasteurelosis una enfermedad muy antigua, la posición taxonómica de *P. damsela* subsp. *piscicida* ha sido objeto de constante discusión y controversia.

Los primeros autores en darle una designación específica, fueron Snieszko *et al.*, (1964), que la englobaron dentro del género *Pasteurella*; poco después Jansen y Surgalla (1968) propusieron el nombre de *piscicida*, y seguir incluyéndola dentro de las Pasteurellas, a pesar de presentar varias diferencias fenotípicas importantes con otras especies de este género.

Otros autores, como Kimura y Kitao (1971), consideraron que esta bacteria estaba más próxima al género *Corynebacterium* por su sensibilidad a la penicilina, sus propiedades nutricionales y su patrón en el metabolismo de carbohidratos. Sin embargo, en base sobre todo a su ausencia de movilidad, su cambio de morfología en la fase estacionaria de bacilo a cocoide y su carácter gram dudoso durante la fase inicial del crecimiento, Simidu *et al.* (1972) opinaron que sería más correcta su inclusión dentro del género *Arthrobacter*. Años después, Kusuda *et al.* (1978) tiran por tierra estas dos últimas hipótesis, al demostrar mediante técnicas de inmunodifusión que *Pasteurella piscicida* no presentaba antígenos comunes ni con *Arthrobacter* ni con *Corynebacterium renal*, aunque sí obtuvieron reacción cruzada con *Pasteurella plecoglosacida*, dando fuerza a la idea de incluirla dentro del género *Pasteurella*.

Tabla I.1.-Características fenotípicas generales de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Los resultados se leyeron después de 7 días de incubación a 22 °C. +, reacción positiva; -, reacción negativa; (+), reacción positiva débil; F, fermentativa. Datos recogidos de Magariños (1995).

Test	Resultados	Test	Resultados
Tinción Gram	-	Triptófano deaminasa	-
Tinción bipolar	+	β-galactosidasa (ONPG)	-
Movilidad	-	Ureasa	-
Oxidasa	+	Gelatinasa	-
Catalasa	+	Elastasa	-
Rojo de Metilo	(+)	Lipasa (Tween 80)	-
Voges-Proskauer	+	Fosfolipasa	+
Producción de indol	-	Amilasa	-
Reducción de nitratos	-	Hemolisis de:	
Utilización de citrato	-	eritrocitos de cordero	-
Producción de H ₂ S	-	eritrocitos de trucha	-
O/F (glucosa)	F	Producción de ácido de:	
Gas de glucosa	-	Glucosa	+
Crecimiento a		Manosa	+
5 °C	-	Galactosa	+
15 °C	+	Fructosa	+
25 °C	+	Maltosa	-
37 °C	-	Sacarosa	-
Crecimiento en		Ramnosa	-
0% NaCl	-	Arabinosa	-
3% NaCl	+	Amigdalina	-
5% NaCl	-	Melibiosa	-
8% NaCl	-	Manitol	-
10% NaCl	-	Inositol	-
Crecimiento en		Sorbitol	-
TSA +2%NaCl	+	Glicerol	-
BHIA +2%NaCl	+	Resistencia a:	
Agar marino	+	Agente vibriostático 0/129	-
TCBS	-	novobiocina	-
Agar McConkey	-		
Arginina dihidrolasa	+		
Lisina decarboxilasa	-		
Ornitina decarboxilasa	-		

El hecho de que presentara caracteres comunes con especies de los géneros *Vibrio* (*V. anguillarum*) y *Aeromonas* (*A. salmonicida*) planteó la posibilidad de que esta bacteria estuviera más cercana a la Familia *Vibrionaceae*; sin embargo, el no presentar crecimiento en el medio selectivo TCBS, y el hecho de ser inmóvil motivaron que se siguiera incluyendo dentro del género *Pasteurella*. Apoyando de nuevo la inclusión en este género, el perfil cromatográfico de los ácidos grasos de su membrana plasmática reveló una mayor similitud con especies clínicas de *Pasteurella*, que con especies de *Vibrio* y *Aeromonas* (Romalde *et al.*, 1995).

En 1990, utilizando técnicas de hibridación DNA-rRNA (De Ley, 1990), se concluye que *Pasteurella piscicida* es un miembro de la familia *Vibrionaceae*; al estar estos estudios realizados con una única cepa, esta designación no cobra fuerza hasta que Nicolas *et al.* (1994), basándose en estudios de RNA ribosómico, incluyen a *Pasteurella piscicida* como una subespecie nueva de *Vibrio damsela*.

Debido a esta gran controversia en cuanto a su designación, *Pasteurella piscicida* no figuró en ningún momento en la *Approved List of Bacterial Names* (Skerman *et al.*, 1989), y fue en 1995, como veremos al hablar de la subespecie *damselae*, cuando Gauthier *et al.* (1995) en base a nuevos experimentos, ubican definitivamente esta bacteria como *P. damsela* subsp. *piscicida* a la vez que establecen también la posición taxonómica de la subespecie *damselae*.

1.1.7. Diagnóstico del agente causal

El diagnóstico presuntivo de la enfermedad se basa en el aislamiento, a partir de los órganos internos del pez en medios BHIA, TSA-1 o agar sangre de bacilos gram negativos, inmóviles, oxidasa positivos, que fermentan la glucosa sin producción de gas y que presentan un requerimiento obligado de NaCl. De forma paralela, el sistema comercial API 20E proporciona información de utilidad en la identificación de este patógeno, con un perfil característico para todas las cepas (Magariños *et al.*, 1992a).

La detección por métodos serológicos utilizando anticuerpos policlonales obtenidos en conejos previamente inmunizados con células formolizadas de *P. damsela* subsp. *piscicida*, es generalmente una técnica eficaz para la detección y el diagnóstico de esta bacteria. Este tipo de ensayos, han llevado a la conclusión de que todos los aislados presentan características antigénicas comunes, independientemente de su origen geográfico. De este modo *P. damsela* subsp. *piscicida* puede considerarse un

taxón serológicamente homogéneo, en el que no se pueden diferenciar serotipos (Magariños *et al.*, 1992a). Esto contrasta con *P. damsela* subsp. *damsela*, taxón en el que como mínimo se han llegado a diferenciar en aislados de peces hasta cuatro serogrupos diferentes (Fouz *et al.*, 1992).

Los ensayos de inmunofluorescencia directa utilizando anticuerpos anti *P. damsela* subsp. *piscicida* usando fluoresceína fueron introducidos por Kitao y Kimura (1974). Actualmente, existen diferentes kits comerciales para el diagnóstico de este patógeno. Algunos de ellos están basados en la aglutinación de micropartículas de látex recubiertas con anticuerpos de *P. damsela* subsp. *piscicida*, mientras que otros más recientes se basan en la aglutinación de micropartículas magnéticas, recubiertas asimismo con anticuerpos anti-antígenos de membrana de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Romalde *et al.*, 1999). Todos estos sistemas de detección han demostrado ser eficaces en el diagnóstico de la pasteurelosis en peces que, ya sea externa o internamente, no presentan los síntomas clínicos de la enfermedad, y que probablemente estén en fases tempranas de la infección, o bien puedan ser portadores asintomáticos.

También se han tratado de poner a punto métodos moleculares de detección de esta bacteria. Un primer intento se llevó a cabo utilizando para la detección un fragmento de DNA de 692 pares de bases (Zhao y Aoki, 1989), que finalmente demostró ser de utilidad únicamente para la detección de cepas japonesas aisladas de seriola. Aoki *et al.* (1995) diseñaron una pareja de cebadores para la detección por PCR de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Éstos resultaron finalmente no ser válidos para tal fin, ya que por un lado no se demostró su especificidad, y por otro la mayoría de las cepas utilizadas como controles negativos pertenecían a la familia *Pasteurellaceae*, ya que todavía se consideraba al agente causal de la pasteurelosis como *Pasteurella piscicida*.

Dos años después, estos mismos autores (Aoki *et al.*, 1997) publicaron dos nuevas parejas de cebadores que reconocen secuencias del plásmido pZP1. Dichos cebadores se evaluaron exclusivamente con cepas japonesas y americanas, y una de las dos parejas no rindió ningún producto de amplificación en la cepa americana ATCC 17911. Se ha demostrado que el contenido plasmídico de las cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* es diferente dependiendo del origen geográfico de los aislados (Magariños *et al.*, 1992b). Así, una detección basada en secuencias de plásmidos puede no ser de utilidad a la hora de detectar, con total seguridad, la presencia/ausencia del patógeno en distintas especies procedentes de diferentes áreas geográficas.

Posteriormente, el gen del rRNA 16S se utilizó con éxito como diana para la detección del agente causal de la pasteurelosis, si bien existía reacción cruzada con *P. damsela* subsp. *damsela* (Osorio *et al.*, 1999). Uno de los últimos intentos en la utilización de técnicas moleculares para la detección de *P. damsela*, se realizó diseñando un protocolo de Multiplex PCR. Por una parte, se diseñaron cebadores que amplifican específicamente un fragmento del gen ARNr 16S de *P. damsela*. Además, se incluyó una pareja de cebadores para el gen *ureC*, que demostró ser específico de la subsp. *damsela* con lo cual el patrón de fragmentos amplificados distingue a *P. damsela* subsp. *piscicida* de *P. damsela* subsp. *damsela* (Osorio *et al.*, 2000b).

En 2003 Rajan *et al.* diseñaron una pareja de cebadores basándose en secuencias que codifican la cápsula polisacáridica de *P. damsela* subsp. *piscicida* y la probaron en varias cepas de colección y aislados clínicos de los géneros *Vibrio* y *Photobacterium*, obteniendo de este modo un nuevo método de detección, que además resultó ser más barato y rápido que algunos de los anteriormente descritos.

1.1.8. Mecanismos de virulencia

P. damsela subsp. *piscicida* es una bacteria altamente patógena que no parece presentar demasiada especificidad en cuanto al hospedador que infecta, por lo que la pasteurelosis es una amenaza incluso para especies de peces en las que esta enfermedad no ha sido todavía descrita. Algunos autores han señalado diferencias acerca de la especial susceptibilidad de algunas especies de peces, por ejemplo dorada y lubina en función de la edad del pez (Noya *et al.*, 1995). Así, mientras que las doradas más pequeñas (menos de 5 g) son susceptibles a la enfermedad, los peces de más de 50 g son resistentes. Esto es debido a la labor realizada por los macrófagos, que pueden fagocitar y matar a las células bacterianas (Noya *et al.*, 1995; Skarmeta *et al.*, 1995). La virulencia de los microorganismos patógenos, como es el caso de esta bacteria, es decir, su capacidad para producir morbilidad y mortalidad, es un complejo proceso multifactorial, que requiere la acción coordinada de muchos genes. En el caso de *P. damsela* subsp. *piscicida*, se desconocen muchos aspectos relativos a la virulencia, sobre todo al nivel molecular, aunque sí se han descrito otros.

La invasividad y la adherencia a las células del hospedador son esenciales en los primeros estadios de la infección. A pesar de que *P. damsela* subsp. *piscicida* parece tener poca capacidad de adherencia a diferentes líneas celulares probadas, sí mostró

eficiencia en la unión a intestinos de peces, donde se encontraron valores que oscilaron entre 10^4 y 10^5 células por gramo de tejido (Magariños *et al.*, 1996b). De todos modos, a pesar de ser una bacteria moderadamente invasiva, ha demostrado ser capaz de sobrevivir durante varios días en el interior de las células del hospedador, e incluso diseminarse hacia células adyacentes (Magariños *et al.*, 1996b).

Los productos extracelulares (ECPs) secretados por una amplia variedad de bacterias patógenas de peces, constituyen importantes factores de virulencia, ya que pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad en términos de nutrición bacteriana o agresinas, permitiendo a la bacteria superar los mecanismos de defensa del hospedador (Toranzo y Barja, 1993). Los ECPs de *P. damsela* subsp. *piscicida* han demostrado ser letales para ratones y para diferentes especies de peces (Magariños *et al.*, 1992b), y entre sus actividades más destacables se encuentran la citotóxica, la fosfolipasa y la hemolítica. Existen estudios histológicos que relacionan estas actividades, en particular la de la fosfolipasa con la patogenicidad de esta bacteria (Noya *et al.*, 1995).

La implicación del material polisacárido capsular (CPS) en la virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* ha sido claramente demostrada realizando infecciones experimentales de peces, en las que se utilizaron formas tanto capsuladas como acapsuladas de la misma. La inducción de la producción de material capsular en las formas sin cápsula incrementaba su resistencia a la acción bactericida del suero del pez, y hacía que su dosis letal 50 (LD₅₀) disminuyera alrededor de 2 ó 3 unidades de logaritmo (Magariños *et al.*, 1996a). También se han realizado estudios que demuestran que la cantidad de cápsula de *P. damsela* subsp. *piscicida* varía según la edad del cultivo bacteriano, y que el hierro juega un papel regulador en la expresión de los CPS de este patógeno (do Vale *et al.*, 2001). Estudios recientes han demostrado que la producción en esta bacteria de ECPs altamente tóxicos, es mayor *in vivo* que *in vitro* (Bakopoulos *et al.*, 2004). Estos autores también demostraron que existen proteínas de la envuelta bacteriana que se expresan únicamente *in vivo*, información que es de especial importancia, sobre todo a la hora de diseñar una vacuna eficaz contra *P. damsela* subsp. *piscicida*.

La capacidad de captar hierro es esencial para el crecimiento de las bacterias patógenas en el interior del hospedador, y por lo tanto para producir la infección. En *P. damsela* subsp. *piscicida*, ha sido descrita la presencia de un mecanismo capaz de captar hierro, consistente en un sistema de sideróforos química y biológicamente relacionados con la multocidina de *Pasteurella multocida* y al menos, tres proteínas de

membrana externa reguladas por hierro (IROMPs) (105, 118 y 145 kDa) (Magariños *et al.*, 1994c). (Se realizará una descripción detallada de este sistema en el capítulo VI).

Se ha descrito también la capacidad de *P. damsela* subsp. *piscicida* para utilizar hemina directamente como única fuente de hierro, y que la inyección intraperitoneal de hemina, antes de la infección experimental de los peces con la bacteria, incrementa la letalidad de este patógeno (Magariños *et al.*, 1994c). Precisamente, y como se verá en su desarrollo, uno de los objetivos de esta tesis, ha sido la caracterización del sistema responsable de la captación de hemina en esta bacteria.

Recientemente, do Vale *et al.* (2005) describieron que muchas cepas virulentas de *P. damsela* subsp. *piscicida* producen una exotoxina de 56 kDa, denominada AIP56, codificada en un plásmido. Esta exotoxina se secreta en grandes cantidades al medio externo, y demostró tener la capacidad de inducir apoptosis en macrófagos y neutrófilos de lubina. En el mismo trabajo, estos autores también describen que AIP56 induce una importante respuesta inmunitaria en lubina, lo cual sugiere que esta proteína podría ser utilizada con éxito en el diseño de una vacuna para prevenir la pasteurelosis en peces.

1.2. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*

P. damsela subsp. *damsela* (anteriormente *Listonella* o *Vibrio damsela*) ha sido descrita en varias ocasiones como la responsable de causar infecciones severas en humanos, y de estar implicada en algunos procesos patológicos en diversos animales marinos.

Fue aislada por primera vez en 1981 por Love *et al.* (1981) a partir de úlceras de la piel de pez ángel “damselfish” (*Chromis punctipinnis*). Posteriormente, el mismo microorganismo fue aislado no sólo asociado a enfermedades de tipo ulceroso en poblaciones de otros peces como dorada, lubina o rodaballo, sino también de reptiles, crustáceos y algunas especies de moluscos (Buck *et al.*, 1991; Fouz *et al.*, 1992).

Los síntomas clínicos externos más destacables en peces son la distensión abdominal, la presencia de áreas hemorrágicas alrededor de ano, ojos y boca y en ocasiones úlceras cutáneas. Estos signos son similares a los producidos por *Yersinia ruckeri* en salmónidos. Internamente, se observa una acumulación de fluido hemorrágico dentro de la cavidad peritoneal (Fouz *et al.*, 1992).

En humanos, esta bacteria causa desde infecciones ulcerosas externas hasta septicemias generalizadas que llevan a la muerte del individuo por fallo total de algunos sistemas vitales (Clarridge y Zighelboim-Daum, 1985; Asato y Kanaya, 2004; Yamane *et al.*, 2004).

Inicialmente, *P. damsela* subsp. *damsela* fue incluida dentro de la familia *Vibrionaceae* en base a estudios filogenéticos del rRNA 5S. McDonell y Colwell propusieron en 1985 la creación de un nuevo género denominado *Listonella*, para englobar a los organismos *Vibrio anguillarum*, *V. damsela* y *V. pelagius* por compartir una historia evolutiva lo suficientemente diferente a otros representantes del género *Vibrio* (McDonell y Colwell, 1985). Posteriormente, y con el argumento de que no habían sido incluidas en este estudio las secuencias de rRNA de vibrios estrechamente relacionados con los anteriores, como *V. ordalii* y *V. tubiashii*, Nearhos y Fuerst (1987) contradicen esta designación; años después Urdaci *et al.* (1990), analizan los perfiles de los ácidos grasos de 22 especies diferentes de vibrios, y el análisis que realizan en concreto con estas tres especies, revela que dichos perfiles son muy diferentes entre sí y que constituyen un grupo heterogéneo.

En 1995 Gauthier *et al.* (1995) realizan un estudio comparativo de las dos subespecies de *P. damsela* (*piscicida* y *damsela*). Estos autores llevan a cabo no sólo la secuenciación de los genes de rDNA 16S, sino que además realizan experimentos de hibridación DNA-DNA; observaron así que ambos taxones compartían la misma secuencia de rDNA 16S excepto en una posición, y que la homología entre sus DNAs era superior al 80%, superándose el 70% considerado como valor mínimo para asignar dos taxones a la misma especie (Goebel y Stackebrandt, 1994). Estos datos fueron corroborados posteriormente, cuando Osorio *et al.* (1999) realizan la secuenciación del rDNA 16S de 19 cepas de la subespecie *piscicida* y 10 de la subespecie *damsela*, y encuentran un porcentaje de similitud de un 100% entre ellas. El análisis comparativo entre ambas subespecies de otras regiones del genoma, también mostró que existe un elevado porcentaje de similitud genética entre las dos subespecies. Tal es el caso de las regiones intergénicas entre los genes ribosómicos (Osorio *et al.*, 2004a, 2005) o genes reguladores como el *toxR* (Osorio y Klose, 2000). Esta alta similitud genética entre ambas subespecies, creó la necesidad de buscar un método de detección basado en PCR que las discriminara sin posibilidad de falsos positivos por reacciones cruzadas (Osorio *et al.*, 2000).

El último ajuste que hubo en cuanto al nombre de esta bacteria fue en 1997 (Truper y De'Clari, 1997) y consistió en la corrección de *damsela* a *damselae*, su genitivo, y que es un derivado latinizado de la palabra inglesa *damsel*fish.

Todos los estudios reseñados, dejan la puerta abierta a investigaciones futuras en busca de “pistas genéticas” que nos puedan revelar cómo se fue produciendo la separación o especiación de ambas subespecies.

A pesar de esta alta similitud genética, ambas subespecies presentan importantes diferencias fenotípicas (Tabla I.2) y serológicas, y patrones de proteínas totalmente diferentes. Además, mientras que los análisis de las proteínas totales en geles de poli-acrilamida desnaturalizantes muestran que todas las cepas de la subespecie *piscicida* son muy homogéneas entre sí (Magariños *et al.*, 1992a), cada cepa de la subespecie *damselae* presenta un patrón de proteínas diferente (Fouz *et al.*, 1992).

Tabla 1.2.-Principales caracteres fenotípicos diferenciales entre *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. (V), color verde en medio TCBS. Datos recogidos de Osorio (1999).

Carácter	<i>Photobacterium damsela</i>	
	subsp. <i>piscicida</i>	subsp. <i>damsela</i>
Movilidad	-	+
Tinción bipolar	+	-
Nitrato reductasa	-	+
Crecimiento en TCBS	-	+ (V)
Gas de glucosa	-	+
Lipasa	-	+
Amilasa	-	+
Crecimiento en 5% de ClNa	-	+
Producción de ácido de Maltosa	-	+
Crecimiento a 37° C	-	+
Hemólisis de eritrocitos de:		
cordero	-	+
trucha	-	+
		Peces
		Moluscos
		Crustáceos
Hospedadores	Peces	Mamíferos
		Reptiles
		Hombre
Diversidad Serológica	Sí	No

1.3. El hierro en los microorganismos

Las células de todos los seres vivos, y por lo tanto también de los microorganismos, dependen de la biodisponibilidad de hierro para realizar un amplio rango de funciones, tanto metabólicas como de señalización celular. El hierro tiene la capacidad de adoptar dos formas iónicas cargadas positivamente (Fe^{+2} y Fe^{+3}) cuyos potenciales redox varían dependiendo de las moléculas a las que el hierro se una. Esta flexibilidad, hace que el hierro sea el mediador redox más utilizado en la biología celular, y que tanto en su forma libre, como incorporado en grupos hemo, sea el centro catalítico de la mayoría de los enzimas implicados en las reacciones de oxidación-reducción, esenciales en procesos celulares vitales, tales como el transporte electrónico, la activación del oxígeno, la reducción del peróxido, la síntesis de nucleótidos y aminoácidos, la síntesis de DNA y la fotosíntesis (Griffiths, 1987).

1.3.1. Disponibilidad de hierro para los microorganismos

A pesar de que el hierro es uno de los metales más abundantes en la corteza terrestre, superado sólo por el aluminio (Neilands, 1973), y de que las células necesitan concentraciones relativamente bajas para crecer, no está biológicamente disponible en la mayoría de los medios. En los medios aerobios inorgánicos, el ión ferroso (Fe^{+2}) se oxida rápidamente a la forma trivalente (Fe^{+3}) y forma complejos de hidróxido férrico que tienen una solubilidad extremadamente baja. La biodisponibilidad de hierro, cae entonces hasta niveles de 10^{-18} M, demasiado bajos para permitir el crecimiento bacteriano (Neilands *et al.*, 1987).

La cantidad de hierro en el cuerpo de los vertebrados es bastante elevada, del orden de 4 a 5 gramos por ejemplo en el hombre (Bagg y Neilands, 1987); cuando el hierro está en su forma reducida (Fe^{+2}), activa la denominada reacción de Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1984) ($\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{OH}^- + \text{OH}$), permitiendo la reducción parcial del oxígeno y formando radicales hidroxilo, que tienen una gran capacidad de causar daño a la mayoría de las macromoléculas. Por ello, en los fluidos corporales de los vertebrados, existen una serie de moléculas (fundamentalmente proteínas) enlazantes de este elemento, que hacen que la cantidad del mismo en estos fluidos sea del orden de 10^{-18} M, lo que está muy por debajo de lo necesario para el crecimiento bacteriano (Bullen, 1981; Griffiths, 1987; Wienk *et al.*, 1999). Estas

proteínas enlazantes de hierro reciben el nombre genérico de transferrinas, y en este grupo se agrupan la lactoferrina, la transferrina, la ferritina, la ovotransferrina, etc. La homeostasis del hierro está por lo tanto estrictamente regulada, y prácticamente no existe hierro libre en los organismos.

1.3.2. Importancia del hierro para los microorganismos

El hierro es un componente esencial para el desarrollo de todos los microorganismos, con la única excepción de las bacterias del ácido láctico (Archibald, 1983) ya que carecen de citocromos y de otras proteínas con grupos hemo. Las concentraciones de este elemento que son necesarias están comprendidas en general entre 0,4 y 4 μM (Robins-Browne *et al.*, 1987), aunque pueden variar en función del tipo de microorganismo.

La importancia del hierro se basa en primer lugar en su papel en la replicación del DNA, ya que funciona como cofactor para los enzimas que catalizan el paso de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos (Griffiths, 1987). También participa en la biosíntesis de clorofila en organismos fotosintéticos y grupos hemo en los no sintéticos (Light y Clegg, 1974), de compuestos aromáticos (McCandliss y Hermann, 1978), y es parte de algunas proteínas que intervienen en procesos de oxidación-reducción (Light y Clegg, 1974).

Diversos determinantes de virulencia bacterianos, están regulados por las concentraciones de hierro libre del medio. Así, tenemos el caso de la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* 1, cuyos niveles se incrementan cuando se produce un déficit en la cantidad de hierro disponible (Payne, 1989), la toxina de *E. coli* similar a la Shiga (Calderwood y Mekalanos, 1987) o la toxina diftérica de *Corynebacterium diphtheriae* (Pappenheimer, 1955). En *V. cholerae* se han identificado también diversos factores de virulencia regulados por hierro (Goldberg *et al.*, 1990). Se ha demostrado asimismo que la reducción de los niveles de hierro en individuos afectados por *Mycobacterium tuberculosis* es eficaz en la reducción de la viabilidad y supervivencia de esta bacteria (Cronje y Bornman, 2005).

Uno de los factores de virulencia con los que cuentan las bacterias, es la capacidad de producir hemolisinas. Al liberarlas al medio, provocan la lisis de los eritrocitos, y consiguen así una fuente adicional de hierro. La producción de estas hemolisinas está en algunos casos relacionada con la cantidad de hierro presente en el

medio, como ocurre en casos como el de *Serratia marcescens* (Poole y Braun, 1988), donde la síntesis de hemolisinas está regulada por hierro a nivel de la transcripción, o el de *V. cholerae* (Stoebner y Payne, 1988) o *Streptococcus sp.* (Griffiths, 1989).

El hierro juega también un papel significativo en la morfología bacteriana. Así, por ejemplo, en *P. damsela* subsp. *piscicida*, se demostró la dependencia entre la síntesis de la cápsula con la cantidad adecuada de polisacáridos, y las cantidades de hierro disponibles en el medio (do Vale *et al.*, 2001). Diversas modificaciones en la morfología bacteriana en condiciones de déficit de este metal se han observado también en *V. parahaemolyticus* (McCarter y Silverman, 1989).

1.3.3. Mecanismos de captación de hierro

Como consecuencia de lo anteriormente expuesto, numerosos ambientes que parecen abundantes en hierro en realidad contienen una concentración de hierro libre inferior a la considerada indispensable para el crecimiento óptimo de los microorganismos (Neilands, 1995). La baja disponibilidad de hierro libre dificulta, pero no impide el crecimiento y la patogenicidad bacteriana, ya que los microorganismos han desarrollado una serie de mecanismos que les permiten extraer el hierro del hospedador y de los polímeros insolubles del ambiente y competir con otros microorganismos en diversos hábitats, compartiendo el mismo espacio.

A. Adquisición de hierro mediante modificación del ambiente

La afinidad de la transferrina por la forma ferrosa del hierro es varios órdenes de magnitud inferior a la afinidad por la forma férrica. Por ello, algunas bacterias utilizan procesos reductivos para la captación de hierro. *Streptococcus mutans* acopla una flavín-reductasa asociada a membrana con un transportador de iones ferrosos. *Lysteria monocytogenes* sintetiza una reductasa férrica asociada a superficie (que puede ser también secretada al ambiente) para extraer el hierro de la ferritina, transferrina y lactoferrina. Recientemente, se han caracterizado ferri-reductasas secretadas por *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa* (Schroder *et al.*, 2003).

El crecimiento de *Clostridium perfringens in vivo*, desencadena una disminución progresiva generalizada del potencial redox de los tejidos infectados. Estas condiciones

extremadamente reductoras así como la acidificación, facilitan la liberación del hierro de la transferrina (Ratledge y Dover, 2000).

B. Adquisición de hierro mediante sistemas de transporte de iones ferrosos

El transporte de iones ferrosos persiste en muchas bacterias aunque no tengan sistemas de reducción de hierro externo. En consecuencia, este sistema sólo parece ser útil en ciertos ambientes como por ejemplo los anaerobios, donde el hierro está disponible en su forma reducida. El operón *feoAB* de *E. coli* está regulado por la fumarato nitrato reductasa y por el represor Fur (Ferric Uptake Regulator). Los mutantes Feo de *E. coli* son defectivos en la colonización del intestino de ratones (Hantke, 2003), indicando la importancia de la captación de este ión en los procesos infectivos.

C. Obtención de hierro mediada por sideróforos

Los sideróforos (del griego *sideros phoros* “portadores de hierro”) son moléculas de bajo peso molecular (500-1.000 Da) con grupos funcionales que coordinan los iones férricos con elevada afinidad (del orden de 10^{30} o superior) y especificidad (Figura I.1). La afinidad de los sideróforos por el hierro es lo suficientemente alta como para permitirles competir eficientemente *in vivo* con la ferri-transferrina, la ferri-lactoferrina y la ferritina, y en ambientes terrestres o acuáticos con los hidróxidos férricos. Los sideróforos en general no pueden extraer el hierro de las hemoproteínas (Neilands, 1995; Crosa y Walsh, 2002). La unión específica permite discriminar el hierro del aluminio, el calcio, el cobre o el zinc, más abundantes en la naturaleza (Tilbrook y Hider, 1998).

Los sideróforos son sintetizados y secretados por multitud de bacterias, hongos y plantas monocotiledóneas aunque algunos, como por ejemplo las micobactinas de las micobacterias, permanezcan anclados a la membrana externa mediante largas cadenas alifáticas (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003). Además, ven incrementada su síntesis cuando el microorganismo se encuentra en un entorno pobre en hierro (Ratledge y Dover, 2000).

D. Obtención de hierro a partir de transferrinas

Las transferrinas son un grupo ubicuo de proteínas, presentes en todos los vertebrados, que presentan como característica especial una alta afinidad por el Fe^{+3} . Son moléculas de peso molecular comprendido entre 75 y 80 kDa, en las que se puede distinguir un dominio N-terminal y otro C-terminal, no poseen estructura cuaternaria y se caracterizan por presentar dos lóbulos unidos a través de un péptido “puente” (Ratledge y Dover, 2000). Todas ellas unen dos Fe^{+3} por molécula de proteína (Bezkorovainy *et al.*, 1987).

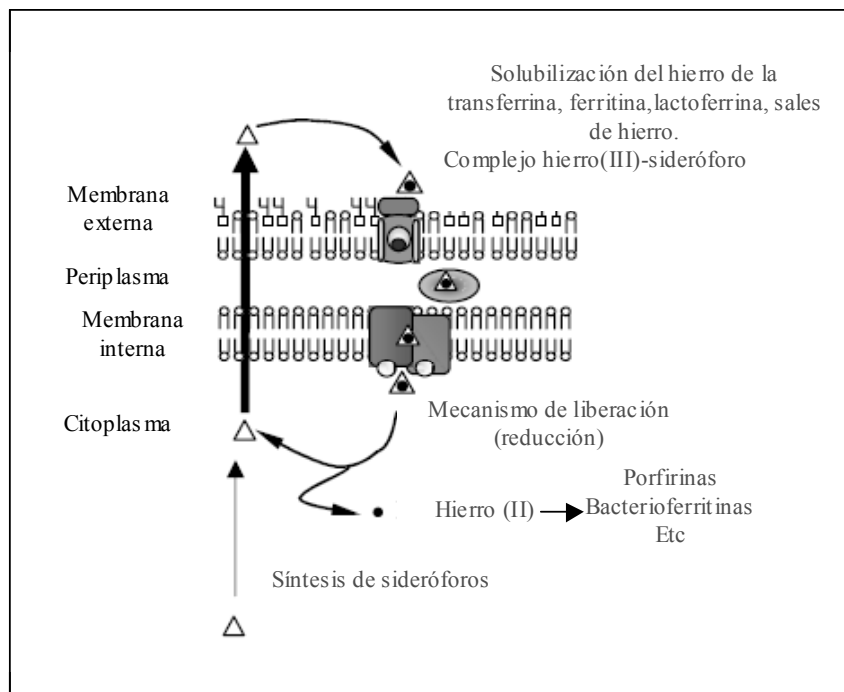


Figura I.1.-Esquema del transporte de hierro (III) mediado por sideróforos en una bacteria Gram negativa. Modificado de Ratledge y Dover (2000). La célula sintetiza y secreta sideróforos en respuesta a las condiciones de privación de hierro. El sideróforo solubiliza el hierro de las distintas fuentes que lo contienen, y el complejo ferri-sideróforo es internalizado al citoplasma. El hierro es frecuentemente liberado mediante reducción y el ion ferroso se incorpora a varias proteínas. En algunos casos el sideróforo es reciclado y secretado al exterior.

La obtención de hierro a partir de las transferrinas, aparte de mediante la producción de sideróforos, tiene lugar mediante tres posibles mecanismos:

1. Por ruptura proteolítica de las glicoproteínas; mecanismo que opera en *Bacteroides* sp., microorganismo que además presenta la capacidad de degradar otras proteínas plasmáticas como la albúmina y la hemopexina (Carlsson *et al.*, 1984).

2. Por reducción enzimática de Fe^{+3} a Fe^{+2} , seguido de su liberación de la proteína; la reducción parece ser el sistema empleado por *Lysteria monocytogenes*, que secreta *in vitro* un agente reductor soluble, capaz de retirar el hierro del complejo Fe^{+3} -glicoproteína (Coward y Foster, 1985).

3. A través de la interacción directa entre receptores de la superficie bacteriana y el complejo Fe^{+3} -glicoproteína; es el utilizado por numerosos patógenos, entre ellos *Neisseria* y *Haemophilus*. Simonson *et al.* (1982) demostraron que los meningococos (*N. meningitidis*) sometidos a déficits de hierro, eran capaces de obtenerlo a partir del complejo Fe^{+3} -transferrina humana mediante una interacción directa con la superficie bacteriana, ya que cuando la proteína se mantenía separada de las células por una membrana de diálisis, la bacteria era incapaz de crecer. Algo semejante ocurre en *Haemophilus* sp., en el que tampoco tiene lugar la síntesis de sideróforos (Morton y Williams, 1990), sino que parece existir una interacción directa entre la transferrina y la superficie bacteriana.

E. Obtención de hierro a partir de ferritinas

La ferritina se encarga del almacenamiento del hierro, y al igual que la transferrina, es una proteína presente en muchos organismos (animales, plantas, hongos y bacterias) (Theil, 1987). La ferritina almacena el hierro en el interior de las células, de forma que éste se encuentra disponible en forma soluble, para usarse cuando el metabolismo celular lo requiera (Harrison y Arosio, 1996). Pero además de mantener la homeostasis celular para este metal, la ferritina tiene también un efecto protector sobre las células, pues almacena hierro en una forma inocua evitando que intervenga en reacciones que podrían dar lugar a radicales libres (Chasteen y Harrison, 1999). No existen evidencias de que las ferritinas sean usadas como fuentes de hierro en las bacterias; sin embargo, se ha descrito que la ferritina exógena es reducida por *Listeria monocytogenes* (Deneer *et al.*, 1995) y que la adición de ferritina a *Pasteurella multocida* produce cambios en su expresión génica (Paustian *et al.*, 2002).

F. Utilización del citrato como transportador de hierro

El citrato constituye el principal componente de bajo peso molecular que une hierro en el suero humano (Sarkar, 1970) y además se considera que juega un papel importante en la transferencia de hierro entre las transferrinas (Bates *et al.*, 1967). Son varios los microorganismos que pueden utilizar el citrato como transportador de hierro al interior de las células. El caso mejor estudiado es el de *E. coli* (Frost y Rosenberg, 1973), en la que se trata de un sistema inducido por el citrato en el que participan un receptor de membrana (FecA) (Wagegg y Braun, 1981) y varias proteínas situadas en la membrana citoplasmática (FecC, D y E) y en el periplasma (FecB) (Pressler *et al.*, 1988). Estas proteínas son transcritas secuencialmente a partir del operón *fecABCDE* (Van Hove *et al.*, 1990). La proteína TonB también es necesaria para el transporte de citrato férrico a través de la membrana externa (Zimmermann *et al.*, 1984). Además existen dos genes denominados *fecI* y *fecR* situados corriente arriba del operón *fecABCDE*, que también intervienen en el proceso (Van Hove *et al.*, 1990).

También ha sido descrito un sistema de transporte de citrato férrico inducible en presencia de citrato en *Listeria monocytogenes* (Adams *et al.*, 1990), aunque se conoce poco de su funcionamiento. En *Pseudomonas aeruginosa* también el citrato sirve como transportador de hierro, pero a diferencia de *E. coli* no es inducible en presencia de este elemento (Harding y Royt, 1990). Igualmente ocurre en *V. anguillarum* (Mazoy *et al.*, 1997), en *Mycobacterium smegmatis* (Messenger y Ratledge, 1982) y en *Bradyrhizobium japonicum* (Guerinot *et al.*, 1990). También utilizan el citrato férrico como fuente de hierro otros microorganismos como *Neisseria meningitidis* (Archibald y DeVoe, 1979) y *Vibrio cholerae* (Sigel *et al.*, 1985).

G. Obtención de hierro a partir de los grupos hemo

En los últimos años, han sido numerosas las descripciones de microorganismos que utilizan como fuente de hierro los grupos hemo aprovechando su abundancia tanto en los fluidos como en los tejidos del hospedador; para ello, las bacterias han desarrollado una serie de estrategias que les proporcionan una ventaja con respecto a otros microorganismos incapaces de utilizarlo.

Los mecanismos bacterianos de captación de hemo se dividen en dos grandes grupos, dependiendo de si existe unión directa entre el grupo hemo y los receptores de

membrana externa TonB dependientes, o de si en la adquisición intervienen un tipo de proteínas solubles denominadas hemóforos, que después de interaccionar con la hemoproteína entran en contacto con la superficie celular, donde interaccionan con el receptor TonB dependiente (Wandersman y Delepelaire, 2004).

1.4. Los mecanismos de captación de hierro como factor de virulencia

La importancia de la disponibilidad de hierro en el medio para disminuir o anular la resistencia normal del hospedador e incrementar la virulencia bacteriana ha sido demostrada repetidamente en infecciones experimentales en las que se probaron al menos 18 especies bacterianas diferentes (Griffiths, 1999). El mejor modo de valorar la implicación de un determinado sistema de captación de hierro en la virulencia de un patógeno bacteriano es la construcción de mutantes de los genes que codifican las proteínas que integran estos sistemas, tarea que no se ha podido llevar a cabo en muchos microorganismos (Ratledge y Dover, 2000).

La virulencia de las cepas de *E. coli* y otras bacterias entéricas es fuertemente potenciada por la presencia del sistema del sideróforo aerobactina, ya sea de codificación cromosómica o plasmídica (pColV-K30) (Williams, 1979). Asimismo, cepas de *Yersinia enterocolitica*, *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* altamente patogénicas poseen un *cluster* de genes para la síntesis y el transporte del sideróforo yersiniabactina. Las cepas no patógenas carecen de estos genes, que son esenciales para causar virulencia en ratón (Heesemann *et al.*, 1993).

Otros experimentos demostraron que la inyección de citrato de amonio férrico previa a la infección, es capaz de reducir drásticamente la LD₅₀ de *V. vulnificus* en ratones (Wright *et al.*, 1981). Asimismo, la virulencia del patógeno de peces *V. anguillarum* depende en gran medida de la producción del sideróforo anguibactina, cuyo sistema de biosíntesis y transporte está codificado en el plásmido pJM1 (Crosa *et al.*, 1980).

De este modo, se puede afirmar que en gran medida la resolución de una infección bacteriana será el resultado de una competición por el hierro entre el individuo hospedador y el microorganismo invasor (Bullen *et al.*, 2005).

La gran mayoría de las especies bacterianas responden a la privación de hierro regulando, de forma coordinada, no sólo la expresión de las proteínas implicadas en la

homeostasis del hierro, sino que además se ven afectados un número de factores de virulencia, entre ellos varias toxinas: Shiga-like 1 de *E. coli*, toxina diftérica de *Corynebacterium diptheriae*, exotoxina A de *P. aeruginosa*, hemolisinas, elastasas y proteasas alcalinas (Litwin y Calderwood, 1993a; Vasil y Ochsner, 1999).

De todos modos, es importante tener en cuenta que los factores de virulencia pueden estar controlados simultáneamente por varios reguladores de respuesta a diferentes parámetros. Son de destacar la temperatura, la osmolaridad, el pH, la disponibilidad de fuente de carbono, los niveles de oxígeno y la percepción de quórum (Finlay y Falkow, 1997).

Capítulo II

Objetivos

Capítulo II: Objetivos

Según lo expuesto en la Introducción General de esta tesis, es evidente que se necesita alcanzar un mayor conocimiento de las bases genéticas de la virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida*, así como de la diversidad genética intraespecífica.

Es por ello que en el presente estudio nos hemos marcado los siguientes objetivos:

1.- Identificar el gen *fur* (*ferric uptake regulator*) en *P. damsela*: analizar la divergencia genética entre las dos subespecies de *P. damsela* y con otros miembros de la familia *Vibrionaceae*.

2.- Identificar y caracterizar los determinantes genéticos del sistema de captación de hemo en *P. damsela*: Llevar a cabo la clonación, caracterización estructural y funcional de genes implicados en el transporte y utilización de los grupos hemo como fuente de hierro, analizar la regulación transcripcional y la diversidad genética intraespecífica.

3.- Caracterizar la base genética del sistema de captación de hierro mediada por sideróforos en *P. damsela* subsp. *piscicida*: clonación y caracterización de los genes responsables de la biosíntesis, transporte y utilización de sideróforos, y estudio de la diversidad intraespecífica de estos genes en *P. damsela*.

4.- Analizar el papel que los sistemas de asimilación de hierro juegan en el proceso infectivo de *P. damsela* subsp. *piscicida* en peces: Generar mutantes defectivos en los sistemas de captación de grupos hemo y de sideróforos, evaluar el efecto de las mutaciones en la virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida*, y estudiar la expresión *in vivo* de dichos genes.

5.- Estudiar la diversidad genética intra-subespecífica en *P. damsela* subsp. *piscicida*: Identificar las secuencias génicas específicas de cepas virulentas y analizar la diversidad genética de las poblaciones de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Para conseguir los objetivos que nos hemos propuesto en el presente estudio, se emplearon las cepas bacterianas que se describen en las tablas II.1, II.2 y II.3.

Tabla II.1.-Cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* usadas en este estudio.

	Cepa	Origen	País
1	DI21	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	España
2	B51	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	España
3	C1	Dorada	España
4	ATCC 17911	Perca (<i>Roccus americanus</i>)	USA
5	ATCC 29690	Seriola (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Japón
6	666.1	Lubina	Portugal
7	1083 1	Lubina	Francia
8	IT-2	Dorada	Italia
9	069A	Dorada	Grecia
10	069E	Dorada	Grecia
11	ATLIT 2	Híbrido de Seriola	Israel
12	2101	Híbrido de Lubina	Israel
13	MP7801	Seriola	Japón
14	EPOY-8803-II	Mero (<i>Epinephelus akaara</i>)	Japón
15	P3333	Seriola	Japón
16	MZS 8001	Seriola	Japón
17	P3335	Seriola	Japón
18	PC554.2	Lenguado (<i>Solea senegalensis</i>)	España
19	PC435.1	Lenguado	España
20	Lgh 41/01	Lenguado	España
21	Lgr 52/02	Lenguado	España
22	Lgb 53/02	Lenguado	España
23	Lgb 49/01	Lenguado	España
24	Pc 555.1	Lenguado	España
25	Pc 556.1	Lenguado	España
26	Pp.5	Lenguado	España
27	TW 515/02	Lenguado	España
28	EW 194/97	Lenguado	España
29	188/98	Lubina	Portugal
30	Nu no	Lubina	Portugal
31	Pc 610.1	Dorada	España
32	R.46	Dorada	España
33	Pc 267.1	Dorada	España
34	Pc 320.1	Dorada	España
35	91.197	Híbrido de Lubina	USA

Tabla II.2.-Cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* utilizadas en este estudio.

	Cepa	Origen	País
1	RG-205.2	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	España
2	RG-91	Rodaballo	España
3	RG-153	Rodaballo	España
4	RG-214	Rodaballo	España
5	RM-71	Rodaballo	España
6	LD-07	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	España
7	8/26.a	Dorada	España
8	340	Agua de mar	España
9	309	Mejillón (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	España
10	158	Anguila (<i>Anguilla anguilla</i>)	Bélgica
11	162	Anguila	Bélgica
12	PG-801	Camarón (<i>Penaeus monodon</i>)	Taiwan
13	J3G-801	Camarón	Taiwan
14	CDC 2227-81	Hombre	USA
15	ATCC 33539	Pez ángel (<i>Chromis punctipinnis</i>)	USA
16	192	Delfín (<i>Tursiops truncatus</i>)	USA
17	238	Delfín	USA
18	ATCC 35083	Tiburón (<i>Carcharinus plumbeus</i>)	USA

Tabla II.3.-Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este estudio.

Cepa	Características Relevantes	Fuente
DH5 α	<i>supE4 ΔlacU169 (ϕ80 lacZΔM15)</i> <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Stock del laboratorio
H1681	<i>thr ser fhuA lacy rpsL galK hsdR mcrA</i> <i>fhuF::λpLacMu fur-31 zbf::Tn10</i>	(Heidrich <i>et al.</i> , 1996)
101 ESD	Derivada de la HB101. Deficiente en la biosíntesis de enterobactina Δ (<i>entC-entA</i>)	Stock del laboratorio
H1717	<i>araD139 ΔlacU169 rspL150 relA1</i> <i>flb5301 deoC1 ptsF25 rbsR aroB</i> <i>fhuF::λ placMu</i>	(Hantke, 1987)
EB53	<i>aroB hemA</i>	(Eberspächer y Braun, 1980)
S17-1- λ -pir	<i>Tpr Smr recA, thi, pro, hsdR-M+RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λpir</i>	(Herrero <i>et al.</i> , 1990)

Capítulo III

Identificación y caracterización de los genes
fur en *Photobacterium damsela*

3.1. Introducción

Como ya se ha comentado en la introducción general, las bacterias han desarrollado diferentes sistemas para la captación de hierro del medio extracelular, dada la importancia de este elemento para su supervivencia, y como consecuencia de su baja biodisponibilidad en la mayoría de los ambientes bacterianos.

Sin embargo, concentraciones elevadas de hierro en el medio resultan tóxicas para los microorganismos, debido a que mediante la conocida como reacción de Fenton (Figura III.1), se forman radicales hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$) que son altamente tóxicos para las células (Halliwell y Gutteridge, 1984).

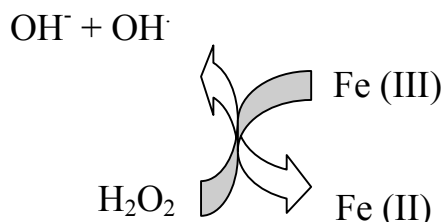


Figura III.1.-Reacción de Fenton.

Dado que en las bacterias no se han descrito bombas de excreción para el hierro (Ratledge y Dover, 2000), necesariamente han de poseer otros sistemas para controlar la homeostasis celular de este elemento. Dichos sistemas parecen centrados en la regulación de los mecanismos de importación a través de la membrana (Crosa, 1997).

Esta función de control es la que desarrolla la proteína Fur (*ferric uptake regulator*), que es un regulador transcripcional de casi todos los genes implicados en el transporte y la incorporación de hierro en función de la concentración intracelular existente, y que también regula otros sistemas no vinculados directamente con la adquisición de dicho metal (Tsolis *et al.*, 1995). Esto, unido al hecho de que parece ser una proteína ubicua en los procariotas, ha dado pie a que algunos autores la describan como un regulador global del metabolismo celular (Hall y Foster, 1996).

Los primeros indicios de la existencia de esta proteína se remontan a 1981, cuando Hantke *et al.* (1981) describieron un mutante de *Escherichia coli* que se comportaba como si todas las funciones conocidas inhibidas por el hierro (como la

biosíntesis de sideróforos o de algunas proteínas de membrana externa) estuvieran siendo expresadas constitutivamente. Este mutante, que se comportaba como otro descrito un tiempo antes en *Salmonella typhimurium* (Ernst *et al.*, 1978), fue denominado *fur* y el gen que poseía la mutación fue entonces localizado (Bagg y Neilands, 1985), clonado (Hantke, 1984) y secuenciado (Schaffer *et al.*, 1985), y la proteína Fur fue finalmente purificada (Wee *et al.*, 1988). En los últimos años, esta proteína ha sido descrita en numerosas especies bacterianas.

3.1.1. La proteína Fur

El tamaño de esta proteína oscila en los distintos microorganismos en los que se ha descrito, entre los 128 y los 160 aminoácidos. En el caso de *E. coli*, cuya proteína es sin duda la mejor estudiada a nivel estructural, tiene un peso molecular de 17 kDa (Bagg y Neilands, 1987; Saito *et al.*, 1991). En la proteína Fur se pueden identificar dos dominios perfectamente diferenciados. El dominio C-terminal, responsable de la unión con los iones metálicos (Fe^{+2} y Zn^{+2}) así como de las interacciones proteína-proteína que dan lugar a la dimerización, y el dominio N-terminal encargado del reconocimiento y el anclaje al DNA mediante un motivo de unión hélice-giro-hélice (*helix-turn-helix*) (Stojiljkovic y Hantke, 1995).

De hecho, el complejo Fe^{+2} -Fur, es el que tiene capacidad de unión a los operadores de los genes que están bajo su control (González de Peredo *et al.*, 2001). De esta forma, cuando la concentración intracelular de Fe^{+2} es suficientemente alta para permitir la formación de dicho complejo, tiene lugar la represión de la transcripción de los sistemas bajo este control. En el momento en que la cantidad de hierro disminuye, también lo hace el complejo Fe^{+2} -Fur, lo que libera las regiones operadoras y permite la expresión de las unidades transcripcionales encargadas de la importación de hierro, lo que permitirá el reestablecimiento de su concentración intracelular (Figura III.2) (Escolar *et al.*, 1999).

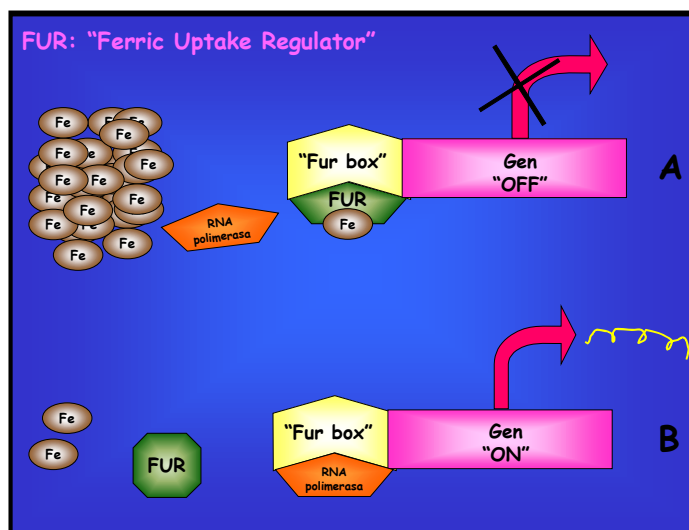


Figura III.2.-Mecanismo general de regulación mediante la proteína Fur.

La estructura secundaria prevista para la proteína Fur de *E. coli* está constituida por tres hélices α seguidas de cadenas β , siendo similares a las regiones de unión al DNA descritas para otros reguladores como CAP, LexA o DtxR (González de Peredo *et al.*, 2001). A pesar de que se han descrito varios mutantes *fur* (Coy y Neilands, 1991; Hall y Foster, 1996) y han sido purificadas unas cuantas variantes de la proteína, sigue sin estar claro cuáles son los aminoácidos que definen el lugar de unión al hierro, así como su implicación en la dimerización o en la interacción con el DNA.

La proteína Fur parece ser muy abundante en el interior de las células. En un experimento de sobreexpresión de la proteína Fur de *V. cholerae* que realizaron Watnick *et al.* (1997) se contaron unas 2.500 moléculas de la proteína durante la fase exponencial, número que ascendió a unas 7.500 cuando se alcanzó la fase estacionaria. Esta concentración tan elevada, contrasta con los niveles relativamente bajos que suelen encontrarse en otros reguladores. Esto podría estar relacionado por un lado con el alto número de genes controlados por Fur, pero también con la forma tan inusual con la que suele unirse al DNA (Escolar *et al.*, 1998). No obstante, también se ha postulado la posibilidad de que esta gran concentración intracelular de la proteína Fur pueda servir como almacén transitorio de hierro cuando su concentración es demasiado elevada (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999; Escolar *et al.*, 1999). Esta acción quelante permitiría, por un lado, evitar los efectos nocivos causados por el hierro libre, y a su vez mantenerlo

secuestrado hasta la síntesis de cantidades suficientes de ferritina u otras proteínas que incorporan hierro en su estructura (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999).

3.1.2. La caja Fur o “*Fur box*”

Como se dijo en el apartado anterior, cuando las concentraciones de hierro en el medio son altas, la proteína Fur se une al ión Fe^{+2} y adquiere una configuración adecuada para unirse a secuencias del DNA, inhibiendo así la transcripción de determinados genes y operones. La zona del DNA bacteriano donde se une la proteína Fur (Figura III.3) suele corresponder a una secuencia altamente conservada denominada caja Fur (*Fur box* o *Iron box*) (Figura III.4).

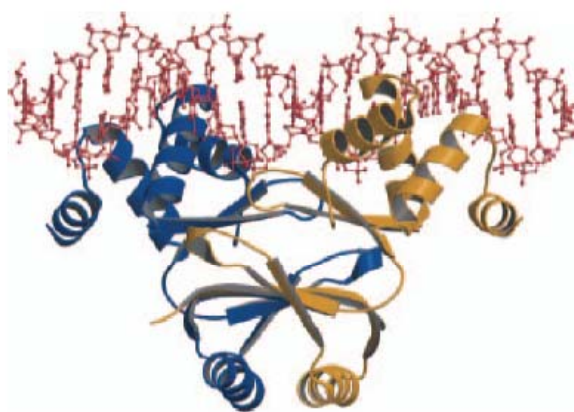


Figura III.3.-Modelo de unión de la proteína Fur a la región reguladora del DNA. Tomado de Pohl *et al.*, (2003).

La caja Fur se definió originalmente como una estructura palindrómica cuya secuencia consenso era GATAATGATAATCATTATC (De Lorenzo *et al.*, 1988). Estudios comparativos entre distintos genes regulados por la concentración de hierro, además de estudios de protección realizados con DNasa I, permitieron definir en *E. coli* una región consenso de 19 pb a la que se une la proteína Fur. La confirmación de que esta secuencia consenso era suficiente para funcionar como una región de unión a Fur *in vivo*, se llevó a cabo insertando un oligonucleótido sintético, conteniendo la secuencia

correspondiente a la propuesta como región consenso de unión de la proteína Fur, en un plásmido entre un promotor y el gen *lacZ*, y observando cómo la actividad β -galactosidasa se veía condicionada por las concentraciones de hierro del medio (Calderwood y Mekalanos, 1988). Además, se realizó una comparación de más de 30 secuencias de promotores regulados por hierro, que de nuevo confirmó que la secuencia descrita era la diana funcional de la proteína Fur.

Sin embargo, estudios posteriores mediante la técnica *hydroxyl radical footprinting* modificaron este concepto, y condujeron a una nueva interpretación. Así, la caja Fur se definió como una combinación de, como mínimo, tres repeticiones adyacentes de la secuencia $\text{NAT}^{\text{A/T}}\text{AT}$, como se muestra en la Figura III.4.

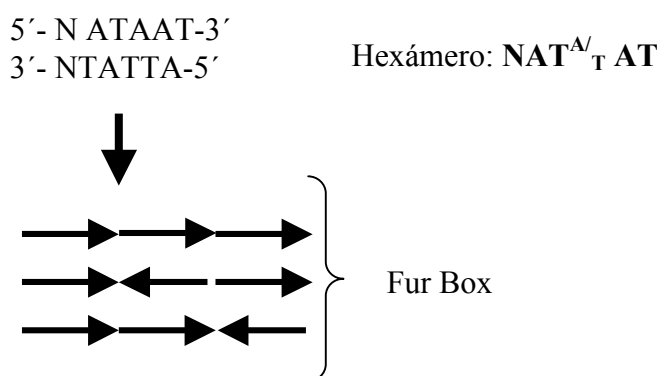


Figura III.4.-En la parte superior la secuencia de unión (Caja Fur) de la proteína Fur. En la parte inferior las distintas orientaciones en las que se puede encontrar esta secuencia en los promotores a los que se une dicho represor. Cada flecha corresponde a una unidad del hexámero (Escolar *et al.*, 1999).

Si bien es necesaria la existencia de como mínimo tres repeticiones del hexámero para permitir la unión estable de la proteína, la orientación en la que se encuentren no parece ser importante. Este tipo de secuencias de unión permitiría una gran variabilidad en las regiones promotoras reguladas, y toleraría en cierto modo cambios en éstas sin dar lugar a una desregulación del sistema (Escolar *et al.*, 1999).

Recientemente, se ha vuelto a revisar este concepto, basándose en estudios comparativos de las distintas regiones de DNA a las que se une la proteína Fur de *Bacillus subtilis*, y se ha propuesto que la caja Fur está formada por dos secuencias superpuestas de heptámeros repetidos e invertidos (Baichoo y Helmann, 2002). En la figura III.5 se muestra un esquema de las distintas interpretaciones de la caja Fur.

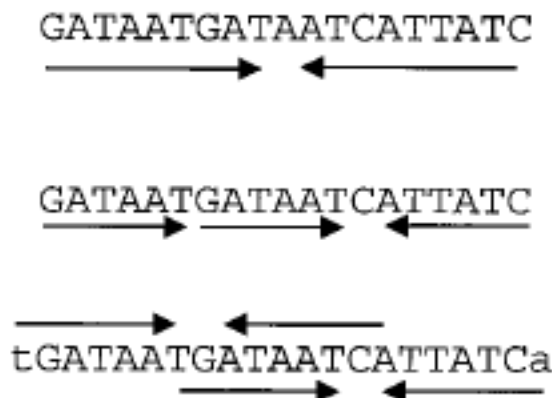


Figura III.5.-Esquema de las distintas reinterpretaciones descritas acerca de la caja Fur.

3.1.3. Regulación del gen *fur*

La regulación de la expresión del gen *fur* es bastante compleja. Por un lado la proteína Fur es autorregulable, ya que presenta una caja Fur en su región promotora. Además presenta una región de unión para el complejo cAMP-proteína represora del catabolito (De Lorenzo *et al.*, 1988), y este regulador refuerza la interacción entre el estado metabólico en que se encuentra la célula y la cantidad de hierro intracelular. Recientemente se ha observado la regulación de *fur* en respuesta al estrés oxidativo, y se han localizado dos cajas SoxR y OxyR en el promotor de *fur* (Zheng *et al.*, 1999), de forma que cuando los niveles de peróxido de hidrógeno o de iones superóxido son suficientes para su activación, aumenta la concentración intracelular de proteína Fur, paralizándose en primera instancia la entrada de hierro, que en caso de ser muy elevada podría ser dañina para la célula al generar lesiones en su DNA vía reacciones de Fenton. Esta regulación dual de la incorporación de hierro y la respuesta al estrés oxidativo, se ha visto también en eucariotas (Hantke, 2001).

3.1.4. El regulón Fur

Los genes regulados por la proteína Fur constituyen el llamado regulón Fur, habiéndose desarrollado diversas metodologías para identificar dichos genes:

*El ensayo FURTA (*Fur Titration Assay*) está basado en la utilización de una fusión génica entre el promotor del gen *fhuF*, regulado por Fur, y el gen *lacZ* (Stojiljkovic *et al.*, 1994). La introducción, en una célula que contenga dicha fusión insertada en el cromosoma, de una genoteca construida en un vector de alto número de copia, hace que si uno de los plásmidos es portador de un fragmento de DNA con un promotor que lleve una caja Fur, éste desplace completamente a la proteína Fur del promotor del gen *fhuF*, lo cual permite su expresión y la producción de β -galactosidasa fácilmente detectable cualitativamente en placas diferenciales (McConkey, EMB, X-Gal, etc).

*SELEX o selección cíclica de genes regulados por hierro (Ochsner y Vasil, 1996), basada en la filtración del DNA digerido de un microorganismo a través de una membrana donde está inmovilizada la proteína Fur. Seguidamente se purifican y amplifican los fragmentos retenidos en la membrana.

*Utilización de manganeso; se ha comprobado que a concentraciones muy elevadas el Mn^{+2} mimetiza la acción del hierro en su unión a Fur, provocando los mismos cambios conformacionales. Este sistema permite el aislamiento de mutantes *fur*, que serán los únicos que sobrevivan a altas concentraciones de Mn^{+2} . Si después se hace un estudio comparado de los patrones de proteínas en geles bidimensionales, entre las cepas mutantes y una cepa salvaje, podemos localizar genes regulados por hierro (Hantke, 1987).

*La aplicación de técnicas de genómica comparada ha permitido identificar nuevos genes del regulón Fur de *E. coli*, *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae* (Panina *et al.*, 2001).

3.1.5. Genes regulados por Fur

El estudio de los distintos genes regulados por Fur, ha revelado que esta proteína participa en diversas funciones, algunas de ellas no relacionadas directamente con el metabolismo del hierro.

3.1.5.1. Regulación de toxinas

La síntesis de diferentes toxinas, como la Shiga de *Shigella dysenteriae* o la toxina diftérica de *Corynebacterium diphtheriae* (Litwin y Calderwood, 1993), la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (Prince *et al.*, 1993), la hemolisina de *E. coli* (Frechon y Le Cam, 1994), o la de *Vibrio cholerae* (Stoebner y Payne, 1988) está regulada por la proteína Fur. Es muy probable que la liberación de toxinas y hemolisinas tenga como objetivo final el acceso a las distintas fuentes de hierro del organismo hospedador (Panina *et al.*, 2001). Así, en *V. cholerae*, cuando se detectan niveles bajos de hierro en el medio, aumenta mucho la síntesis de hemolisina, probablemente para liberar el hierro almacenado en la hemoglobina, y la síntesis de vibriobactina para captar hierro del exterior, habiéndose demostrado que estos procesos están regulados por la proteína Fur (Stoebner y Payne, 1988).

3.1.5.2. Síntesis de adhesinas o fimbrias

El gen *iha* de *Yersinia pestis* o de *E. coli* presenta una caja Fur, de forma que las proteínas, que son reguladores de la producción de adhesinas, se sintetizan cuando hay escasez de hierro en el medio, que, como en el caso anterior, podría ser el mecanismo identificador de la entrada en el hospedador (Karjalainen *et al.*, 1991).

3.1.5.3. Regulación de la quimiotaxis

La quimiotaxis parece jugar también un papel importante en la patogénesis de distintos microorganismos. Se ha destacado, por ejemplo, la presencia de cajas Fur en los promotores de los genes implicados en todos los procesos de regulación y transducción de señal de quimiotaxis tanto en *E. coli* como en *V. cholerae*, de lo que se ha deducido que en esta bacteria la quimiotaxis seguramente se induce en respuesta a condiciones restrictivas de hierro en el medio (Panina *et al.*, 2001).

3.1.5.4. Regulación de la respuesta a estrés oxidativo

Se ha descrito que la proteína Fur es capaz de interaccionar con los promotores de diferentes genes implicados en la detoxificación de los derivados reactivos del oxígeno. Así, las superóxido-dismutasas dependientes de manganeso, codificadas por el

gen *sodA* de *Salmonella typhimurium*, *E. coli* o *Pseudomonas aeruginosa* (Tsolis *et al.*, 1995) forman parte también del regulón Fur. Por otro lado, se ha demostrado que la superóxido dismutasa dependiente de hierro y codificada por el gen *sodB* (Touati *et al.*, 1995) está también controlada por Fur (Dubrac y Touati, 2000), aunque en este caso su síntesis se ve incrementada en presencia de hierro. De hecho, éste es uno de los primeros genes en los que se describió el papel activador de la proteína Fur, si bien aún no se conocen claramente los mecanismos mediante los que se ejerce este efecto. En cualquier caso, el sentido biológico de esta activación ha de residir en la necesidad de evitar el daño que puedan causar los radicales libres generados cuando la concentración de hierro intracelular es elevada.

3.1.5.5. Resistencia frente a la acidez

La resistencia a pH ácido es un paso importante en la virulencia de determinados patógenos como *S. typhimurium* o *H. pylori* (Bijlsma *et al.*, 2002). Muchos sistemas de regulación global se ven implicados en la respuesta al estrés por pH ácido, como RpoS, OmpR, PhoP y también Fur (Bearson *et al.*, 1997). La implicación de este último, se ha demostrado tanto en *S. typhimurium* como en *H. pylori* (Hall y Foster, 1996; Bijlsma *et al.*, 2002), comprobándose en el primero que su actuación es independiente de la presencia de hierro intracelular y que además, las dos funciones, la de regulador de la tolerancia a ácido y la relacionada con el transporte de hierro, pueden separarse funcionalmente (Hall y Foster, 1996).

3.1.5.6. Regulación positiva por Fur

En la mayoría de los casos descritos, la proteína Fur actúa como represor de la transcripción en presencia de hierro, si bien, además de la regulación del gen *sodB* ya mencionada, existen otros ejemplos en los que este regulador tiene un efecto positivo sobre la expresión. Así, el análisis de proteínas totales, mediante electroforesis en dos dimensiones, de células de *S. typhimurium* crecidas en condiciones de limitación de hierro ha puesto de manifiesto la existencia de aproximadamente 15 genes regulados positivamente. Entre estos se encuentran, por ejemplo, los genes de ferritinas *bfr* y *ftn*, la aconitasa codificada por *acnA*, la fumarasa *fumA* o proteínas vinculadas a la respuesta al pH ácido (Hall y Foster, 1996; Bijlsma *et al.*, 2002). En ninguno de estos casos se ha

descrito la presencia de una caja Fur en la región promotora o la presencia de otro regulador transcripcional dependiente de Fur, aunque sí se ha comprobado que la activación llevada a cabo por Fur es dependiente de hierro. Aunque el mecanismo mediante el cual la proteína Fur lleva a cabo esta regulación todavía no está del todo claro, los trabajos que existen al respecto con proteínas del grupo de las superóxido-dismutasas (Dubrac y Touati, 2002) apuntan a que la regulación tiene lugar tanto a nivel transcripcional como postranscripcional, y que ésta debe realizarse de forma indirecta sobre uno o varios reguladores todavía no identificados. Lo que sí parece claro, es que Fur es una proteína estabilizadora de los transcritos del gen *sodB*, probablemente actuando en el ámbito de la regulación de la actividad de las RNAsas que degradan el RNA mensajero. También se ha demostrado recientemente la implicación de un RNA de cadena sencilla de 90 nucleótidos, denominado RyhB, cuya transcripción está regulada negativamente por la proteína Fur (Masse y Gottesman, 2002). Cuando se produce la síntesis de RyhB, éste se une al mRNA codificado por genes como *ftn*, *acnA*, *fumA* o *sodB*, produciendo su rápida desaparición, lo cual concuerda con la observación de que la vida media del mRNA de los genes controlados positivamente por Fur disminuye drásticamente en mutantes deficientes en esta proteína (Dubrac y Touati, 2000; Hantke, 2001).

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

A no ser que se indique alguna variación, las condiciones de cultivo que se citan a continuación son válidas para todas las cepas de *Photobacterium damsela* y *Escherichia coli* que se emplearon en este trabajo, y que se describen en las Tablas II.1, II.2 y II.3.

En este capítulo se utilizaron la cepa DI21 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y la cepa ATCC 35083 de la subespecie *damsela*.

Las cepas de *P. damsela* se cultivaron rutinariamente a 25 °C en TSA (Cultimed) completado hasta un 1% de NaCl (TSA-1) en placa, o en TSC (Pronadisa) completado hasta un 1% de NaCl (TSC-1) para los cultivos líquidos.

Las cepas de *E. coli* DH5 α y H1681, se cultivaron rutinariamente a 37 °C en medio Agar de Luria Bertani (LB) (Pronadisa) en placa, y en caldo de LB (Pronadisa) para los cultivos líquidos.

En todos los casos las cepas se mantuvieron a -80 °C en medio TSC-1 completado con un 20% (v/v) de glicerol. La composición y preparación de los medios de cultivo utilizados a lo largo de este trabajo se reflejan en un anexo al final de la presente memoria.

3.2.2. Extracción del DNA

3.2.2.1. Extracción del DNA genómico

El DNA genómico de *Photobacterium damsela* se extrajo utilizando el kit Easy-DNA (Invitrogen), que incluía una disolución de lisis (A), una disolución de precipitación (B) y tampón TE 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA (Merck) pH 8,0. El cultivo bacteriano crecido durante 48 h en una placa de medio de cultivo TSA-1 se recogió con un asa de siembra estéril y se resuspendió en 200 μ L de tampón PBS en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. A continuación se añadieron 350 μ L de la

disolución A y la mezcla se resuspendió en el vórtex a intervalos de 1 s hasta su total dispersión, incubándose en un baño a 65 °C durante 10 min. A continuación, se añadieron 150 µL de la disolución B, y de nuevo se agitó vigorosamente hasta que se formó un precipitado que se movía libremente en el tubo. En ese momento, se añadieron 500 µL de cloroformo y se resuspendió hasta que la viscosidad disminuyó y la mezcla se fue volviendo homogénea, momento en el cual se centrifugó durante 20 min a 4 °C en una microcentrífuga refrigerada (Eppendorf). Se formaron así dos fases, de las cuales se transfirió la superior a un tubo nuevo, y se pasó a precipitar el DNA incubándolo en hielo durante 30 min con 1 mL de etanol absoluto a -20 °C, y luego centrifugándolo 15 min a 4 °C. El etanol fue retirado y el DNA precipitado se lavó con etanol al 80% y de nuevo se centrifugó 5 min a 4 °C. Se retiró todo el etanol, se dejó secar el DNA unos 5 min al aire y se resuspendió en 100 µL de tampón TE al que se añadió 1 µL de RNasa a una concentración de 2 mg mL⁻¹ para eliminar los restos de RNA. El DNA extraído se conservó a 4 °C.

3.2.2.2. Extracción del DNA plasmídico

a) Extracción por lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001). Se inoculó una colonia bacteriana en 1,5 mL de medio LB con ampicilina (50 µg mL⁻¹) y se incubó toda la noche a 37 °C. El cultivo se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 min y las células recogidas se resuspendieron en 100 µL de la disolución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM). Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, para romper las células, se añadieron 200 µL de la disolución II recién preparada, compuesta por NaOH 0,2 N y SDS 1%, y se dejó en hielo 5 min. A continuación, se añadieron 150 µL de la disolución III (60% de acetato potásico 5 M, 11,5% de ácido acético glacial v/v) y se incubó de nuevo 5 min en hielo. Tras centrifugar a 12.000 rpm durante 5 min a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1,5 mL. Se añadieron 250 µL de fenol y 250 µL de cloroformo. Se centrifugó durante 5 min a 12.000 rpm y se transfirió la fase superior a un nuevo tubo de 1,5 mL. El DNA plasmídico se precipitó con 2 volúmenes de etanol seguido de centrifugación. Finalmente se resuspendió en 10 µL de TE conteniendo 20 µg mL⁻¹ de RNasa.

b) De forma alternativa el DNA se extrajo utilizando el producto comercial Qiagen MiniprepKit (Qiagen), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

3.2.3. Amplificación parcial del gen *fur*

Se describe a continuación la estrategia seguida para amplificar y secuenciar el gen *fur* de *Photobacterium damsela*. Todos los cebadores y plásmidos utilizados en la presente tesis se especifican en una tabla al final de cada capítulo.

3.2.3.1. Diseño de oligonucleótidos degenerados

Con el fin de amplificar un fragmento del gen *fur* de *Photobacterium damsela*, se diseñaron oligonucleótidos degenerados, basándonos en secuencias conservadas en diferentes genes *fur*. Las zonas más conservadas se evidenciaron mediante un alineamiento comparativo de secuencias *fur* de diversas especies del género *Vibrio* (Figura III.6). Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron el *fur*new-5' y el *fur*new-3', que flanquean un fragmento del gen *fur* de 405 pb.

3.2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Excepto donde se indique alguna variación, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevó a cabo en volúmenes de 25 µL, utilizando la *BIOTAQ DNA Polymerase* (Bioline) con el tampón de PCR y el MgCl₂ 4 mM (ambos suministrados con la *Taq* polimerasa), 200 µM de cada desoxinucleósido 5' trifosfato (dNTP) (Bioline), 100 pmol de cada oligonucleótido (Sigma) y 1 U de enzima *Taq* polimerasa. Los volúmenes de cada reacción se reflejan en la Tabla III.1.

Figura III.6.-Diseño de los oligonucleótidos degenerados Furnew-5' y Furnew-3'.

Tabla III.1.-Componentes de la reacción de PCR

Componente	Cantidad
H ₂ O destilada estéril	15,5 µL
10X tampón de PCR	2,5 µL
dNTP	1 µL
Cebador 1 (100 pmol µL ⁻¹)	1 µL
Cebador 2 (100 pmol µL ⁻¹)	1 µL
DNA molde (10 ng µL ⁻¹)	1 µL
Taq polimerasa	1 µL
MgCl ₂ 50 mM	2 µL

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador TGradient (Biometra). El programa de PCR utilizado para la amplificación del gen *fur* fue el siguiente:

Temperatura	Tiempo
92 °C	2 min
92 °C	1 min
42 °C	1 min
72 °C	30 s
72 °C	5 min

 Repetir 30 veces

El DNA molde utilizado fue el extraído de la cepa DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida* y el de la cepa ATCC 35083 de *P. damsela* subsp. *damsela*. Como DNA control, se utilizaron los DNAs genómicos de las cepas de *V. anguillarum* 775, RG-111 y 11008.

En todas las reacciones de PCR se llevó a cabo un control negativo para garantizar la ausencia de DNA contaminante en los componentes utilizados. Dicha reacción de control consta de todos los componentes citados anteriormente excepto el DNA molde.

Los productos de PCR se analizaron a lo largo de todo este trabajo, salvo excepciones que se indicarán en su momento, en geles de agarosa al 1,2% preparados con tampón TAE 1X (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), con adición de bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg mL⁻¹. Los geles se visualizaron en un

transiluminador de luz ultravioleta (*Gelprinter Plus*) a una longitud de onda de 254 nm, y fotografiados con una cámara COHU *High performance CCD camera*.

3.2.3.3. Clonaje y secuenciación del producto de PCR

El producto de PCR obtenido en el apartado anterior, fue escindido del gel de agarosa, y extraído del mismo utilizando el *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se ligó al plásmido comercial pGEM-T Easy (Tabor *et al.*, 1985) (*TA cloning kit*; Promega) (Figura III.7), que lleva incorporado un gen de resistencia a la ampicilina, y posee una timina en cada extremo para favorecer la ligación a las adeninas de los productos de PCR, que son incorporadas por la *Taq* polimerasa al finalizar la polimerización.

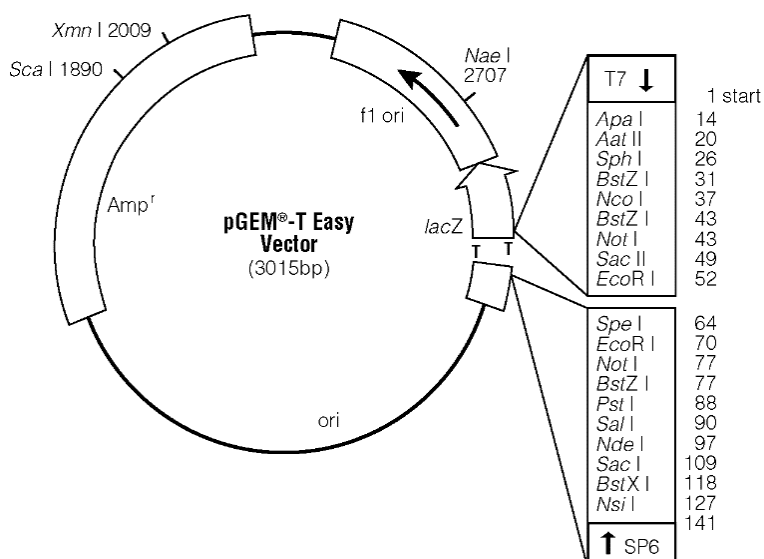


Figura III.7.-Mapa del vector pGEM-T Easy.

A. Reacción de ligación en el vector pGEM-T Easy

Las reacciones de ligación en el pGEM-T Easy se prepararon siempre a lo largo de este trabajo mezclando los siguientes componentes: 3 μ L del producto de PCR, 5 μ L del tampón de la ligasa, 1 μ L del vector pGEM-T Easy, y 1 μ L de ligasa T4, y se incubaron toda la noche a 4 °C. Los productos de PCR utilizados en esta reacción de

ligación, se limpiaron siempre previamente con el kit de limpieza de productos de PCR de Qiagen (*Qiaquick PCR purification kit*), siguiendo las recomendaciones del fabricante, o fueron recortados de un gel de agarosa y extraídos.

B. Preparación de células competentes de *E. coli*

El producto de la ligación se utilizó en este caso para transformar las células competentes *E. coli* DH5 α , preparadas según el protocolo general siguiente, que fue el utilizado con todas las cepas de *E. coli* con las que se trabajó en esta tesis.

En primer lugar se tomó una colonia aislada de un cultivo bacteriano fresco y se inoculó en 1 mL de LB, que se dejó en agitación constante durante 12 h. a 37 °C. 500 μ L de este cultivo se utilizaron para inocular un matraz con 50 mL de LB, que se incubó en agitación a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,4 a una longitud de onda de 600 nm (medida en un espectrofotómetro Hitachi U-2000). En ese momento se detuvo el crecimiento poniendo el matraz en hielo, y el cultivo se centrifugó en una centrífuga Beckman J-1 a 4 °C a 4.000 rpm. Las células precipitadas se resuspendieron en un volumen de 10 mL de CaCl₂ (Panreac) 0,1 M frío, y se dejaron 30 min en hielo. Se repitió la centrifugación anterior, y en esta ocasión, las células se resuspendieron en 750 μ L de CaCl₂ más 750 μ L de una disolución de glicerol (Merck) al 50%, y se alicuotaron en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL para almacenarlos a -80 °C.

C. Transformación de células competentes de *E. coli*

Para llevar a cabo la transformación, la reacción de ligación se añadió a un vial de 100 μ L de células competentes, incubándose la mezcla en hielo durante 30 min. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico en un baño a 42 °C durante 1 min, e inmediatamente se colocaron en hielo 1 min. Tras la adición de 1 mL de caldo LB, las células se incubaron en agitación constante durante 1 h, tras la cual se cultivaron en una placa de LB con 50 μ g mL⁻¹ de ampicilina (Sigma), 10 μ L de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactósido (X-gal) (Promega) 50 mg mL⁻¹ y 10 μ L del inductor IPTG (isopropil-beta-D-thiogalactopiranosido) (Promega) 0,1 M. La placa se incubó 12-18 h a 37 °C. De las colonias resultantes, se picaron con palillos estériles varias colonias blancas (las incapaces de degradar el X-gal, lo cual indica que existe un inserto en el sitio de clonaje del vector), y se sembraron en una placa de Agar LB suplementado de

nuevo con ampicilina, IPTG y X-gal, a las mismas concentraciones descritas, con el fin de guardar los clones obtenidos de forma ordenada. Al mismo tiempo, cada colonia picada se inoculó en un tubo con 3 mL de caldo LB con ampicilina a 50 mg mL⁻¹, y se incubó a 37 °C en agitación constante durante 12-18 h para disponer ya de un cultivo líquido a partir del cual extraer el DNA plasmídico bacteriano.

A lo largo de todo este estudio, siempre que se transformó un producto de PCR ligado al vector pGEM-T Easy en células competentes de *E. coli* DH5α, se procedió de la misma forma. En el caso de la transformación con otros vectores o en otras bacterias, se irán indicando las variaciones introducidas.

D. Análisis por restricción de los clones obtenidos del pGEM-T Easy

La extracción del DNA plasmídico de los clones obtenidos en el apartado anterior, se llevó a cabo utilizando el método de extracción por lisis alcalina. Los plásmidos purificados se cortaron con *EcoRI* (Amersham Biosciences) para liberar el inserto y comprobar si era del tamaño esperado, en función del obtenido tras la PCR. Cada reacción de restricción se preparó con 5 µL de plásmido, 10 U de enzima (1 µL: 10 U µL⁻¹) y 2 µL del tampón 10X correspondiente, completándose con agua desionizada estéril hasta un volumen de 20 µL. Las reacciones se incubaron a 37 °C toda la noche y los productos de restricción se separaron en un gel de agarosa al 1,2%.

E. Secuenciación de los clones

Una vez seleccionado un clon con un inserto que se ajustase al tamaño esperado, se extrajo el plásmido para proceder a su secuenciación. Ésta se llevó a cabo utilizando el *CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Kit* (Beckman Coulter) y un secuenciador automático CEQ 8000 (Beckman Coulter). Los componentes utilizados en la reacción de secuenciación fueron los siguientes:

Componente	Cantidad
H ₂ O desionizada estéril	10 µL
DNA molde	3 µL
Oligonucleótido (10 µM)	2 µL
DTCS Quick Start Master Mix	4 µL
Tampón de secuenciación	1 µL

Para las reacciones de secuenciación se utilizaron los cebadores universales M13-fw y M13-rev. El programa de secuenciación que se utilizó fue el siguiente:

Temperatura	Tiempo
96 °C	2 min
50 °C	1 min
60 °C	1 min



Repetir 30 veces

F. Limpieza y precipitación de las reacciones de secuenciación

En primer lugar se transfirieron las reacciones a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. En cada tubo se añadieron 1 µL de glucógeno, 2 µL de una disolución de acetato sódico (Probus) 3 M, 2 µL de una disolución de Na₂-EDTA 100 mM y 60 µL de etanol al 95% frío. Inmediatamente se centrifugaron los tubos durante 15 min a 14.000 rpm en una centrífuga refrigerada (Eppendorf) a 4 °C, y se les retiró el sobrenadante cuidadosamente. El precipitado se lavó dos veces con 200 µL de etanol frío al 70%. Se dejó secar 10 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 40 µL de la disolución de carga.

3.2.4. Secuenciación del gen *fur* completo

3.2.4.1. Ensayos de Hibridación: Southern blot

Con el objetivo de aislar un fragmento de DNA que contuviera el gen *fur* completo, se llevó a cabo un experimento de hibridación por Southern blot utilizando como sonda el fragmento de PCR obtenido en el apartado anterior. Para ello, el DNA genómico de la cepa DI21 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* se digirió con diferentes enzimas de restricción y los fragmentos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Seguidamente se procedió de la siguiente manera: el gel de agarosa se sometió a una depurinización mediante lavado con HCl 0,25 M. A continuación se realizó un lavado de desnaturalización con NaOH 0,5 M, seguido de un lavado de neutralización con Tampón Tris-NaCl (Tris HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M; pH 7,5). Seguidamente el DNA se transfirió mediante vacío (*Vacu-Aid*, Hybaid) a una membrana de nylon (0,45 µm de tamaño de poro; Boehringer Mannheim). Tras la transferencia, el

DNA se fijó a la membrana con luz UV durante 2 min en un *Ultraviolet Crosslinker* (Amersham Biosciences).

Después de la fijación, la membrana de nylon se prehibridó con 30 mL de tampón de hibridación (*ECL Gold Hybridization Buffer*, Amersham Biosciences) en un horno rotatorio durante 30 min a 42 °C. Seguidamente la sonda de DNA marcada ($10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) se añadió al tampón de hibridación y se llevó a cabo la hibridación durante 8 h a 42 °C.

El marcaje de la sonda de DNA se realizó mediante quimioluminiscencia con el kit comercial ECL (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez finalizado el período de hibridación, la membrana se lavó con 50 mL de una disolución SSC (citrato sódico 75 mM, NaCl 0,75 M pH 7,0) 5X a 42 °C durante 5 min, y a continuación se realizaron tres lavados con 100 mL de tampón de lavado primario (urea 6 M, SDS 0,4%, SSC 0,5X) a 42 °C durante 20, 10 y 10 min respectivamente. A continuación se realizaron otros dos lavados a temperatura ambiente durante 5 min con tampón de lavado secundario (SSC 2X). Seguidamente, se procedió a la detección en la que se emplearon los reactivos del kit ECL como recomienda el fabricante. Para el revelado se utilizó película fotográfica *Hyper Film* (Amersham Biosciences) en un cassette *hypercassette* (Amersham Biosciences) especial para exposición. Se expuso la película durante 5 min y se sumergió en el revelador (Kodak) hasta que empezó a aparecer la señal. Se lavó bien con agua y se sumergió en el fijador (Kodak) unos 5 min, lavando finalmente con agua abundante.

3.2.4.2. Clonación de las regiones adyacentes al gen *fur*

Una vez localizados unos sitios de restricción que flanqueasen el gen *fur* se llevó a cabo la clonación de sus regiones adyacentes para completar su secuencia, y para conocer los genes que lo flanqueaban. La base de la estrategia seguida para amplificar las regiones que flanquean al fragmento del gen *fur* previamente amplificado con los oligonucleótidos degenerados, se muestra en la Figura III.8. El DNA de la bacteria se digiere con enzimas de restricción y se clona en un vector. Se diseña un cebador en base a la secuencia de un extremo del fragmento de DNA conocido. Éste, en combinación con un cebador que se une al sitio de policlonaje (*polylinker*) del plásmido (por ejemplo, un cebador universal M13), posibilita realizar una reacción de PCR utilizando como DNA molde el producto de la ligación. Así es posible avanzar en la amplificación y secuenciación corriente arriba (*upstream*) y corriente abajo (*downstream*), a partir del

fragmento conocido, sin necesidad de realizar una búsqueda de clones solapados mediante librerías génicas.

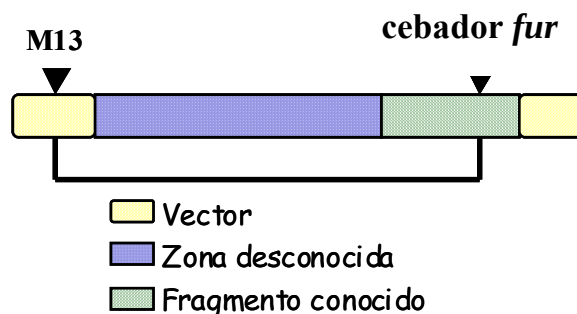


Figura III.8.-Amplificación de una secuencia desconocida utilizando un cebador del plásmido y otro de la secuencia que se conoce.

Una vez realizado el Southern blot descrito en el apartado anterior, se diseñó el mapa de restricción del DNA que flanquea al locus *fur*, y se seleccionaron los enzimas que generaban los fragmentos de DNA con un tamaño ideal para clonar en plásmidos. Así, en primer lugar se digirieron tanto el DNA genómico de la cepa DI21 como el plásmido pWKS30 (Wang y Kushner, 1991) con los enzimas de restricción *Hind*III y *Bgl*II (Amersham Biosciences). La ligación se efectuó utilizando la ligasa *T4 DNA Ligase* (Fermentas), mezclando en un tubo de microcentrífuga 3 μ L de DNA genómico, 1 μ L del enzima, 1 μ L del tampón de la ligasa y 1 μ L de plásmido, añadiendo agua hasta un volumen final de 10 μ L, e incubando a 15 °C durante 12 h. Dado que sólo se conocía un pequeño fragmento de la secuencia del gen *fur*, dicho fragmento se empleó para el diseño de dos cebadores de PCR (Tabla II.4), que se combinaron con cada uno de los cebadores universales del pWKS30 (Figura III.9). El cebador Fur-pisc-5'1 se combinó con el M13 fw, y el IP-DI21-fur-2 con el M13 Rv.

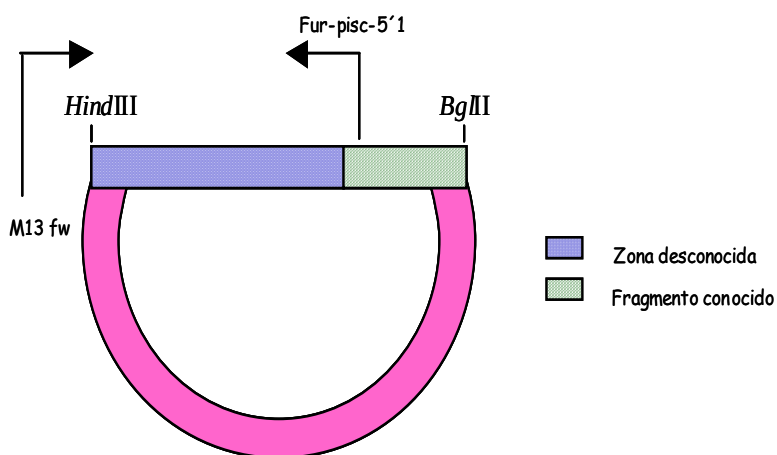


Figura III.9.-Amplificación de una zona desconocida del gen *fur* utilizando el cebador Fur-pisc-5'1 y el universal M13 fw.

Se realizaron reacciones de PCR utilizando como DNA molde las ligaciones, para así obtener el fragmento buscado. Las reacciones de PCR se prepararon del mismo modo descrito anteriormente y el programa utilizado consistió en 1 min de desnaturalización a 95 °C, seguido de 30 ciclos que constaron de: 1 min de desnaturalización a 95 °C, 1 min de hibridación del cebador a 59 °C y 3 min de elongación a 72 °C. Al final se añadieron 5 min de elongación a 72 °C para permitir la finalización de posibles cadenas incompletas.

3.2.4.3. Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de la reacción de PCR se clonaron en el plásmido pGEM-T Easy y se transformaron en la cepa DH5 α . Para comprobar qué colonias bacterianas poseían el plásmido con el inserto buscado, se realizaron digestiones con *EcoRI*, que se separaron en un gel de agarosa al 1,2% (p/v). Una vez encontrado el clon buscado se extrajo el plásmido y se secuenció utilizando los cebadores Fur-pisc-5'1 y IP-DI21-fur-2. No se pudieron usar los mismos cebadores universales usados en el *chromosome walking* puesto que su secuencia diana está incluida tanto en el producto de PCR como en el plásmido, y por tanto la secuencia saldría doble.

3.2.5. Clonaje y secuenciación del gen *fur* de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*

El gen *fur* completo de *P. damsela* subsp. *damsela*, se amplificó utilizando los cebadores delfur-DI21-5'1 y delfur-DI21-3'1.

Como DNA molde se utilizó el de la cepa ATCC 35083. La PCR se llevó a cabo con las siguientes condiciones: 1 min de desnaturalización previa a 95 °C, seguido de 30 ciclos que constaron de 1 min de desnaturalización a 95 °C, 1 min de hibridación del cebador a 70 °C, 1 min de elongación a 72 °C y 5 min a 72 °C al final de la reacción. El producto de PCR fue clonado en el pGEM-T Easy y secuenciado. Las secuencias, tanto de este gen como el de *P. damsela* subsp. *piscicida* fueron incluidas en la base de datos del EMBL.

3.2.6. Construcción de árboles filogenéticos

Utilizando el software ClustalX, y siguiendo el método de *neighbour-joining* (Saitou y Nei, 1987), se construyeron árboles filogenéticos relacionando las secuencias del gen *fur*, del gen del RNA ribosómico 16S, y la proteína Fur de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y subsp. *damsela* con las de otros microorganismos. Los números de acceso de la base del EMBL de las secuencias utilizadas en este estudio filogenético se reflejan en las Tablas III.2 y III.3.

Tabla III.2.-Números de acceso de las secuencias del gen *fur* y la proteína Fur utilizadas para llevar a cabo los análisis filogenéticos.

Especie	Número de acceso
<i>A. hydrophila</i>	AF349468
<i>E. coli</i>	X02589
<i>V. fischeri</i>	AB056119
<i>V. logei</i>	AJ437615
<i>V. anguillarum</i>	L19717
<i>V. cholerae</i>	M85154
<i>V. parahaemolyticus</i>	AB003752
<i>V. vulnificus</i>	L06428
<i>V. salmonicida</i>	AJ437614
<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	AJ564701
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	AJ440780

Tabla III.3.-Números de acceso de las secuencias del gen del rRNA 16S usadas en el análisis filogenético.

Especie	Número de acceso
<i>A. hydrophila</i>	X60418
<i>E. coli</i>	X80725
<i>V. fischeri</i>	X74702
<i>V. logei</i>	AJ437616
<i>V. anguillarum</i>	X16895
<i>V. cholerae</i>	X74694
<i>V. parahaemolyticus</i>	X56580
<i>V. vulnificus</i>	X74726
<i>V. salmonicida</i>	X70643
<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	Y18496
<i>P. damsela</i> subsp. <i>pisicida</i>	

3.2.7. Experimento de complementación del gen *fur* en la cepa de *E. coli* H1681

La cepa de *E. coli* H1681 (Heidrich *et al.*, 1996) es una cepa mutante para el gen *fur*, que tiene como gen indicador el de la β -galactosidasa situado bajo el control del promotor *fhuF*, fuertemente sujeto a la regulación por Fur (Figura III.10). Es por tanto una cepa ideal para demostrar la función del gen *fur* de *P. damsela* como un represor transcripcional regulado por hierro.

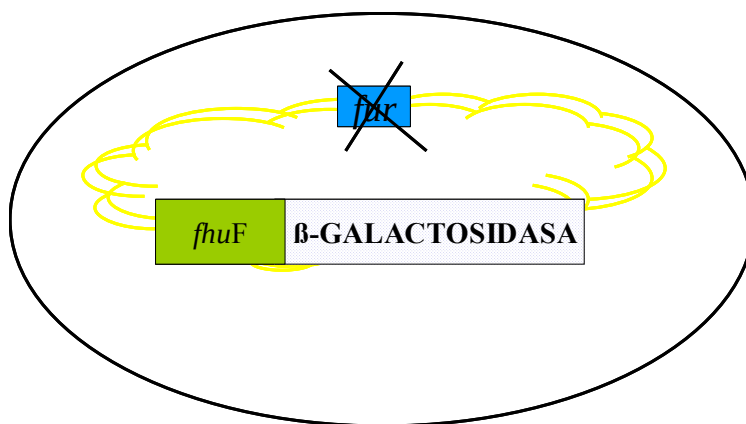


Figura III.10.-Diagrama esquemático de la fusión transcripcional en la cepa de *E. coli* H1681 entre el gen *lacZ* y el promotor del gen *fhuF*.

Para este experimento se procedió en primer lugar a clonar el gen *fur* completo de *P. damsela* en el plásmido pWKS30. Para ello se diseñaron los oligonucleótidos Delfur-DI21-3'1 y Delfur-DI21-5'1, flanqueando el gen. Éstos se diseñaron con dianas de restricción en sus extremos para los enzimas *Bam*HI y *Hind*III, con lo cual el producto de PCR resultante, de unas 931 pb, pudo ser cortado con ambas enzimas y ligado en el vector pWKS30, previamente digerido del mismo modo. El resultado de la ligación se transformó primero en células DH5 α competentes y las colonias resultantes se analizaron por PCR, utilizando los mismos cebadores usados para amplificar el gen, para localizar un clon positivo, es decir, que contuviera el gen *fur* insertado en el pWKS30. Una vez localizado, se extrajo el plásmido y se transformó en la cepa H1681, de la que previamente se habían preparado células competentes. Las células transformadas se sembraron en placas de agar MacConkey (Cultimed) suplementado bien con 200 μ M de 2,2'-dipyridyl (Sigma) para crear condiciones restrictivas de hierro, bien con FeCl₃ (Panreac) 0,1 mM, para otorgar condiciones de exceso de hierro. En este medio las células "lactosa positivo" (lac+) formarán colonias de color rojo, mientras que las "lactosa negativo" (lac-) formarán colonias de color blanco.

3.2.8. Ensayo de titulación de Fur (FURTA)

Con el fin de determinar si el gen *fur* de *P. damsela* subsp. *piscicida* está autorregulado por su producto, la proteína Fur, se recurrió a la utilización de la técnica FURTA (Stojiljkovic *et al.*, 1994). Dicha técnica se basa en el uso de una cepa de *E. coli* que presenta insertada en el cromosoma la fusión de un promotor regulado por la proteína Fur con el gen *lacZ* (normalmente se usan promotores como *fiu* o *fhuF*). Si a continuación se introduce en dicha cepa una genoteca construida en un vector de alto número de copias y uno de los plásmidos es portador de un fragmento de DNA que contiene una caja Fur, se producirá una desregulación del sistema, las moléculas de Fur verán desplazado su equilibrio de unión al promotor de *fhuF*, tenderán a unirse a las cajas Fur del plásmido en alto número de copia. Ello produce la desrepresión de la fusión *fhuF-lacZ*, dando lugar a un incremento de la síntesis de β -galactosidasa que puede detectarse cualitativamente, si se utilizan medios diferenciales (Agar McConkey, EMB), o cuantitativamente mediante la medición de la actividad β -galactosidasa (Tsolis *et al.*, 1995).

Para aplicar esta la técnica, se transformó el plásmido conteniendo la zona “corriente arriba” amplificada del gen *fur*, en la cepa indicadora H1717 (Tabla II.3) (Hantke, 1987) de *E. coli*, y las células transformadas se sembraron en placas de medio de cultivo agar MacConkey suplementado con 40 μ M de FeSO₄ y 1% de lactosa.

3.2.9. Análisis informático de las secuencias

Para analizar la homología de los genes secuenciados en este estudio con genes descritos en especies filogenéticamente próximas, se consultó la base de datos del EMBL a través de los servicios informáticos del *European Bioinformatics Institute* (EBI), utilizando los programas FASTA3 y BLAST. Los análisis adicionales de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se realizaron con el programa BioEdit (Version 5.0.6) y con el programa ClustalW.

3.3. Resultados

3.3.1. Clonación y secuenciación de una parte del gen *fur* de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

El primer objetivo consistió en obtener por PCR un fragmento del gen *fur* en las dos subespecies de *P. damsela*. Utilizando los cebadores degenerados Furnew-5' y Furnew-3' (Tabla III.7) se logró amplificar un fragmento del tamaño esperado en tres cepas control de *V. anguillarum* (Figura III.11, líneas 3,4,5). Los mismos cebadores rindieron una serie de fragmentos de amplificación en las cepas DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida* y ATCC 35083 de la subsp. *damsela*. Se seleccionó en la cepa DI21 de la subsp. *piscicida* un fragmento de un tamaño cercano a las 392 pb (Figura III.11, línea 1).

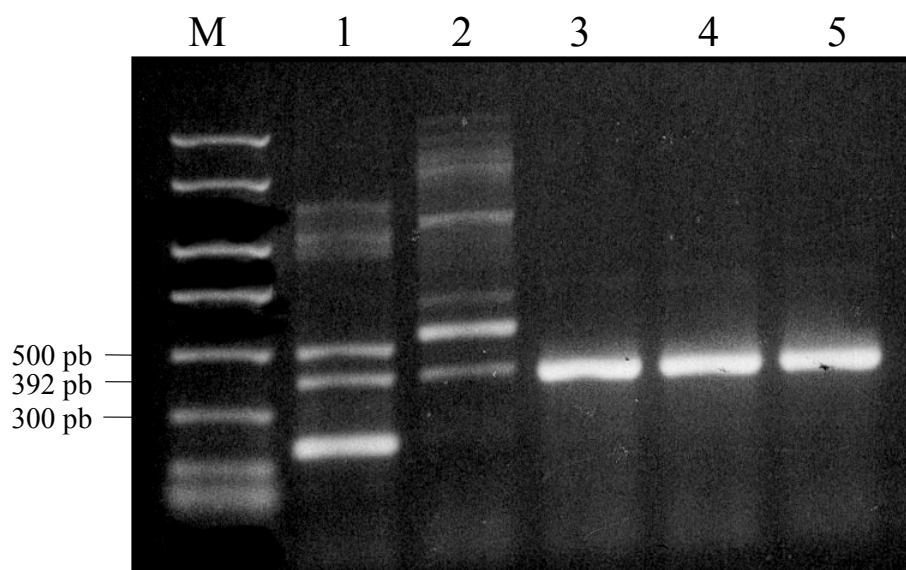


Figura III.11.-Amplificación parcial del gen *fur*. (1) *P. damsela* subsp. *piscicida* cepa DI21; (2) *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 35083; (3, 4 y 5) *Vibrio anguillarum* 775, VRG-111 y 11008 respectivamente.

El fragmento de PCR de aproximadamente 392 pb se aisló del gel de agarosa, se clonó en el vector pGEM-T Easy y se transformó en *E. coli* DH5 α , construyendo de esta manera un plásmido que se denominó pCAR016 (Tabla III.8). Posteriormente se llevó a cabo la secuenciación y se comprobó que de esta secuencia se deducía una ORF (pauta de lectura abierta) parcial de 135 aminoácidos. Se llevó a cabo un análisis

comparativo con las bases de datos del EMBL utilizando el programa informático BLAST, y se evidenció que dicha ORF presentaba un 91% de identidad con la proteína Fur de *Vibrio fischeri* y que correspondía a los 135 primeros aminoácidos de la presunta proteína Fur de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

3.3.2. Clonación y secuenciación de los genes *fur* y *orf1*, completos y obtención de la secuencia parcial de los genes *glnS* y *fldA*

Para clonar el gen *fur* completo, se escindió el inserto del plásmido pCAR016 y se utilizó como sonda para realizar una hibridación con el DNA genómico de la cepa DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida* digerido con varias enzimas de restricción (figura III.12).

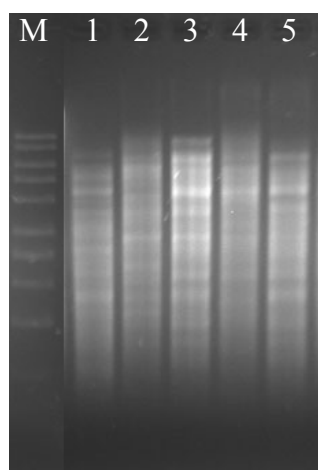


Figura III.12.-Digestiones del DNA genómico de *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21. (1) *EcoRI*, (2) *HindIII*, (3) *KpnI*, (4) *Sall*; (5) *BamHI*.

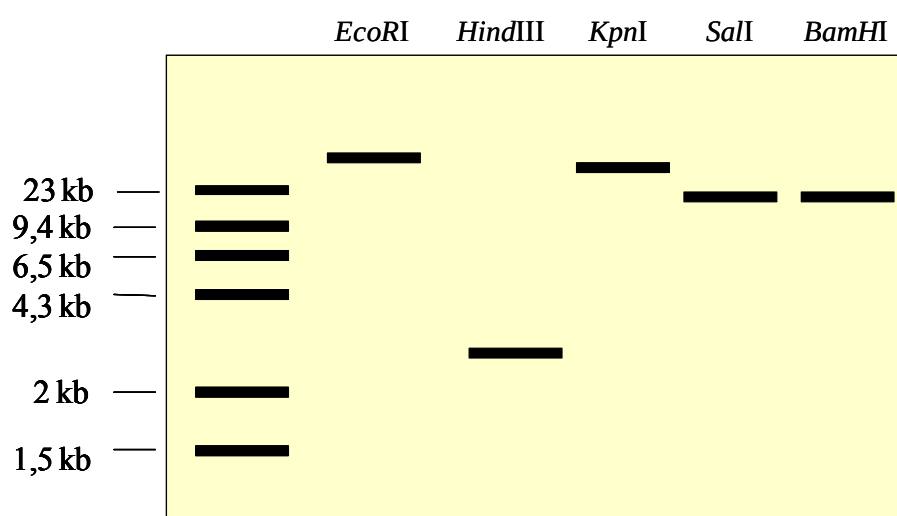


Figura III.13.-Esquema de las bandas obtenidas por Southern blot utilizando como sonda un fragmento del plásmido pCAR016 conteniendo un fragmento del gen *fur* de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Los resultados obtenidos en la hibridación indicaron que el gen *fur* de *P. damsela* subsp. *piscicida* podría estar contenido en un fragmento de aproximadamente 3 kb flanqueado por sitios de corte de *Hind*III (Figura III.13).

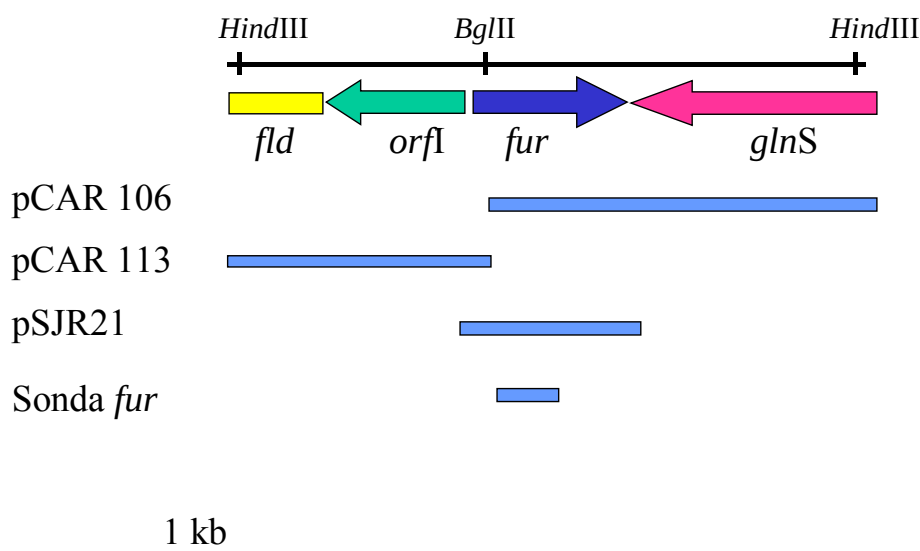


Figura III.14.-Mapa de restricción y representación esquemática de la región *fur* de *P. damsela*. Las flechas indican las pautas de lectura abiertas (ORFs) y apuntan en la dirección de la transcripción. Se indican los plásmidos y la sonda utilizada. Sólo se muestran los sitios de restricción más relevantes.

El DNA genómico de la cepa DI21 se digirió entonces con los enzimas *Hind*III y *Bgl*II (sitio de restricción incluido en la secuencia ya conocida de *fur*), se ligó al plásmido pWKS30 y los productos de esta ligación se utilizaron como DNA molde en dos reacciones de PCR independientes.

La reacción con los cebadores Fur-pisc-5'1 y M13-fw, rindió un producto de PCR de 1,5 kb, y la realizada con los cebadores IP-DI21-fur2 y el M13-rv, rindió otro de 1,2 kb. Ambos productos se clonaron en pGEM-T Easy, y así se crearon los clones pCAR106 y pCAR113 respectivamente. Esta estrategia permitió la amplificación de las secuencias de DNA desconocidas “corriente arriba” (*upstream*) o abajo (*downstream*) del fragmento de DNA conocido. De esta forma, el mapa génico del locus *fur* y los genes adyacentes quedó establecido como se indica en la figura III.14. La secuenciación del inserto del pCAR106, reveló la secuencia del extremo 3' del gen *fur*, con lo cual éste se estableció como un gen de 444 nucleótidos, que codifica una proteína de 148 aminoácidos de un peso molecular de 16,8 kDa. La secuencia se registró en la base de datos del EMBL con el código de acceso AJ440780 (Figura III.15).

```

AGG TTT AAT GTT ATC TTA TGG TCA CTT ATA ATA AAC ATT AAT GAG
    -35          -10
AAA GAC TAC TGC TTC TAT TTC GCA GCT AGC CCA TAG GAA ACT CGA
                        RBS
ATG TCA GAT AAT AAT CAC GCG CTT AAG CAA GCA GGC TTG AAA ATT
M  S  D  N  N  H  A  L  K  Q  A  G  L  K  I

ACA CTA CCT CGT TTG AAG ATC TTA GAA GTT CTT CAA CAA CCA GAG
T  L  P  R  L  K  I  L  E  V  L  Q  Q  P  E

TGT CAA CAC ATT AGT GCG GAA GAC CTT TAC AAA AAG CTG ATT GAT
C  Q  H  I  S  A  E  D  L  Y  K  K  L  I  D

ATC GGC GAA GAA ATT GGT TTA GCG ACC GTA TAC CGT GTT TTG AAC
I  G  E  E  I  G  L  A  T  V  Y  R  V  L  N

CAA TTT GAT GAT GCT GGC ATT GTG ACT CGC CAT CAT TTT GAA GGT
Q  F  D  D  A  G  I  V  T  R  H  H  F  E  G

GGT AAA TCT GTG TTC GAA CTA GCA ACA CAA CAC CAT CAT GAT CAC
G  K  S  V  F  E  L  A  T  Q  H  H  H  D  H

CTT GTT TGT TTA GAT TGT GGC AAA GTA ATT GAA TTC TCT GAT GAG
L  V  C  L  D  C  G  K  V  I  E  F  S  D  E

CTT ATT GAG CGT CGT CAG AAA GAG ATC GCA GCA CAA TAC AAT GTC
L  I  E  R  R  Q  K  E  I  A  A  Q  Y  N  V

GAC TTG ACT AAT CAT AGC CTG TAT CTA TAT GGC CAC TGT GCA AAC
D  L  T  N  H  S  L  Y  L  Y  G  H  C  A  N

GGT GAT TGC TGT AAA GAC GAG AGC CTG CAC GAT CAG AAA TAA TCT
G  D  C  C  K  D  E  S  L  H  D  Q  K  *

ACT GCT TTC ATA ATT CAA TAA CTA AAG CCA AAA GCT ATG CGC TCA

```

Figura III.15.-Gen *fur* y proteína Fur de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Las presuntas regiones -35 y -10 del gen fueron localizadas en base a las secuencias consenso existentes en la región corriente arriba del ATG inicial. RBS: *Ribosome binding site*, lugar de unión del ribosoma. Los codones de inicio y parada de la ORF se muestran en color rojo.

3.3.3. Clonación y secuenciación del gen *fur* de *P. damsela* subsp. *damsela*.

La PCR realizada con los cebadores delfur-DI21-5'1 y delfur-DI21-3'1, rindió un producto de PCR de 931 pb que se clonó en el vector pGEM-T Easy para dar lugar al plásmido pSJR22. La secuenciación de éste reveló una ORF que codificaba una proteína de 148 aminoácidos, y que mostró un porcentaje de similitud del 99,3% con la secuencia de la proteína Fur anteriormente descrita en la subespecie *piscicida*. El alineamiento de las dos secuencias mostró que existían únicamente dos sustituciones a nivel nucleotídico que se traducían en la diferencia entre ambas de un aminoácido en la posición 60 (Asn en la cepa DI21, Ser en la ATCC 35083) (Figura III.16).

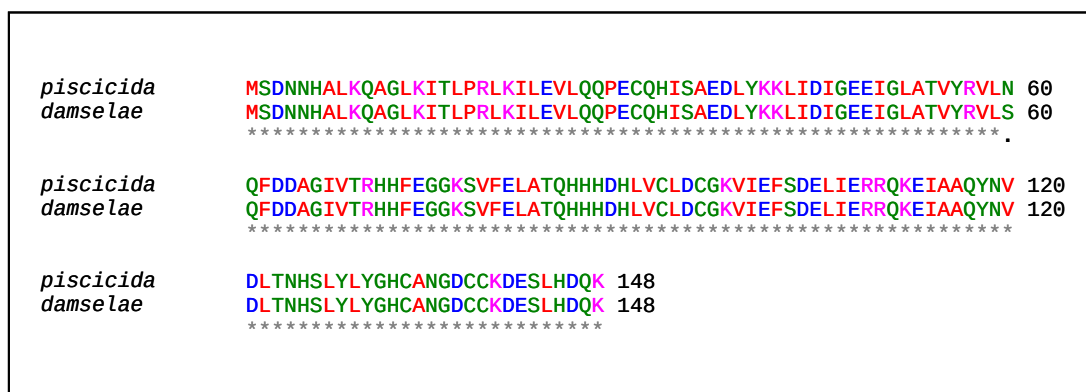


Figura III.16.-Alineamiento de las proteínas Fur de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.

La secuencia de la proteína Fur deducida de *P. damsela* subsp. *piscicida* se alineó con las proteínas Fur de las especies del género *Vibrio* con las que mostró un mayor porcentaje de similitud, así como con las secuencias de las proteínas Fur de *Escherichia coli* y *Aeromonas hydrophila* (Figura III.17).

El análisis de la secuencia de las proteínas Fur de las dos subespecies de *P. damsela* revela la presencia entre los aminoácidos 86 y 96, de una región muy rica en histidina (Figura III.17). La secuencia de esta región se puede resumir como His-His-His-X-His-X₂-Cys-X₂-Cys, y se corresponde con un motivo de unión de hierro también presente en *E. coli* y *V. cholerae* (Arnold y Haymore, 1991; Staggs y Perry, 1992), y como se puede observar en la Figura III.17, está muy conservado entre las proteínas Fur de distintos microorganismos.

Se establecieron asimismo los porcentajes de similitud de la proteína Fur de *P. damsela* subsp. *piscicida* con respecto a las especies mencionadas anteriormente. Los resultados se recogen en la Tabla III.4.

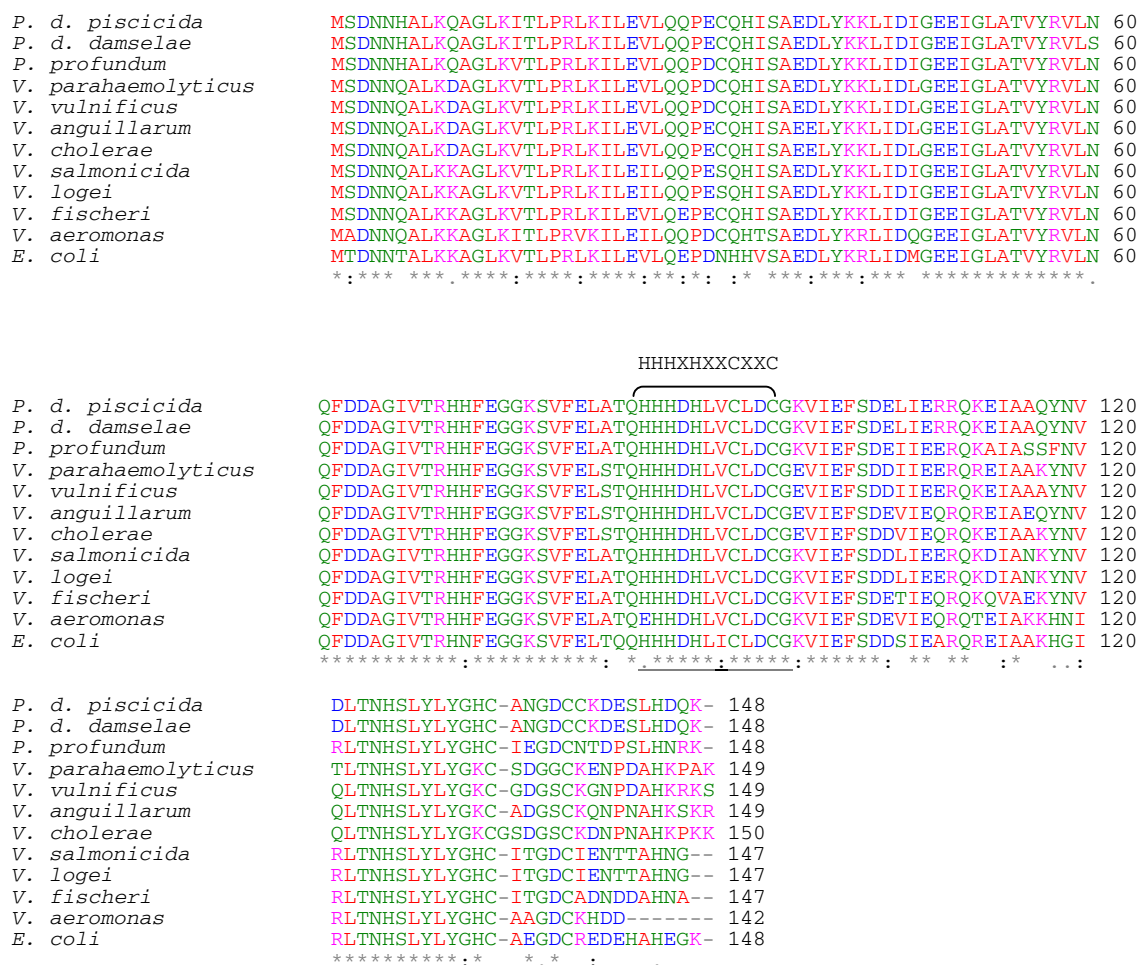


Figura. III.17.-Alineamiento comparativo de las secuencias de la proteínas Fur de las dos subespecies de *P. damsela* y de otras especies de bacterias gram negativas. Se señala el motivo de unión de hierro altamente conservado entre las proteínas Fur de distintos microorganismos.

Tabla III.4.-Porcentajes de similitud de las secuencias de la proteína Fur y el gen *fur* de *P. damsela* subsp. *piscicida* con respecto a diferentes especies bacterianas.

Especie	Aminoácidos	Nucleótidos
<i>Escherichia coli</i>	79	70, 9
<i>Aeromonas hydrophila</i>	84, 5	70, 3
<i>Vibrio fischeri</i>	86, 3	78, 7
<i>Vibrio logei</i>	86, 3	76, 3
<i>Vibrio salmonicida</i>	86, 3	76, 3
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	84, 1	73, 4
<i>Vibrio anguillarum</i>	84, 4	74
<i>Vibrio vulnificus</i>	83, 7	77
<i>Vibrio cholerae</i>	83, 8	78, 1
<i>P. profundum</i>	89	78, 7
<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	99, 3	99, 8

El extremo 3' del plásmido pCAR106 resultó contener, a continuación de la ORF que codificaba para Fur, una ORF parcial interrumpida por el sitio *HindIII* que se había utilizado para clonar este fragmento. Ésta se cotejó con las bases de datos, y mostró ser muy similar a los genes *glnS* de *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae*. El análisis del inserto contenido en el clon pCAR113 reveló la presencia de 2 ORFs que se identificaron presuntivamente de acuerdo con su homología con secuencias ya publicadas. Éstas fueron una flavin-mononucleótido electrón-transferasa, con gran homología con los genes *fldA* de *V. fischeri*, *V. salmonicida* y *V. cholerae*, y una ORF (ORF1) con homología con proteínas sin función descrita de distintas especies del género *Vibrio* (Tabla III.5).

Tabla III.5.-Porcentajes de similitud y de identidad de las proteínas FldA, GlnS y ORF1 de *P. damsela* subsp. *piscicida* con respecto a diferentes especies bacterianas.

Espece	% identidad	% similitud
Proteína hipotética (ORF1)		
<i>Vibrio vulnificus</i>	71	84
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	68	83
<i>Vibrio fischeri</i>	62	80
<i>Vibrio cholerae</i>	68	84
<i>Vibrio salmonicida</i>	60	80
GlnS		
<i>Vibrio vulnificus</i>	82	90
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	82	90
<i>Vibrio fischeri</i>	80	91
<i>Photobacterium profundum</i>	80	90
<i>Vibrio cholerae</i>	78	88
FldA		
<i>Vibrio cholerae</i>	76	86
<i>Vibrio fischeri</i>	71	86
<i>Vibrio salmonicida</i>	68	84
<i>Photobacterium profundum</i>	68	81
<i>Photorhabdus luminescens</i>	60	76

3.3.4. Complementación de *E. coli* H1681

El gen *fur* completo de *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 con secuencias corriente arriba y corriente abajo se amplificó por PCR y se clonó en el vector pWKS30, dando lugar al plásmido pSJR21. Éste se transformó en la cepa H1681 para realizar un experimento de complementación y evaluar la funcionalidad de Fur como un represor transcripcional dependiente de la concentración de hierro en *P. damsela*. Como control negativo del experimento se utilizó la cepa H1681 sin el plásmido pSJR21. Las cepas obtenidas se cultivaron en placas de agar MacConkey, y se detectaron los fenotipos que se muestran en la Tabla III.6.

Tabla III.6.-Resultado de la complementación de *E. coli* H1681 con el plásmido pSJR21, portando el gen *fur* de *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21. El fenotipo lac (actividad β -galactosidasa) se evaluó después de la incubación durante 24 horas.

Cepa	Agar MacConkey + Fe (exceso de hierro)	Agar MacConkey agar + dipyridyl (restricción de hierro)
H1681	Colonias rojas	Colonias rojas
H1681 + pSJR21	Colonias blancas	Colonias rojas

Como se aprecia en la Tabla III.6, únicamente se obtiene el fenotipo de “colonias blancas” en el caso de la cepa H1681 complementada con el plásmido pSJR21 y crecida en condiciones de exceso de hierro. El gen *fur*, que se introdujo en la cepa *fur*⁻ de *E. coli* (H1681), se ha expresado originando la proteína Fur que, en condiciones de exceso de hierro actúa sobre el promotor *fhuF* reprimiendo la transcripción del gen de la β -galactosidasa, con lo cual la bacteria no es capaz de utilizar la lactosa del medio MacConkey y por ello las colonias resultantes son de color blanco, es decir, tienen el fenotipo lac⁻ (Figura III.21). En cambio, cuando la cepa H1681 transformada con pSJR21 se cultiva en medio con limitación de hierro, la proteína Fur tiene menor probabilidad de unir hierro, dimerizarse y asociarse al promotor *fhuF*, con lo cual la transcripción del gen *lacZ* se posibilita, y ello conlleva un fenotipo de “colonias rojas” en medio MacConkey (Figura III.21). En cambio, si la cepa indicadora H1681 no se transforma con ningún homólogo del gen *fur*, no existe este cambio de fenotipo por mucho que cambien las condiciones de disponibilidad de hierro del medio.

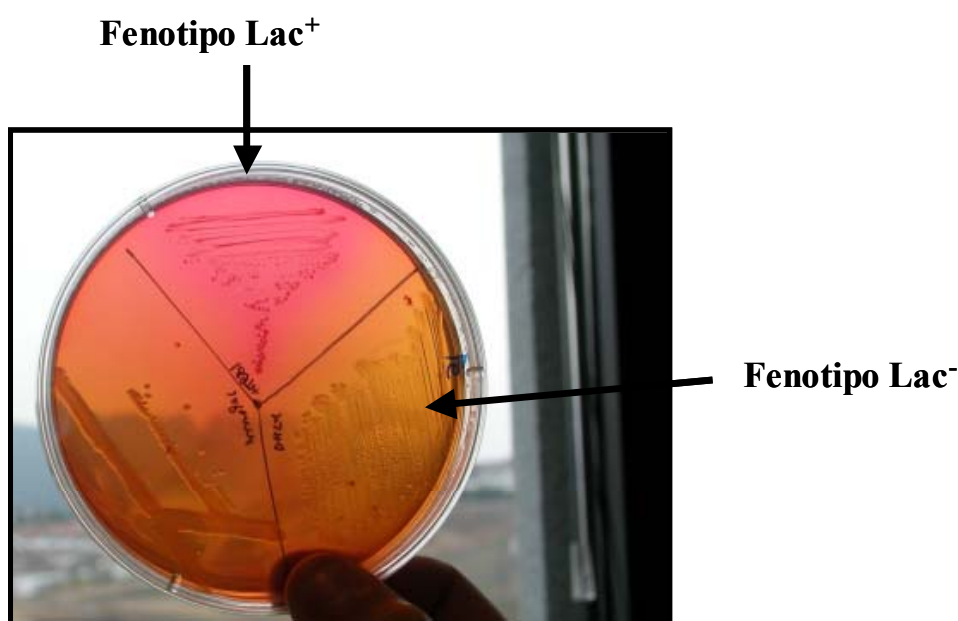


Figura III.21.-Fenotipo Lac de la cepa de *E. coli* H1681 en medio agar MacConkey suplementado con un exceso de hierro. La colonia que porta el plásmido con el gen *fur* de *P. damsela* subsp. *piscicida* tiene reprimida la fusión génica *fhuF::lacZ*, y por ello la colonia crece con color blanco. La cepa H1681 sin plásmido no tiene reprimida esta fusión, expresándose la actividad β -galactosidasa, y generando colonias rojas.

Con este resultado se demuestra que el gen *fur* de *P. damsela* subsp. *piscicida* es capaz de complementar funcionalmente la cepa H1681. Además, esta complementación es dependiente de la concentración de hierro del medio, como se ve reflejado al obtener el fenotipo lac⁺ al quelar el hierro con el 2,2'-dipyridyl, y crear unas condiciones pobres en este elemento. En este caso, la proteína Fur no se ha unido al promotor y no se ha inhibido la transcripción del gen de la β-galactosidasa. Todo ello demuestra que la proteína Fur de *P. damsela* actúa como un represor transcripcional cuya capacidad de unión a la “Fur-box” del DNA es dependiente de la presencia de Fe⁺².

3.3.5. Ensayo FURTA

Como ya se comentó en la introducción, esta técnica está basada en la utilización de una fusión génica entre el gen *fhuF*, regulado por Fur, y el gen *lacZ* (Stojiljkovic *et al.*, 1994). La introducción en una bacteria con esta construcción, de un vector de alto número de copia con un promotor clonado que lleve una caja Fur, hace que éste desplace completamente a la proteína Fur del promotor del gen *fhuF*, permitiendo su expresión y la producción de β-galactosidasa, que hace que el medio tome un color rojizo.

En el medio Agar MacConkey, la cepa H1717, complementada con el plásmido pCAR113, creció con el fenotipo lac⁻ (colonias blancas), lo cual indica que el inserto de dicho plásmido no contiene ninguna “Fur box”. Por tanto, existe una evidencia experimental de que el gen *fur* de *P. damsela* no está regulado por su propio producto.

3.3.6. Construcción de árboles filogenéticos

Con el fin de estimar la utilidad del gen *fur* y la proteína Fur como marcadores filogenéticos se utilizaron las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de ambas subespecies de *P. damsela*, *V. fischeri*, *V. logei*, *V. salmonicida*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. anguillarum*, *E. coli* y *Aeromonas hydrophila* para la construcción de árboles filogenéticos que luego se compararon con los construidos utilizando el gen del rRNA 16S. Para ello se siguió el método de Kimura de las

distancias genéticas, acoplado al algoritmo del *Neighbour-joining* (Figuras III.18, III.19 y III.20).

En los tres árboles se puede observar que *P. damsela* subsp. *piscicida* se agrupa con *P. damsela* subsp. *damsela* y a su vez ambas subespecies forman un grupo que se une con el resto de las especies del género *Vibrio*. Ambas ramas se sitúan, además, claramente distanciadas tanto de *E. coli* como de *A. hydrophila*.

Las topologías de los árboles construidos utilizando los tres tipos de secuencias, revelaron relaciones filogenéticas congruentes, que fueron reforzadas después con los análisis *bootstrap* que se reflejan en las Figuras III.18, III.19 y III.20.

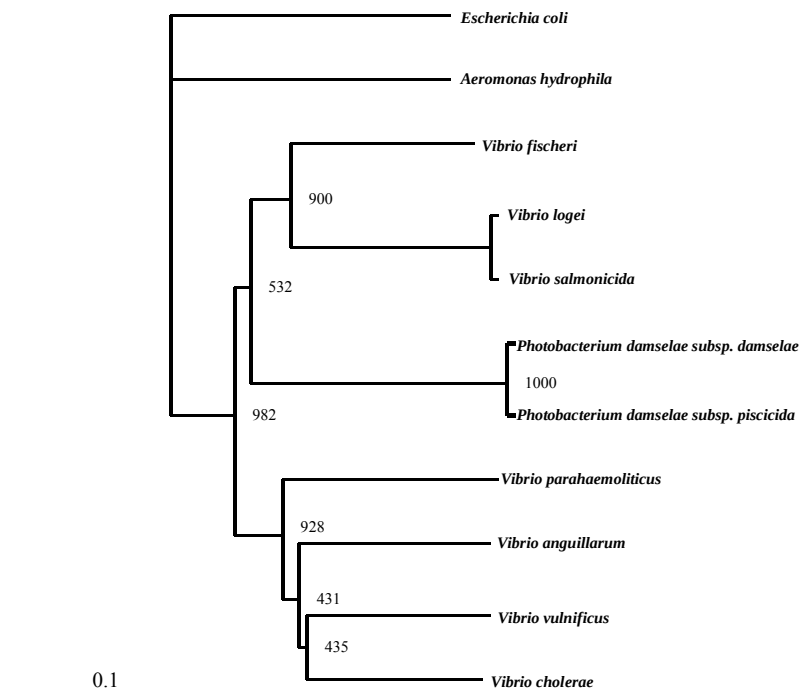


Figura III.18-Árbol filogenético *Neighbour-joining* del gen *fur* en *Vibrio* sp., en relación a *Aeromonas hydrophila* y *E. coli*. Los valores *Bootstrap* se sitúan en los nodos de las ramas.

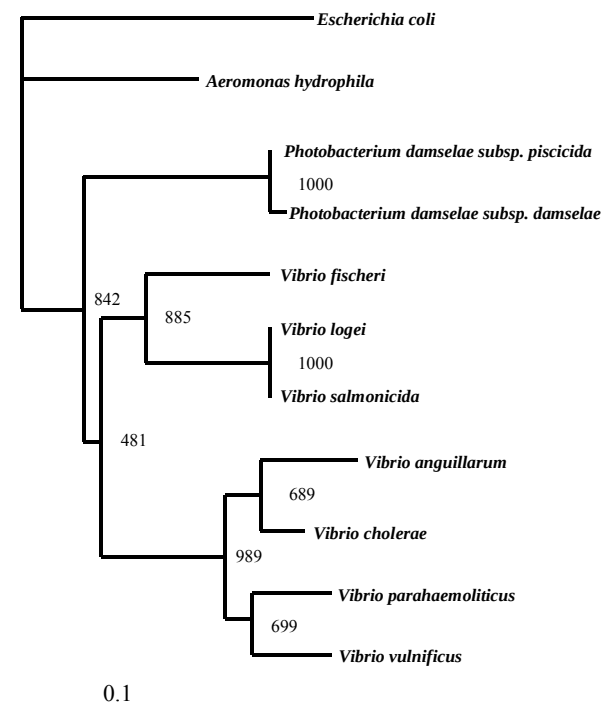


Figura III.19.-Árbol filogenético *Neighbour-joining* de la proteína Fur en relación con *Aeromonas hydrophila* y *E. coli*. Los valores *Bootstrap* se sitúan en los nodos de las ramas.

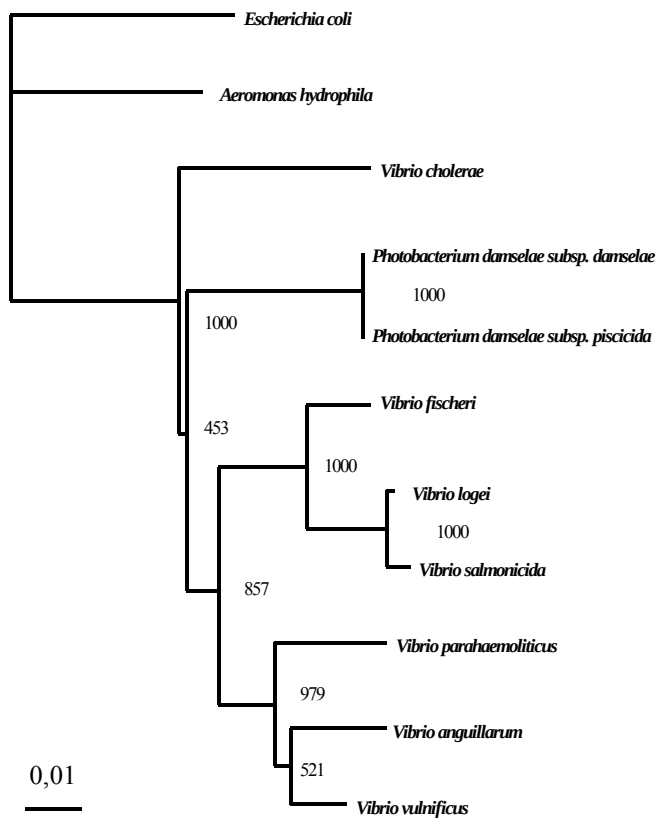


Figura III.20.-Árbol filogenético *Neighbour-joining* del gen del RNA ribosómico 16S con relación a *Aeromonas hydrophila* y *E. coli*. Los valores *Bootstrap* se sitúan en los nodos de las ramas.

3.4. Discusión

El hierro juega un importante papel en la regulación de la expresión de los genes implicados tanto en la captación de hierro como en la virulencia bacteriana. Estudios previos, sugerían que *P. damsela* subsp. *piscicida* debía contener un sistema para la regulación de la concentración intracelular de este elemento (Magariños *et al.*, 1994c); se postuló pues la presencia de un sistema de regulación similar al de Fur, y se consideró un buen punto de partida de este estudio la caracterización del mismo. Así se procedió a la búsqueda, clonaje y secuenciación tanto del gen *fur*, como de sus regiones adyacentes.

A pesar de que en trabajos previos con *Klebsiella pneumoniae* se había sugerido que la región anterior del gen *fur* se encontraba poco conservada (Achenbach y Yang, 1997), esta propuesta no se corresponde con la distribución que se encontró al secuenciar las diferentes pautas de lectura abiertas adyacentes al gen *fur* en *P. damsela* subsp. *piscicida*. La presencia de la ORF *fldA* en la región anterior a *fur*, que se transcribe en su misma dirección, combinada con la de la ORF *glnS* que se encuentra a continuación y se transcribe en la dirección opuesta como ya se reflejó anteriormente, hacen que se reconstruya el mismo patrón ya encontrado en *Vibrio salmonicida* y *V. logei* (Colquhoun y Sorum, 2002). Del mismo modo, las búsquedas realizadas en las bases de datos, revelaron también una misma organización de estos genes en *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*. Resulta pues evidente la existencia de un orden génico conservado en la zona colindante con el locus *fur* dentro de la familia *Vibrionaceae*. Pero además, el orden de estos genes es similar al encontrado también en *Escherichia coli* y *Aeromonas hydrophila*, y la existencia de un homólogo al gen *fldA* en la zona anterior al gen *fur* ha sido también descrita en *Alteromonas* sp. (Tsujibo *et al.*, 2000), y en *Histophilus ovis* (AF386645), siendo estas cuatro especies razonablemente distantes en términos filogenéticos de *P. damsela* subsp. *piscicida*. El gen de la flavodoxina (*fldA*) ha sido descrito en *E. coli* (Gaudu y Weiss, 2000) y es en principio un gen de copia única, aunque se ha postulado la existencia de un segundo gen (*fldB*) por similitud con la secuencia del gen *fldA*. La mutación del gen *fldA*, no así de *fldB*, resultó ser letal para la bacteria tanto bajo condiciones aeróbicas como anaeróbicas. FldA forma parte del regulón SoxRS (respuesta al superóxido), que responde al estrés oxidativo generado por los distintos agentes redox.

El gen *fur* presenta en las dos subespecies de *P. damsela* una longitud de 447 pb, siendo pues un gen de tamaño muy similar al descrito en las diferentes especies de la familia *Vibrionaceae*, como *V. cholerae* (Litwin *et al.*, 1992), *V. parahaemolyticus* (Yamamoto *et al.*, 1997), *V. logei* y *V. salmonicida* (Colquhoun y Sorum, 2002), *V. vulnificus* (Litwin y Calderwood, 1993) y *V. anguillarum* (Tolmasky *et al.*, 1994). Su secuencia nucleotídica presenta una elevada homología con respecto a otras especies del género *Vibrio*, con porcentajes de identidad siempre superiores al 73%, siendo el más elevado el que presenta respecto al gen *fur* de la subespecie *damsela* (99,77%), seguido de lejos por el resto de vibrios. Esta identidad en la secuencia nucleotídica con respecto a la subespecie *damsela* corrobora la estrecha relación filogenética existente entre las dos subespecies de *P. damsela*, la cual contrasta con las diferencias tanto fenotípicas (Tabla I.2 Introducción) como ecológicas que existen entre ambas.

En el gen *fur* de *P. damsela*, 32 pb antes del codón ATG de iniciación del gen, se localizó la secuencia consenso AGGAAA como presunta región de unión del ribosoma (RBS). No se ha localizado ninguna secuencia similar a la establecida como consenso de la “caja Fur” (Escolar *et al.*, 1999) en la región anterior del gen *fur* de *P. damsela* subsp. *piscicida*, y el resultado de la técnica FURTA realizada para comprobar si existía un promotor regulado por Fur, fue negativo. Esto indica que *fur* no debe estar autorregulado como es el caso en *Pasteurella multocida* y *E. coli*, sin embargo está en concordancia con lo que sucede en *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. salmonicida* o *V. logei* (Colquhoun y Sorum, 2002). Las presuntas regiones -35 y -10 del gen fueron localizadas tomando como base las secuencias consenso existentes en la región corriente arriba del ATG inicial.

El gen *fur* de *P. damsela* codifica una proteína de 148 aminoácidos, altamente conservada tanto en diferentes especies del género *Vibrio*, con porcentajes de similitud que no bajan del 83%, como con respecto a otras especies bacterianas más alejadas filogenéticamente, como son *E. coli* o *A. hydrophila*. La proteína Fur de ambas subespecies, *piscicida* y *damsela*, es prácticamente idéntica difiriendo únicamente en una posición aminoacídica. El grado de homología más elevado, con respecto al resto de bacterias con las que se comparó, se corresponde con la secuencia de aminoácidos de la proteína Fur de *P. profundum*, lo cual es lógico al tratarse del mismo género bacteriano, y una vez más apoya la inclusión en el género *Photobacterium* de las anteriormente denominadas *Vibrio damsela* y *Pasteurella piscicida*.

Por otra parte se observó un alto grado de conservación en casi todas las regiones de la proteína, sobre todo en el extremo N-terminal, presentando el extremo C-terminal un mayor número de divergencias. Las regiones que comprenden del aminoácido 105 al 121, y del 132 hasta el final de la proteína son las menos conservadas dentro de esta porción C-terminal, la cual parece que pueda tener un papel relevante en la unión a los iones metálicos, como se ha descrito previamente (Tolmasky *et al.*, 1994).

Este alto grado de conservación se cumple tanto para la proteína Fur (Bsat *et al.*, 1998), como para la señal que ésta reconoce en la región promotora de los genes regulados por hierro (*Fur box*) (Xiong *et al.*, 2000), como se ha descrito en numerosas ocasiones. Generalmente, los reguladores originales de sistemas homólogos divergen bastante entre especies distantes entre sí; por ello, la transferencia horizontal de este tipo de operones génicos, suele suceder de modo simultáneo a su respectivo regulador. El caso del represor Fur es diferente; los genes implicados en la captación de hierro del medio están estrechamente conectados con los relacionados con procesos de patogénesis, por ello, están sujetos con mucha frecuencia a procesos de transferencia horizontal dentro de islas patogénicas, plásmidos implicados en la virulencia, etc. (Chai *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1999). En el caso de Fur, a menudo se ha observado la transferencia de los sistemas regulados por esta proteína, sin ir acompañados de sus respectivos reguladores; éstos sin embargo se rigieron luego por reguladores pre-existentes en la bacteria receptora que se unían a las mismas cajas Fur de las bacterias de origen (Escolar *et al.*, 1999). Ésta podría ser una posible explicación al alto grado de conservación existente entre diferentes especies (Panina *et al.*, 2001).

Estudios realizados con la proteína Fur de *E. coli*, utilizando técnicas de resonancia magnética nuclear, habían sugerido la importancia de la histidina 33 y la 132 en la coordinación del hierro (Saito *et al.*, 1991; Saito y Williams, 1991). Sin embargo, mientras que la histidina 33 está conservada en todas las secuencias Fur conocidas, la 132 se reemplaza en varias especies del género *Vibrio* por una lisina, lo cual llevó a cuestionar la importancia real de esta histidina (Lam *et al.*, 1994). Estudios posteriores utilizando una variedad de técnicas físico-químicas (Hamed, 1993), sugirieron que las histidinas 87 y 132, que vemos conservadas también en *P. damsela* subsp. *piscicida*, podrían desempeñar algún papel en la región mayor de unión del hierro en *E. coli*.

El análisis de la secuencia de la proteína revela también la presencia, entre los aminoácidos 86 y 96, de una región muy rica en histidina. La secuencia de esta región (His-His-His-X-His-X₂-Cys-X₂-Cys) se corresponde con un motivo de unión de hierro

también presente en *E. coli* y *V. cholerae* (Arnold y Haymore, 1991; Staggs y Perry, 1992), y está muy conservado entre las proteínas Fur de distintos microorganismos (Lam *et al.*, 1994).

Como se desprende de los resultados descritos, existe una conservación de las posiciones relativas de las diferentes especies de *Vibrio* en los árboles filogenéticos con respecto a las subespecies de *P. damsela* y a las especies más alejadas como *E. coli*. Tanto si tenemos en cuenta el árbol generado utilizando las secuencias de nucleótidos del gen *fur*, del rRNA 16S, o las de la proteína Fur, el resultado es muy similar. Los taxones más cercanos a *P. damsela* (se comparan ya ambas subespecies a la par con el resto de géneros), son los que aparecen formando parte del llamado grupo de “Vibrios de agua fría” constituido por *V. fischeri*, *V. logei* y *V. salmonicida*, entre los cuales ya se había postulado una cercana relación filogenética basada en la secuencia de la proteína Fur y la del gen del rRNA 16S (Colquhoun y Sorum, 2002). Este resultado sugiere por tanto una mayor proximidad evolutiva entre estos dos grupos mencionados, que entre *P. damsela* y el resto de Vibrios, siendo la posición más alejada en los árboles la que ocupa *V. vulnificus*.

A pesar de ser un gen de pequeño tamaño (444 pb) las filogenias deducidas con las secuencias del gen *fur* están en concordancia con las deducidas con el gen del rRNA 16S (1,5 kb), lo cual indica que el gen *fur* no es un reloj molecular errático, y puede ser por lo tanto utilizado como marcador filogenético, como ya han sugerido otros autores, y que el gen *fur*, al igual que el gen del rRNA 16S, no está sujeto a transferencia horizontal (Achenbach y Yang, 1997; Colquhoun y Sorum, 2002).

Durante la realización de este estudio, la información obtenida acerca de un sistema de regulación por Fur en *P. damsela* similar a la de *E. coli*, abrió la puerta a estudios genéticos realizados con el propósito de localizar genes regulados por hierro en *P. damsela* subsp. *piscicida* utilizando la técnica FURTA (Osorio *et al.*, 2004b).

La mayor parte de las bacterias, y probablemente ese sea también el caso de *P. damsela* subsp. *piscicida*, tienen únicamente un representante de la familia Fur en sus genomas; sin embargo no se puede afirmar esto de manera rotunda, ya que existen excepciones, como es el caso de *Bacillus subtilis*, que presenta tres genes parálogos (genes muy parecidos de *clusters* diferentes): *fur* (ferric uptake regulator), *zur* (zinc uptake regulator) y *perR* (represor del regulón-peróxido) (Fuangthong y Helmann, 2003). Tampoco tenemos la certeza de que los genes que están sometidos a regulación en función de la concentración de hierro del medio, no estén controlados además por

algún otro tipo de sistema, de forma conjunta con Fur o independientemente; así, en *Vibrio cholerae*, la proteína A regulada por hierro (*irgA*), se encuentra reprimida por Fur, pero a la vez activada por IrgB (Watnick *et al.*, 1998).

El número de genes regulados por la proteína Fur en un microorganismo, suele estar entre 80 y 100, y la mayoría de ellos tienen algún tipo de relación, directa o indirectamente, con la captación o el metabolismo del hierro, como detectaron Panina *et al.*, (2001) al aplicar técnicas de genómica comparada con los genomas de *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Yersinia pestis* o *V. cholerae*. Este número podría quedar infraestimado en *P. damsela* subsp. *piscicida*, si únicamente se tienen en cuenta los genes descritos como resultado de la aplicación de la técnica FURTA (Osorio *et al.*, 2004b). En este sentido, las cajas Fur de los microorganismos ensayados pueden diferir lo suficiente de la secuencia consenso de *E. coli* como para que no pueda liberarse la represión por Fur de la fusión *fhuF-lacZ*, base de esta técnica, con lo cual muchos genes pasan desapercibidos a tal detección.

El papel de *fur* en la patogénesis es también de especial interés. Existen diversos microorganismos donde se han construido mutantes de este gen y se ha observado la atenuación en la virulencia de la bacteria (Franza *et al.*, 1999; Horsburgh *et al.*, 2001). Esta atenuación se atribuyó en primer lugar a la vinculación del regulador Fur con la respuesta al pH ácido, siendo los mutantes afectados en esta proteína más sensibles al pH bajo y no superando entonces su paso por el estómago del huésped (Riesenberg-Wilmes *et al.*, 1996). Sin embargo, en contra de esta idea se ha visto en *E. coli* que aunque el gen *fur* está implicado en la respuesta a la tolerancia al pH ácido, no se puede concluir que esté implicado en la patogenicidad de esta bacteria (Zhu *et al.*, 2002).

La disminución de la virulencia de los mutantes *fur* se ha atribuido también a la elevada sensibilidad que éstos presentan ante el estrés oxidativo (Horsburgh *et al.*, 2001; Campoy *et al.*, 2002). Por otro lado, también puede achacarse la disminución en la virulencia del mutante *fur* a la menor concentración intracelular de AMPc, ya que también se ha demostrado que el proceso infectivo causado por *Salmonella typhimurium* requiere unos niveles elevados de este nucleótido (Campoy *et al.*, 2002).

Las deficiencias en el crecimiento y la virulencia de los mutantes *fur* pueden estar condicionadas asimismo por el aumento de la concentración intracelular de hierro al no estar sujetos los sistemas de captación de este elemento al efecto represor de la proteína Fur (Staggs *et al.*, 1994; Furano y Campagnari, 2003), con la redundante inversión energética llevada a cabo en la producción de proteínas reguladas por Fur en

presencia de cantidades suficientes de hierro, o con la baja expresión de enzimas metabólicos regulados positivamente por Fur (Jacobsen *et al.*, 2005).

La proteína Fur está muy bien conservada tanto en bacterias gram negativas como en gram positivas, y la reducida patogenicidad de los mutantes *fur* descritos hasta el momento, hace de esta proteína un buen candidato para ser utilizado como blanco de nuevos agentes antimicrobianos (Harvie *et al.*, 2005).

3.5. Anexos

Tabla III.7.-Oligonucleótidos diseñados a lo largo del capítulo III.

Oligonucleótido	Secuencia
Furnew-5'	AACRGGAAAGTRTATGTCAG
Furnew-3'	CCRTAHARRTADAGGCTGTG
IP-DI21-fur-2	GAAGATCTTCAAACGAGGTAGTGTAAT
Fur-pisc-5'1	ACAACCAGAGTGTCAACACA
Delfur-DI21 3'1	GCAAGCTTTACGTGATACTTGGGCTAAAA
Delfur-DI21 5'1	GCGGATCCCATGATACATCCTGATAACAA

Tabla III.8.-Plásmidos contruidos a lo largo del capítulo III.

Plásmido	Vector de clonación	Construcción
pCAR 016	pGEM-T Easy	Fragmento resultante de la PCR realizada con los cebadores degenerados furnew-5'y furnew-3' utilizando como molde el DNA de la cepa DI21 de <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i>
pCAR 106	pGEM-T Easy	Fragmento de PCR que incluye los genes <i>fur</i> y <i>glnS</i> , ambos incompletos, de la cepa DI21 de <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i>
pCAR 113	pGEM-T Easy	Fragmento de PCR que incluye el gen <i>orf1</i> , y los genes <i>fur</i> y <i>fld</i> , ambos incompletos, de la cepa DI21 de <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i>
pSJR21	pWKS30	Gen <i>fur</i> completo de <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i>
pSJR22	pGEM-T Easy	Gen <i>fur</i> completo de <i>P. damselae</i> subsp. <i>damselae</i>

Capítulo IV

Mecanismos de captación de grupos hemo en
Photobacterium damsela

4.1. Introducción

4.1.1. El grupo hemo y las hemoproteínas

El grupo hemo está constituido por la molécula de protoporfirina IX con un átomo de hierro central (Figura IV.1). Si bien suele utilizarse la denominación hemo para cualquiera de los dos estados redox de la molécula, en sentido estricto, el término hemo se refiere a la forma reducida de la molécula (Fe^{+2}), y cuando se habla de hemina es para hacer alusión a la forma oxidada (Fe^{+3}) (Genco y Dixon, 2001).

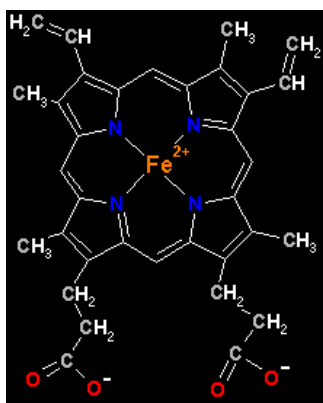


Figura IV.1.-Estructura química del grupo hemo.

La molécula “hemo” es uno de los cofactores enzimáticos más importantes, mediando en reacciones de transporte de oxígeno y producción de energía entre otras funciones. De hecho, las bacterias emplean un 10% del contenido celular total de hierro en la biosíntesis del grupo hemo.

Disponibilidad de hemo

Aunque las monedas de cambio del metabolismo del hierro en los vertebrados son fundamentalmente la transferrina y la ferritina, la mayor cantidad de hierro presente en el organismo está asociado al grupo hemo, formando parte de las llamadas hemoproteínas (Guyton, 1994); entre ellas se encuentran:

* **La hemoglobina;** es la más importante y abundante de todas ellas (Evans *et al.*, 1999). Es un tetrámero con dos cadenas α y dos cadenas β , y cada una de sus subunidades une una molécula de hierro. La molécula completa tiene un peso molecular

de 64.450, y podemos encontrarla como deoxihemoglobina, oxihemoglobina, y metahemoglobina; cada una de estas formas, presenta una estructura tridimensional concreta. Encargada del transporte de oxígeno, la hemoglobina puede llegar a contener hasta un 65% del hierro total del organismo.

* **Haptoglobina**; cuando la hemoglobina es liberada por la hemólisis de los eritrocitos, se une a la haptoglobina, una glucoproteína sérica. El complejo haptohemoglobina-hemoglobina es una fuente de hierro para varias especies de bacterias (Morton *et al.*, 1999).

* **Hemopexina**; La protección ante el hemo libre en el plasma la proporciona la hemopexina, que lo une con gran afinidad. Es una glucoproteína de unos 60 kDa, encargada de transportar los grupos hemo hasta el hígado (Paoli *et al.*, 1999). Se ha visto que el complejo hemo-hemopexina puede ser unido por varias especies de bacterias, sin embargo no se ha demostrado su posterior uso específico (Wandersman y Delepelaire, 2004).

* **Los citocromos**; participan en las reacciones de transferencia de electrones.

* **Las catalasas y peroxidasas**; son enzimas encargadas de la protección celular frente a especies químicas potencialmente dañinas generadas en las reacciones de oxidación, entre las que figura entre otros sustratos el peróxido de hidrógeno.

* **La albúmina**; Es la proteína plasmática más abundante en el plasma (60% de las proteínas séricas), y también es una transportadora de hemo. En condiciones de laboratorio ha demostrado ser una buena fuente de hemo para las bacterias, sin embargo no se han descrito receptores específicos de albúmina.

* **Otras hemoproteínas**; en plantas y animales hay otras hemoproteínas en las cuales el hemo no aparece unido covalentemente a las apoproteínas. Entre ellas podemos nombrar la mioglobina y la leghemoglobina, que han demostrado poder ser utilizadas como fuente de hemo por las bacterias en condiciones de laboratorio. Alternativamente, el grupo hemo puede ser liberado de las hemoproteínas mediante la degradación de éstas mediante proteasas de superficie o bien extracelulares, como en el caso de *Porphyromonas gingivalis* (O'Brien-Simpson *et al.*, 2003).

El grupo hemo también puede presentarse en ocasiones asociado a lipoproteínas. (Camejo *et al.*, 1998).

4.1.2. Mecanismos de captación de hemo

Como ya se comentó en la introducción general, los mecanismos bacterianos de captación de hemo se distribuyen en dos grandes grupos, en función de si existe unión directa entre el grupo hemo y receptores de membrana TonB dependientes, o bien si el hemo se une a proteínas solubles secretadas por la bacteria.

4.1.2.1. Unión directa de hemo y hemoproteínas a receptores de membrana externa dependientes de TonB

Los sistemas bacterianos de unión directa de hemo y hemoproteínas se clasifican, a su vez, dependiendo del grado de especificidad del receptor. Así, encontramos receptores que pueden utilizar como fuente de hierro una gran variedad de compuestos que contienen hemo, como por ejemplo los receptores de hemo/hemoglobina de *Yersinia*, *E. coli* y *Shigella*; y receptores altamente específicos para una hemoproteína en particular, como por ejemplo HutA de *V. cholerae* (Wandersman y Stojiljkovic, 2000). Pese a estas diferencias, todos estos receptores median la disociación del grupo hemo de la hemoproteína previamente al transporte de éste a través de la membrana externa, a través de un proceso dependiente de la proteína TonB.

4.1.2.2. Adquisición de hemo y hemoproteínas dependiente de proteínas solubles

Los hemóforos son pequeñas proteínas extracelulares secretadas por transportadores de tipo ABC mediante un proceso que implica una secuencia de secreción carboxilo-terminal. Su función es la de unir hemo y entregarlo a un receptor específico de membrana externa. El sistema HasA/HasR de *Serratia marcescens* (Letoffe *et al.*, 1994), es el mejor caracterizado: HasA es un hemóforo secretado en condiciones restrictivas de hierro que puede extraer el hemo de la hemoglobina. HasR tiene similitud con otros receptores TonB dependientes. HasA es indispensable para la adquisición del grupo hemo de la hemopexina y de la mioglobina, y aunque no es imprescindible para la adquisición de hemo vía HasR, se ha visto que la presencia de HasA aumenta sustancialmente la capacidad de transporte de hemo libre o hemo asociado a hemoglobina. De este modo, HasA además de aumentar la eficiencia del

sistema de transporte, aumenta también la variedad de fuentes de hemo utilizadas. Se han detectado hemóforos libres de ligando con capacidad de unión a su receptor; se desconoce si se produce un intercambio de hemo o un desplazamiento debido a las afinidades diferenciales del receptor por la forma cargada y libre del hemóforo (Letoffe *et al.*, 2001). HxuA es un hemóforo de *Haemophilus influenzae* implicado en la captación de hemo y hemopexina. La agrupación génica *hxuCBA* codifica también un receptor de membrana externa y una proteína de secuencia similar a los componentes de exportación de toxinas proteicas.

4.1.3. Mecanismos de captación de hemo en la Familia *Vibrionaceae*

La utilización de grupos hemo como fuente de hierro parece ser una característica habitual en muchas bacterias patógenas (Osorio y Lemos, 2002). En éstas, el primer paso para la obtención de hemo, consiste en conseguir el acceso al depósito intracelular de hemoproteínas. Los eritrocitos del hospedador constituyen una buena fuente de hemo y, por ello, muchas especies bacterianas han desarrollado mecanismos para lisar las células y liberarlo mediante hemolisinas (Stoebner y Payne, 1988).

Han sido descritos varios mecanismos de captación de hemo, pero la mayoría de ellos incluyen la síntesis de receptores proteicos de membrana externa, regulados por hierro, que son responsables de la internalización del grupo hemo hasta el periplasma celular, y generalmente dependientes de un sistema TonB generador de energía; en el periplasma, habitualmente se encuentra una proteína captadora de hemo. Además, suelen tener también una permeasa y una proteína que hidroliza el ATP, ambas ancladas en la membrana interna celular, y que juntas forman el denominado transportador ABC (Figura IV.2).

Dentro de la familia *Vibrionaceae*, hay diferentes especies que poseen la capacidad de utilizar el hierro del grupo hemo. Entre ellas están *Vibrio cholerae*, *V. anguillarum*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. parahemolyticus* y *Photobacterium damsela*.

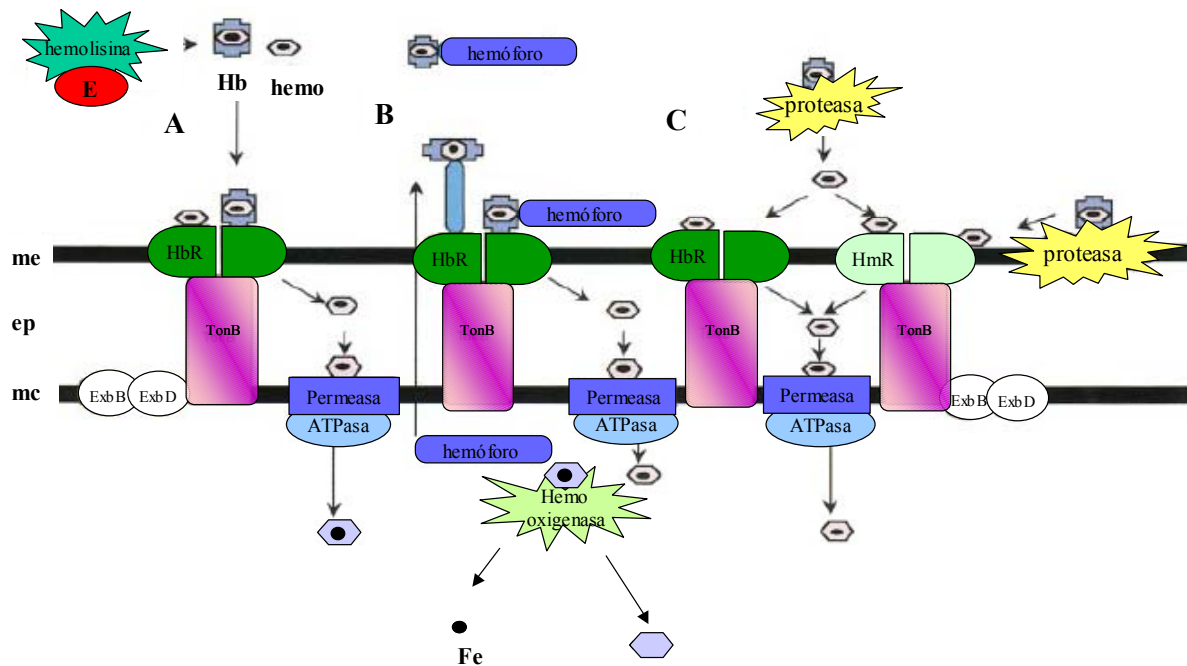


Figura IV.2.-Mecanismos microbianos implicados en la captación de grupos hemo. Los eritrocitos (E) son degradados por hemolisinas bacterianas, y de este modo se liberan al medio la hemoglobina (Hg) y el hemo. Una vez liberado, el hemo puede ser introducido en la célula según diferentes mecanismos: A- unión directa de la Hg a un receptor de membrana externa (RME) TonB-dependiente. Se cree que la unión de la Hg al receptor podría producirse en un lugar diferente al del hemo. B- unión de las hemoproteínas a una familia de proteínas secretadas por la célula (hemóforos) que se ocupan de conducirlos hacia el RME. C- Degradación de las hemoproteínas por proteasas bacterianas con la consiguiente liberación y unión de la hemina al RME. El RME se encarga de interiorizar la hemina hacia el espacio periplásmico (ep) mediante un proceso dependiente de la energía suministrada por el complejo TonB-ExbB-ExbD. Ya en el interior celular se hipotetiza que una hemo-oxigenasa sería la encargada de degradar el grupo hemo y liberar así el hierro. Modificado de Genco y Dixon (2001).

4.1.3.1. Receptores de hemo en la Familia *Vibrionaceae*

La molécula “hemo” como tal, no se encuentra libre en los organismos, y por lo tanto la bacteria ha de adquirirlo a partir de las hemoproteínas. Para ello, las bacterias han desarrollado receptores de membrana externa con especificidad para la molécula de hemo, que ha sido demostrada mediante estudios de unión de hemina, y de análisis de mutantes (Henderson y Payne, 1993; Lee, 1995). Algunos estudios revelaron la presencia de receptores específicos para utilizar el hemo unido a la hemoglobina. Este es el caso del receptor de hemoglobina (HmbR) de *Neisseria meningitidis*, ya que un mutante *hmbR* resulta incapaz de utilizar hemoglobina, pero conserva la capacidad de utilizar hemina como fuente de hierro (Stojiljkovic *et al.*, 1995). También se demostró

la existencia de receptores específicos para la hemoglobina en algunas especies de *Haemophilus*, realizando ensayos de unión en fase sólida en presencia de hemo (Elkins *et al.*, 1995).

En *V. cholerae* el receptor HutA es esencial para que la bacteria sea capaz de utilizar hemoglobina como fuente de hemo. A pesar de que en esta especie han sido descritos al menos tres receptores de hemo, se comprobó que la inactivación de HutA reducía significativamente la capacidad de esta bacteria para utilizar hemoglobina, si bien mantenía la capacidad de utilizar la hemina, lo cual sugiere una interacción directa entre HutA y la hemoglobina (Mey y Payne, 2001).

Algunos estudios indican la posibilidad de que los lipopolisacáridos presenten la característica de unir hemina en algunas bacterias, como en el caso de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Belanger *et al.*, 1995) o *P. damsela* subsp. *piscicida* (do Vale *et al.*, 2002). Dichas interacciones podrían facilitar el transporte del grupo hemo al interior celular.

El grupo hemo es transportado a través de la membrana externa hacia el espacio periplásmico mediante un proceso TonB-dependiente. No está muy claro si la proteína con capacidad de unión de hemo es siempre la responsable de internalizarlo después; existe así la posibilidad de la existencia de proteínas de unión encargadas de unir el hemo, y transferirlo a un segundo componente que lo llevaría al interior celular, y que sería el receptor y transportador propiamente dicho. Por ejemplo, en *V. anguillarum*, un mutante del receptor HuvA carece de la posibilidad de internalización de la hemina del medio, pero no de la unión de la misma a la superficie celular (Mazoy *et al.*, 2003), lo cual indica que la hemina puede ser unida por proteínas de la membrana externa que realmente no tienen función transportadora. En cambio en el caso de *V. cholerae*, el receptor de membrana externa HutA, sería el único encargado de realizar ambas funciones (Henderson y Payne, 1994b).

Otro tema a considerar, es si las especies de la familia *Vibrionaceae* retiran el hierro de la molécula de hemo y es aquél lo único que transportan al interior celular, o si lo que entra en la célula es la molécula de hemo completa. En este sentido, se han realizado experimentos con *V. cholerae*, que han demostrado que la molécula de hemo se internaliza completa dentro de la célula (Henderson y Payne, 1993).

Para identificar las moléculas que unen la hemina en especies de *Vibrio*, se han realizado diversos ensayos bioquímicos como cromatografía de afinidad y unión de ligando. Las proteínas de membrana externa responsables o bien de unir, o bien de

transportar el grupo hemo desde el exterior celular, han sido clonadas y secuenciadas en varias especies de la familia *Vibrionaceae*: *V. cholerae* (HutA, HutR y HasR), *V. vulnificus* (HupA), *V. anguillarum* (HuvA) y *V. mimicus* (MhuA). Los pesos moleculares de estas proteínas, están en el rango de entre 77,2 y 79,2 kDa.

En varias especies, la unión de hemina y hemoglobina a receptores proteicos ocurre de forma constitutiva y no está regulada por las condiciones de hierro del medio. Este es el caso de algunas especies como *V. vulnificus* (Fouz *et al.*, 1996), *P. damsela* subsp. *damsela* (Fouz *et al.*, 1994) y *V. anguillarum* (Mazoy *et al.*, 1996). En cambio, tanto en *V. cholerae* (Henderson y Payne, 1994b), como en *V. parahaemolyticus* (Yamamoto *et al.*, 1995), la unión de hemina o hemoglobina está controlada por proteínas reguladas por la concentración de hierro del medio.

En cuanto a la organización génica de los receptores de grupos hemo, ésta es diferente según la especie. Así, mientras en *V. anguillarum* (Mouriño *et al.*, 2004) el receptor HuvA está situado a continuación del resto de los genes del sistema de captación de grupo hemo, al igual que el HugA de *Plesiomonas shigelloides* (Henderson *et al.*, 2001), en otras especies como *Photobacterium profundum*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, y *V. parahaemolyticus* el receptor de membrana externa está distanciado del resto de los genes de transporte.

4.1.3.2. El sistema de transporte TonB

En muchas bacterias Gram negativas, y en concreto en varias especies estudiadas de la familia *Vibrionaceae*, la captación del grupo hemo, así como la de los sideróforos, es un proceso dependiente de energía, en el cual está implicado un complejo proteico constituido por las proteínas TonB, ExbB y ExbD (Braun, 1995; Moeck y Coulton, 1998; Postle, 1990).

El producto resultante del gen *tonB* (proteína TonB), está en contacto tanto con la membrana externa como con la membrana citoplasmática, y es la responsable de la transducción de la fuerza protón-motriz de la membrana citoplasmática a los receptores. La proteína TonB está anclada a la membrana citoplasmática por su extremo N-terminal, el resto de la proteína atraviesa todo el espacio periplásmico, y acaba contactando con los receptores de membrana externa. Existe en estos receptores una región muy conservada conocida como “TonB box”, responsable de la interacción con la proteína TonB. La interacción de la proteína TonB con los receptores, se cree que

induce un cambio conformacional en éstos que conlleva el paso de los ligandos al interior del espacio periplásmico (Figura IV.3) (Skare *et al.*, 1993).

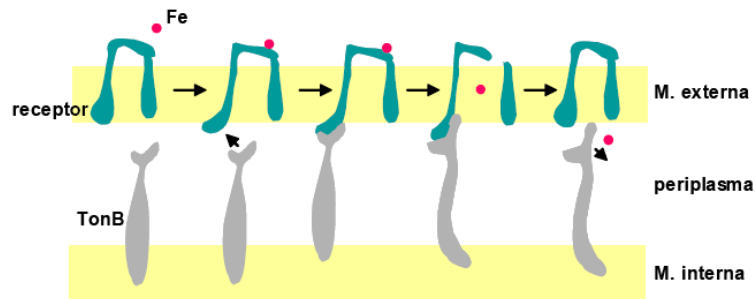


Figura IV.3-Esquema de los distintos pasos del proceso de entrada de hierro a través de la membrana externa, mediado por la proteína TonB.

Las otras dos proteínas, ExbB y ExbD, están ancladas en la membrana citoplasmática. Se encargan de estabilizar la proteína TonB, son también necesarias en el proceso de transporte, y se cree que forman un complejo de unos 520 kDa (Higgs *et al.*, 1998). Estas proteínas auxiliares funcionan juntas para reciclar a la proteína TonB, desde su asociación de alta afinidad por la membrana externa, a su asociación de alta afinidad por la membrana citoplasmática. Se hipotetiza que una vez que TonB se encuentra en un estado de alta afinidad por la membrana citoplasmática, puede cargarse de energía gracias a la fuerza protón-motriz y participar en una nueva ronda de transducción de energía al receptor de membrana externa (Higgs *et al.*, 1998; Held y Postle, 2002). Este sistema permite también la introducción de vitamina B12, colicina y determinados fagos a través de sus receptores de membrana externa específicos (Braun, 1995).

La organización genética de los genes *tonB*, *exbB* y *exbD* en el cromosoma bacteriano no está conservada en todas las especies bacterianas. Por ejemplo, en *E. coli* los genes *exbB* y *exbD* están juntos, pero separados de *tonB*. En el género *Vibrio*, la organización de estos genes aparece documentada sólo en algunas especies pero todas ellas tienen en común que estos tres genes aparecen juntos (Mouriño *et al.*, 2004). En *V. cholerae* se han descrito dos sistemas TonB, uno en cada uno de los dos cromosomas de la bacteria (Occhino *et al.*, 1998). También se han descrito dos sistemas TonB en *P. damsela* subsp. *piscicida* (Osorio *et al.*, 2004b) utilizando la técnica FURTA. En *V. anguillarum* existen dos sistemas TonB (Stork *et al.*, 2004) pero sólo el sistema TonB2

es esencial para el transporte de anguibactina y para la virulencia de la bacteria. Se ha postulado también la existencia de dos sistemas TonB en *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* (O'Malley *et al.*, 1999).

Se conoce poco acerca de la trascendencia del sistema TonB en la patogenicidad. En *Haemophilus influenzae* (Jarosik *et al.*, 1994), tras mutar *tonB*, se llegó a la conclusión de que este gen era necesario no sólo para la captación de hemina, sino para la virulencia de la bacteria en el modelo animal utilizado. La mutación de *tonB* se vio que reducía la virulencia también de especies como *Pasteurella multocida* (Bosch *et al.*, 2002), *Bordetella pertusis* (Pradel *et al.*, 2000), *Pseudomonas aeruginosa* (Takase *et al.*, 2000) y *V. cholerae* (Henderson y Payne, 1994a).

4.1.3.3. Transporte periplasma-citoplasma

Una vez en el espacio periplásmico, la molécula de hemo es unida por una proteína periplásmica, que será la encargada de cederlo al transportador ABC de la membrana citoplasmática. El transporte del grupo hemo al citoplasma bacteriano es también un proceso que requiere energía, es decir, dependiente de ATP (Fath y Kolter, 1993). Los genes implicados en este proceso fueron descritos por primera vez dentro de la familia *Vibrionaceae* en *V. cholerae*, y se denominaron genes *hutB*, *hutC* y *hutD*. Los productos resultantes de estos tres genes conforman un sistema de transporte específico para el hemo, que parece no ser necesario para el transporte al interior del citoplasma de otras moléculas con hierro (Henderson y Payne, 1993; Occhino *et al.*, 1998). La proteína HutB es la proteína que une la hemina en el periplasma, mientras que HutC y HutD forman el transportador ABC (ATP-Binding-Cassette), en el cual HutC es la permeasa, y HutD la proteína hidrolizadora de ATP, responsable de suministrar energía al sistema. La misma organización génica (*hutBCD*) siguen *Plesiomonas shigelloides* (Henderson *et al.*, 2001), (anteriormente miembro de la Familia *Vibrionaceae*), *V. anguillarum* (Mouriño *et al.*, 2004), *V. parahaemolyticus* (Makino *et al.*, 2003) y *V. vulnificus* (Chen *et al.*, 2003).

La unión del sustrato a la proteína periplásmica induce en ésta un cambio conformacional que facilita su reconocimiento por la permeasa. Esta última extrae el ligando y lo transporta a través de la membrana citoplasmática, usando la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP. La hidrólisis no se inicia hasta que dicha enzima interactúa con el ligando, es decir que debe enviarse una señal desde la proteína

periplásmica a la ATPasa para inducir la hidrólisis del ATP, evitándose así un consumo innecesario del mismo (Koster, 2001).

4.1.3.4. Destino del hemo dentro de la célula

A pesar de que se ha avanzado mucho en el conocimiento acerca del transporte del grupo hemo en diferentes microorganismos, todavía se sabe muy poco acerca de lo que sucede con esta molécula una vez entra en el citoplasma de la célula bacteriana. Todo hace suponer que el hemo es degradado para que la célula pueda utilizar el hierro de éste, pero no está claro cómo sucede el proceso. En estudios que se llevaron a cabo con algunas neiserias patógenas (Zhu *et al.*, 2000a; 2000b) y *Corynebacterium diphtheriae* (Schmitt, 1997) se ha descrito la existencia de hemo oxigenasas necesarias para la utilización del hierro en ambos microorganismos, que podrían romper el grupo hemo y liberar el hierro en el citoplasma. Mouriño *et al.* (2004) demostraron, construyendo mutantes de los distintos genes implicados en la captación de hemina, que una mutación del gen *huvZ* inhabilitaba a la célula para esta función. Wyckoff *et al.* (2004) investigaron en *V. cholerae* la presunta importancia del producto del gen *hutZ* en la utilización del grupo hemo. Mutantes de genes que codifican para hemo oxigenasas en *Corynebacterium diphtheriae* y *C. ulcerae* resultaron tener muy poca eficiencia captando hemina del medio. Cuando estos mutantes se complementaron con el operón de tres genes *hutWXZ* de *V. cholerae* se recuperaba la capacidad de crecer en un medio con hemina como única fuente de hierro (Wyckoff *et al.*, 2004). Aunque HutZ se ha caracterizado bioquímicamente, y se ha visto que presenta una gran afinidad para unir hemina, no se le ha detectado actividad hemo oxigenasa, con lo cual el mecanismo exacto de utilización del grupo hemo como fuente de hierro continúa siendo un aspecto a estudiar.

4.1.3.5. Destino intracelular del hierro

Una vez dentro del citoplasma, el hierro tiene distintos destinos. Un 5% pasará a formar parte de los citocromos, un 10% se encuentra en las proteínas de hierro y azufre, otro 10% se encuentra secuestrado por las bacterioferritinas y hasta un 40% se encuentra unido en forma de Fe^{+2} a un carbohidrato ácido (Clarke *et al.*, 2001).

La homeostasis del hierro en las células bacterianas se mantiene gracias a un flujo de este elemento desde las proteínas de almacenamiento al citoplasma y viceversa. Las principales proteínas de almacenamiento son las ferritinas (Ratledge y Dover, 2000). Éstas cumplen una doble función en las células, ya que por un lado son un almacén de hierro y por otro previenen la toxicidad que pueden acarrear niveles altos de éste y del daño por estrés oxidativo.

En *E. coli* la síntesis de ferritina está activada por la proteína Fur (Bereswill *et al.*, 2000), proteína que controla por tanto no sólo la incorporación de hierro del medio sino también su almacenamiento dentro de las células.

4.1.3.6. Regulación transcripcional de los genes involucrados en el transporte de hemo

Como ya se comentó en el capítulo anterior, la regulación de los genes implicados en la utilización de hierro en muchas especies bacterianas, está mediada por la proteína represora “Fur”. Cuando Fur está asociada al ión ferroso (Fe^{+2}), está capacitada para unirse a las *Fur* boxes, secuencias pertenecientes a las regiones operadoras de varios de los genes relacionados con la captación de hemo, controlando así la transcripción de éstos.

Pero la regulación de los genes implicados en la captación de hemina no está sujeta únicamente a regulación negativa. Recientemente se ha descrito en *V. vulnificus* (Litwin y Quackenbush, 2001) una proteína denominada HupR, con homología con los activadores transcripcionales de la familia LysR; los experimentos realizados con HupR, apuntan a que puede funcionar como un regulador positivo de la transcripción de *hupA* (el receptor implicado en la captación de hemina en *V. vulnificus*), bajo condiciones pobres de hierro en el medio, pero en presencia de hemina. Un homólogo de este gen con elevada similitud con el de *V. vulnificus* se ha localizado también en *V. cholerae*, pero todavía no se han llevado a cabo experimentos que demuestren su papel en esta bacteria.

4.1.4. Transporte de hemo y virulencia

Existen numerosos estudios que han demostrado que tanto el grupo hemo como las hemoproteínas tienen un efecto potenciador de la virulencia de diferentes bacterias

(Genco *et al.*, 1991; Litwin y Calderwood, 1993a). La base de estas observaciones es la asunción de que estos compuestos proporcionan las cantidades de hierro necesarias para la expresión de factores de virulencia, tales como hemolisinas o citotoxinas (Litwin y Calderwood, 1993a).

De entre las especies con las que se han realizado experimentos para demostrar la relación existente entre la presencia de mecanismos de captación de hemo y la virulencia se pueden reseñar varios casos. Así, en *V. cholerae* (Henderson y Payne, 1994a) se construyeron mutantes de algunos de los genes implicados en la captación del grupo hemo, y se vio que aquellos veían mermada su capacidad para producir la infección en ratones. En *Neisseria meningitidis* (Stojiljkovic *et al.*, 1995) se comprobó la existencia de dos receptores capaces de captar hemina y hemoglobina del medio, cada uno con mayor afinidad por una u otra molécula, que al ser mutados dieron lugar a una atenuación considerable de la virulencia de la bacteria en ratones. *Haemophilus ducreyi* (Stevens *et al.*, 1996) demostró tener una gran actividad uniendo hemoglobina del medio; se localizó en ella la presencia de un receptor de membrana externa (*hupA*) responsable de la unión de hemoglobina, cuyos mutantes no sólo eran incapaces de unir hemoglobina del medio, sino que presentaron una menor virulencia. Se ha demostrado también que la inyección intraperitoneal de hemina horas antes de la infección experimental con diversas cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida*, tenía un claro efecto potenciador de la virulencia, haciendo que la LD₅₀ de estas cepas disminuyera en 3 ó 4 logaritmos (Magariños *et al.*, 1994c).

De todos modos, en otras bacterias no se ha encontrado una relación clara entre la virulencia y los mecanismos de captación de hemo, como sucedió en el caso de *Yersinia pestis* (Lillard *et al.*, 1999). Se han realizado también ensayos de virulencia en *V. anguillarum* (Mazoy *et al.*, 2003); en este caso, se construyó una cepa con el receptor responsable de la captación de hemina mutado. Los resultados obtenidos tampoco arrojaron demasiada luz, ya que mientras el hecho de tener mutado el gen del receptor HuvA no tuvo ninguna influencia sobre la virulencia de la bacteria en condiciones de infección normales, la adición de hemina al medio sí pareció representar una ventaja para *V. anguillarum* a la hora de colonizar los tejidos del hospedador.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Clonación y secuenciación de los genes responsables del transporte y la internalización del grupo hemo en *P. damsela*

En un estudio previo llevado a cabo en nuestro laboratorio (Osorio *et al.*, 2004b), se aisló de una librería genómica de *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21, mediante la técnica FURTA, el plásmido F-64, que contenía el gen *tonB* completo y un fragmento de *exbB* y *hutW*.

Sobre la base de los grupos de genes de captación de hemina descritos en otras especies de la familia *Vibrionaceae* (Osorio y Lemos, 2002), se asumió la hipótesis de que el resto de los genes responsables de la captación de hemina de *P. damsela* podrían estar ligados al sistema TonB, y se diseñó en consecuencia una estrategia para tratar de clonarlos y secuenciarlos.

Las cepas y plásmidos, así como las secuencias de los cebadores que se construyeron en el presente capítulo, se reflejan en las Tablas IV.5, IV.6 y IV.7 respectivamente, situadas al final del mismo.

4.2.1.1. Identificación de los genes que intervienen en el sistema de transporte de hemo de *P. damsela* subsp. *piscicida*

Clonación y secuenciación de las regiones adyacentes al gen *exbB*

El procedimiento empleado para localizar los genes adyacentes al gen *exbB*, fue el mismo que se utilizó en el capítulo III para localizar las zonas contiguas al gen *fur*. Con el objetivo de determinar el fragmento de DNA del tamaño más adecuado,

conteniendo el sistema TonB y sus regiones limítrofes, se llevó a cabo un experimento de hibridación por Southern blot utilizando como sonda una parte del inserto del plásmido F-64 de 1,7 kb, escindido con los enzimas *XbaI-KpnI* (Figura IV.4).

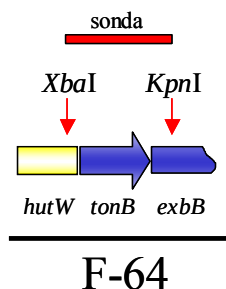


Figura IV.4-Esquema de la secuencia del clon F-64, representando la zona utilizada como sonda.

Para ello, el DNA genómico de la cepa DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida* se digirió con *HindIII*, *XbaI*, *ClaI*, *EcoRV*, *SacI* y *BglIII*, los fragmentos fueron separados en un gel de agarosa, y el resto del proceso de hibridación y revelado se llevó a cabo como ya se ha descrito en el capítulo III.

Una vez realizado el Southern blot se diseñó el mapa de restricción (Figura IV.5) y se seleccionaron los enzimas que flanqueaban el segmento de DNA más apropiado, que resultó ser un fragmento *BglIII* y *KpnI*.

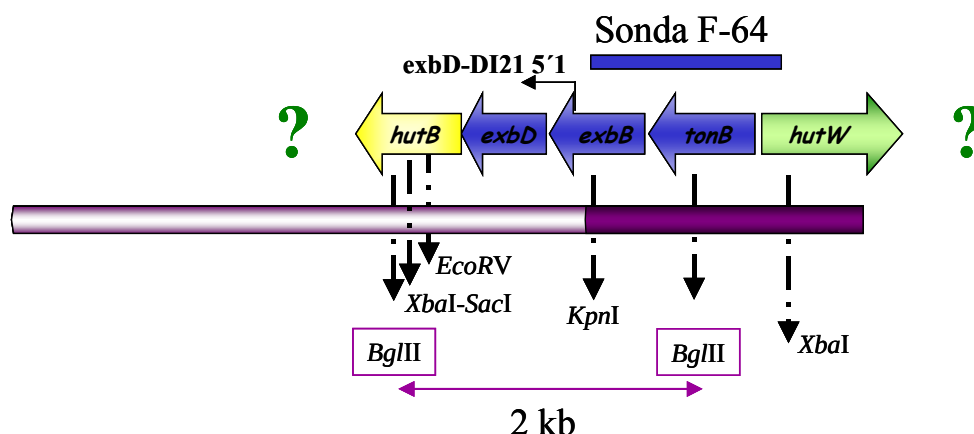


Figura IV.5.-Mapa de restricción del gen *tonB* y el DNA que lo rodea. Se muestran sólo los sitios relevantes para el *chromosome walking*.

El DNA de la cepa DI21 y el plásmido pWKS30 se cortaron con dichos enzimas, se ligaron, y la ligación se usó como molde en una reacción de PCR en la que como cebadores se utilizaron el M13-fw universal y el *exbD*-5'-DI21, diseñado a partir del fragmento de DNA clonado en el plásmido F-64. El producto que rindió la PCR se clonó en pGEM-T Easy generando el pCAR084.

Para seguir avanzando en la secuenciación del sistema por *chromosome walking*, era necesario obtener más información acerca de los sitios de restricción que flanqueaban el sistema. Así, se preparó una nueva membrana realizando esta vez digestiones dobles del DNA con los enzimas: *HindIII-EcoRI*, *HindIII-BamHI*, *HindIII-EcoRV*, *HindIII-KpnI*, *HindIII-PstI* y *HindIII-Sall*. Como sonda se utilizó el fragmento *XbaI-HindIII* escindido del pCAR084. Los resultados sirvieron para identificar una diana de restricción *HindIII* a 1,4 kb del sitio ya conocido *EcoRV* (Figura IV.6), por lo que tanto el DNA de la cepa DI21 como el pWKS30 se digirieron con estos enzimas, y se preparó entonces una ligación con ellos que se utilizó como molde para una PCR con el cebador *hutB* 5'1 y el M13-rv. Ésta rindió un fragmento de 1,4 kb que se clonó en pGEM-T Easy, generando el pCAR094.

Finalmente se llevó a cabo una nueva hibridación en la que se utilizó esta misma membrana, y como sonda el fragmento escindido con *EcoRI* del pCAR094. En este caso, se localizó una diana de restricción *XbaI* a 2,6 kb de la ya conocida por lo que el DNA de la cepa DI21 y de pWKS30 se digirieron con *XbaI* y se ligaron. Esta ligación se utilizó como molde en una PCR llevada a cabo con los cebadores *hutD* 5'1 y M13-fw, y rindió un producto de 1,3 kb, que se clonó en pGEM-T Easy generando el pCAR110.

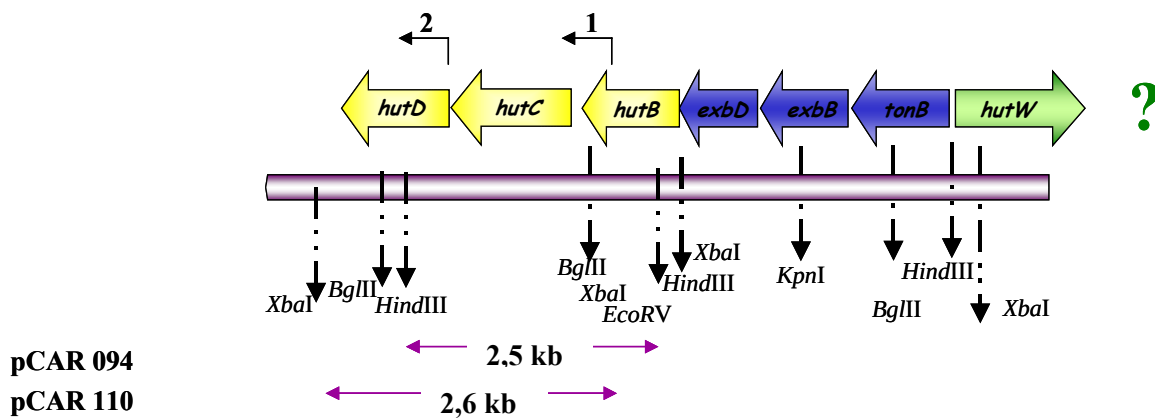


Figura IV.6.-Mapa de restricción de los genes *hutD*, *hutC*, *hutB*, *exbB*, *exbD*, *tonB* y *hutW*. Se muestran solo los sitios relevantes para el *chromosome walking*. 1: cebador *hutB* 5'1; 2: cebador *hutD* 5'1.

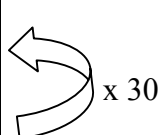
Las condiciones de la reacción empleadas en las tres PCR anteriores fueron las siguientes: un primer paso de desnaturalización de 3 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos que constaron de 1 min de desnaturalización a 95 °C, una temperatura de hibridación de 55,3 °C durante 1 min y 50 s de elongación a 72 °C. Transcurridos los 30 ciclos de amplificación, las cadenas se completaron durante 5 min a 72 °C. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1,2%.

Para secuenciar la totalidad de los fragmentos amplificados en ambos casos, se diseñaron los cebadores hutB 5'2, hutB 5'3, hutB 5'4 y hutD 5'2.

Clonación y secuenciación de las regiones adyacentes al gen *hutW*

Se diseñó un nuevo mapa de restricción en base a los resultados obtenidos al hibridar la membrana realizada en el apartado anterior con una sonda obtenida amplificando por PCR la zona del DNA de DI21 comprendida entre los cebadores phudams 3'1 y phudams 5'1 de 812 pb. Así, se digirió todo el DNA genómico de esta cepa, y el del plásmido pUC118 con el enzima *Hind*III. El DNA genómico digerido, se migró en un gel de agarosa al 1,2% (p/v), se recortó la zona comprendida entre las 2 y 3 kb, se extrajo utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) y se ligó al pUC118. Esta ligación se transformó en *E. coli* DH5 α y se sembró en una placa de LB con ampicilina (50 μ g mL⁻¹). Para comprobar de forma rápida qué colonia bacteriana poseía el plásmido pUC118 con el inserto buscado, es decir, aquel que contuviese un fragmento del gen *hutW* y los genes situados adyacentes a éste, se realizaron reacciones de PCR utilizando los cebadores phudams 3'1 y phudams 5'1, y añadiendo como DNA molde una pequeña cantidad de cada colonia bacteriana. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

Temperatura	Tiempo
95 °C	5 min
95 °C	1 min
58 °C	1 min
72 °C	50 s
72 °C	7 min



Para secuenciar la totalidad del fragmento clonado en el pUC118 se diseñaron los cebadores phuW 5'2, phuW 5'3, phuW 5'4, hutA 5'1, hutA 5'2, y hutZ-DI21 5'1.

4.2.1.2. Secuenciación de los genes del sistema de transporte de hemo de *P. damsela* subsp. *damsela*

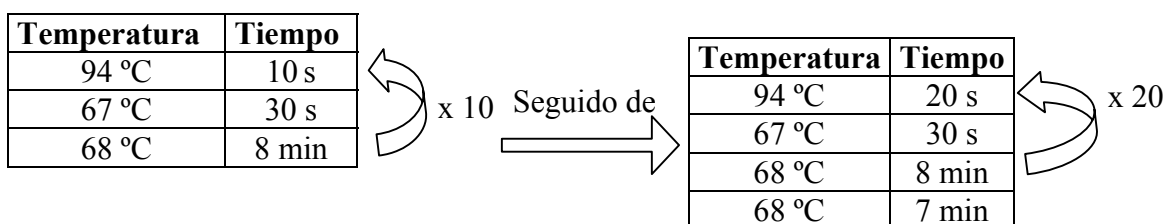
Para secuenciar los genes implicados en el transporte y la internalización de la hemina en el aislado clínico CDC 2227-81 de la subespecie *damsela*, y asumiendo la hipótesis del alto grado de homología genética entre ambas subespecies, se diseñaron dos cebadores delhutZ-DI215'1 y delhutD-DI21 3'1, uno a cada extremo del sistema descrito en la cepa DI21. Al diseñar estos cebadores, se les añadió en el extremo 5' la secuencia de la diana del enzima de restricción *EcoRI*.

La PCR se llevó a cabo utilizando la polimerasa *Extensor Hi-Fidelity PCR enzyme Mix* (ABgene), diseñada para amplificar productos de PCR de gran extensión de forma más fidedigna que las Taq polimerasas convencionales.

La reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 50 μL , con el tampón de PCR nº 1 suministrado con la Taq polimerasa, 200 μM de cada desoxinucleósido 5' trifosfato (dNTP) (Bioline), 100 pmol de cada oligonucleótido (Sigma) y 2,5 U de enzima *Taq* polimerasa. Los volúmenes de cada reacción fueron los siguientes:

Componente	Cantidad
H ₂ O destilada estéril	39,5 μL
10X tampón de PCR nº 1	5 μL
dNTP	2 μL
Cebador 1 (100 pmol μL^{-1})	1 μL
Cebador 2 (100 pmol μL^{-1})	1 μL
DNA molde (10 ng μL^{-1})	1 μL
Taq polimerasa	1 μL

El programa de PCR utilizado para la amplificación fue diseñado según lo recomendado por el fabricante:



El producto de PCR obtenido se clonó en el vector pGEM-T Easy y se secuenció en su totalidad utilizando los cebadores op-cdc-5'1 al op-cdc-5'7 y op-cdc-3'1 diseñados sobre la secuencia nucleotídica del sistema ya secuenciado de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

4.2.1.3. Presencia de los genes del sistema de captación de grupos hemo en distintas cepas de *P. damsela*

Se llevó a cabo un análisis por PCR, utilizando como DNA molde el de varias cepas de *P. damsela* (Tablas II.1 y II.2). Como cebadores se utilizaron dos parejas (Figura IV.6). La primera formada por los oligonucleótidos OP-CDC-5'1-phuwDI215'3, que flanquean los genes *hutZ*, *hutX* y *hutW*, y la segunda por *hutD* 3'1 y OP-CDC-5'5, que flanquean *hutB*, *hutC* y *hutD*.

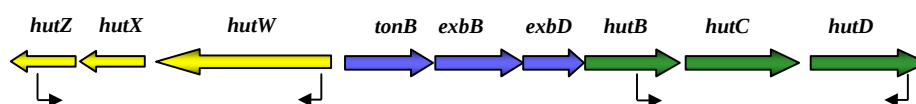


Figura IV.6.-Situación de los cebadores utilizados para detectar la presencia/ausencia de los genes del sistema de transporte de hemo en *P. damsela*.

4.2.2. Análisis funcional del sistema de transporte de hemo de *P. damsela*

4.2.2.1. Construcción de un sistema híbrido de transporte de hemo en la cepa *E. coli* 101 ESD $\Delta(entC-entA)$.

Para comprobar qué genes de *P. damsela* subsp. *piscicida* eran esenciales para la utilización de hemina y hemoglobina como fuentes de hierro, se utilizó la cepa mutante de *E. coli* 101 ESD $\Delta(entC-entA)$ derivada de la HB101, deficiente en la biosíntesis del sideróforo enterobactina.

En primer lugar se construyó un plásmido que contuviese clonados los nueve genes presuntamente implicados en la captación de hemina de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Para ello, se amplificó por PCR todo el sistema, utilizando como molde el DNA de la cepa DI21, los cebadores del *hutZ*-DI215'1 y del *hutD*-DI21 3'1 y las mismas condiciones que en el apartado 4.2.1.2 del presente capítulo. El producto de

amplificación se limpió y eluyó en 50 μL de tampón TE, y con él se preparó una reacción de digestión mezclando 44 μL de la banda extraída, 1 μL de enzima (10 U) y 5 μL del tampón 10X correspondiente. Las reacciones se incubaron a 37 °C toda la noche, después se migraron en un gel de agarosa al 1,2% (p/v), se recortaron de éste, y se extrajeron. Del mismo modo, se preparó una digestión con 5 μL del plásmido pWKS30 extraído por lisis alcalina con 1 μL *EcoRI* añadiendo además 2 μL del tampón de la enzima, y completando con agua desionizada estéril hasta un volumen de 20 μL . Seguidamente, se preparó una reacción de ligación con 3 μL de pWKS30 digerido con *EcoRI*, 14 μL de la banda de PCR digerida, 2 μL del tampón de la ligasa y 1 μL (5 U) de enzima. Se incubó 1 h a temperatura ambiente, se transformó en *E. coli* DH5 α , y la transformación se sembró en una placa de LB con ampicilina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 10 μL de X-Gal 50 mg mL^{-1} y 10 μL de IPTG 0,1 M. La placa se incubó de 12-18 h a 37 °C y las colonias obtenidas se analizaron por restricción hasta que se localizó un clon positivo (pSJR24).

Para construir el sistema híbrido, se transformó el pSJR24 en las células competentes de *E. coli* 101 ESD que previamente se habían preparado. De las colonias resultantes se eligió una, de la cual se prepararon células competentes, que se transformaron con el pCAR121 (Mouriño *et al.*, 2004), constituido por un fragmento de DNA con el gen *huvA* de *Vibrio anguillarum* clonado en el plásmido pACYC177 (Rose, 1988). La transformación se sembró en placas de LB con ampicilina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y kanamicina (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Las colonias resultantes se analizaron para comprobar la presencia de ambos plásmidos, hasta que se localizó un clon positivo.

Análisis de la construcción: Cultivo en sobrecapa de agarosa

En primer lugar, se determinó la CMI de 2,2'-dipyridyl para la cepa *E. coli* 101 ESD. Se prepararon placas de medio CM9 con 150 μM de 2,2'-dipyridyl, para lo cual se esterilizó una disolución de agarosa al 0,8%, añadiendo posteriormente el resto de los componentes. Se preparó además el mismo medio sin 2,2'-dipyridyl, pero con agarosa a una concentración final de 0,4% ("agar blando"), y se conservó líquido en un horno a 60 °C.

Se prepararon cultivos de las cepas que se iban a analizar en medio LB complementado en cada caso con el antibiótico adecuado, que se incubaron a 37 °C con agitación durante 12 h. Se hicieron tres alícuotas de 3 mL del medio CM9 al 0,4% de

agarosa cada una, y se dejaron atemperar unos minutos, pasados los cuales se inocularon con 100 μ L de cada uno de los tres cultivos preparados anteriormente. Las suspensiones resultantes se vertieron sobre las placas de CM9 con 2,2'-dipyridyl y se dejaron solidificar. Una vez solidificado el medio, sobre cada una de las tres placas se colocaron discos de papel estériles de 6 mm (Albet) empapados con 20 μ L de hemina 5 mM, ó 20 μ L de hemoglobina 1 mM, ó 20 μ L de FeSO_4 como control. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C.

4.2.2.2. Construcción y análisis de un mutante del transportador ABC ligado al sistema de transporte de hemo en *P. damsela* subsp. *piscicida*

Con el objetivo de valorar el efecto de una mutación en el sistema de transporte ABC sobre la captación de hemina en *P. damsela* subsp. *piscicida*, se procedió inicialmente a la construcción por delección en fase de un mutante de este sistema en la cepa DI21.

A. Amplificación por PCR y digestión de dos fragmentos del gen *hutB*

Se diseñaron dos pares de cebadores para amplificar dos fragmentos que contuvieran ambos extremos del gen *hutB*, y unos cuantos nucleótidos más de cada gen contiguo hasta completar las 1000 pb. Los cebadores se diseñaron por una parte, con sitios de restricción en sus extremos, y por otra, de modo que el fragmento del gen que quedase comprendido entre ambas zonas (la zona que se pretende deleccionar), contuviese un número de nucleótidos múltiplo de tres, lo cual es necesario para posteriormente crear una delección en fase. De esta forma, no se produciría en la construcción final una ruptura de la pauta de lectura del gen *hutB*, que podría conllevar efectos polares en la transcripción de los genes localizados a continuación.

Los cebadores utilizados para amplificar el primer fragmento fueron delhutB-1 y delhutB-2, con las dianas de restricción *NotI* y *EcoRI*, y para amplificar el segundo fragmento se diseñaron delhutB-3 y delhutB-4, con las dianas para *EcoRI* y *SalI* respectivamente (Figura IV.7).

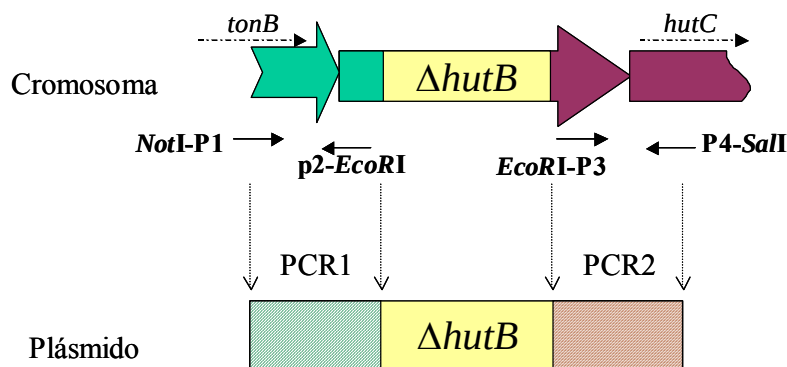


Figura IV.7.-Esquema de la localización y orientación de los cebadores utilizados para la construcción del mutante del ABC transporter. $\Delta hutB$ es la zona que se pretende deleccionar.

La PCR se llevó a cabo utilizando la *BIOTAQ DNA Polymerase* (Bioline) en volúmenes de 100 μL , utilizando las mismas concentraciones descritas en el protocolo general de PCR. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: un primer paso de desnaturalización de 3 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos que constaron de 1 min de desnaturalización a 95 °C, una temperatura de hibridación de 70 °C durante 1 min y 1 min y 15 s de elongación a 72 °C. Transcurridos los 30 ciclos de amplificación, las cadenas se completaron durante 5 min a 72 °C. Los productos se limpiaron con el *PCR purification kit* (Qiagen), y se eluyeron en un volumen final de 50 μL . Entonces se prepararon las digestiones de estos fragmentos, con los enzimas *NotI-EcoRI* para el primero, y *SalI-EcoRI* para el segundo, añadiendo los siguientes componentes: 43 μL de la banda extraída, 1 μL de cada enzima (10 U μL^{-1}) y 5 μL del tampón 10X correspondiente. Se denominó banda 1-2 a la obtenida con los cebadores del-*hutB*-1 y del-*hutB*-2, y banda 3-4 a la obtenida con los cebadores del-*hutB*-3 y del-*hutB*-4.

B. Construcción del vector con el gen deleccionado

El vector utilizado en este experimento fue el pNid-kan (Figura IV.8), que es un plásmido derivado del pCVD442 (Donnenberg y Kaper, 1991), al que se le insertó un cassette de resistencia al antibiótico kanamicina, escindido del *Kanamycin resistance Genblock* (Pharmacia), en los sitios *PstI-PstI*, y el sitio de multiclonaje (*polylinker*) del plásmido pWKS30.

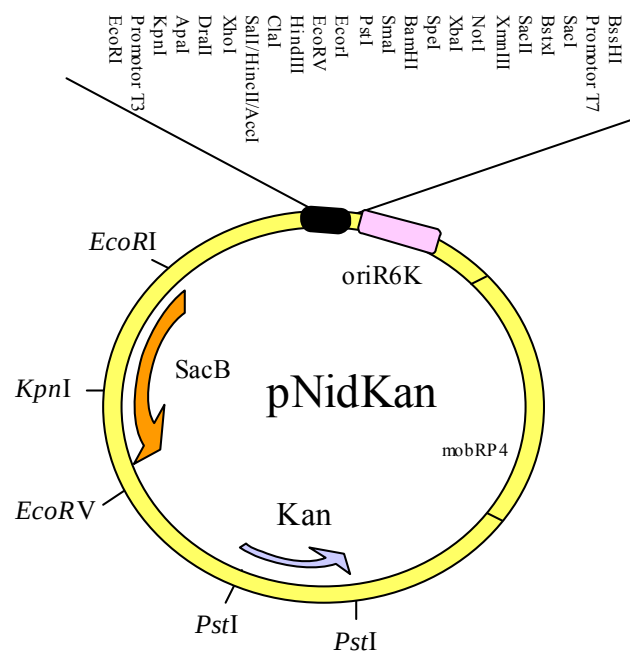


Figura IV.8.-Esquema del plásmido pNidKan.

Este plásmido posee la región *mob*, que hace que se pueda transferir de forma eficiente por conjugación desde cepas que posean el locus *tra*. También contiene el gen *sacB*, que confiere sensibilidad a la sacarosa a las bacterias gram negativas que lo posean, y un origen de replicación del plásmido R6K dependiente del gen *pir* que codifica la proteína π , de modo que únicamente podrá perpetuarse en bacterias que posean este gen (por ejemplo, *E. coli* S17-1 λ pir).

El pNid-kan digerido con *NotI* y *EcoRI* se migró en un gel de agarosa, se recortó la banda correspondiente al plásmido y se extrajo. Se preparó entonces una reacción de ligación utilizando la ligasa *T4 DNA Ligase* (Fermentas), mezclando en un tubo de microcentrífuga 12 μ L de la banda 1-2 digerida y limpia, 1 μ L de ligasa, 2 μ L del tampón de la ligasa y 5 μ L del pNid-Kan y añadiendo agua hasta un volumen final de 20 μ L. Se incubó a 15 $^{\circ}$ C durante 12 h, y el producto obtenido se utilizó para transformar células competentes S17-1 λ pir de *E. coli* que se sembraron en placas de LB y kanamicina (25 μ g mL⁻¹) y se incubó a 37 $^{\circ}$ C durante 12-18 h. Las colonias resultantes se analizaron por PCR, utilizando para ello los cebadores con los que se había amplificado esta primera banda del hutB-1 y del hutB-2, y el mismo programa de PCR. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa y una vez se localizó un clon positivo, se le extrajo el plásmido, se digirió con los enzimas *SalI* y *EcoRI*, y se

procedió a ligar en éste la banda 3-4 siguiendo los mismos pasos que para ligar la primera.

La reacción de ligación se transformó de nuevo en células competentes *E. coli* S17-1 λ pir, y de nuevo se analizaron las colonias resultantes por PCR, usando en este caso los cebadores de los extremos delhutB-1 y delhutB-4, para comprobar la presencia de ambos insertos ligados. En este caso se empleó el programa de PCR usado en el apartado anterior, pero aumentando a 2 min el tiempo de elongación de cada ciclo. Los productos se analizaron en un gel de agarosa, y se seleccionó un clon que portase ambos fragmentos.

C. Obtención de un mutante espontáneo resistente a la rifampicina de *P. damsela* subsp. *piscicida*

El siguiente paso del proceso de construcción del mutante, consistió en la siembra conjunta de la cepa S17-1 λ pir de *E. coli* (con la construcción realizada en el pNid-kan en el apartado anterior) y la cepa DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida*, por lo que se hacía necesario contar con algún fenotipo específico, que nos permitiera seleccionar a esta última. Así se procedió a la obtención de un mutante espontáneo de resistencia al antibiótico rifampicina de la cepa DI21.

Para el aislamiento del mutante se utilizó la técnica de gradiente en placa utilizando un gradiente de rifampicina de 0 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La cepa DI21 se cultivó 18 h a 25 °C en 5 mL de medio TSC-1 con agitación hasta que se alcanzó la fase logarítmica, se sembraron alícuotas de 0,1 mL en las placas con gradiente de rifampicina, y se incubaron durante 36 h a 25 °C. Las colonias obtenidas se sembraron en otra de las placas con gradiente para estimar el grado de resistencia al antibiótico, y se incubaron de nuevo a 25 °C durante 36 h. Las colonias de *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 resistentes a rifampicina, se conservaron como ya se indicó anteriormente.

D. Conjugación de *P. damsela* subsp. *piscicida*

El plásmido suicida con la construcción del mutante *hutB* (pSJR19), se transfirió a *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 por conjugación, mediante el siguiente protocolo:

Se prepararon dos cultivos de 5 mL cada uno, el primero de ellos de medio LB con kanamicina (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), donde se inoculó una colonia aislada que contenía el pSJR19, y el segundo en medio BHI (Pronadisa) suplementado con 1% de NaCl (BHI-

1) de la cepa DI21 resistente a la kanamicina que se obtuvo en el apartado anterior. Se crecieron toda la noche a 28 °C con agitación, se diluyeron 1:100 en medio de cultivo fresco, y se volvieron a incubar hasta que se alcanzó una DO de 0,5 a 600 nm. Entonces se mezclaron en un tubo de ensayo 100 µL del cultivo de *E. coli*, 300 µL del cultivo de la cepa DI21 resistente a la rifampicina, y 3 mL de solución salina, y se pasaron a través de una jeringuilla acoplada a un filtro de 0,2 µm (Milipore). El filtro se colocó sobre una placa de agar sangre, y se incubó toda la noche a 28 °C, retirándose a continuación a un tubo con 5 mL de medio BHI-1 y agitándose vigorosamente hasta que se desprendieron bien todas las células adheridas. De esta suspensión se tomaron alícuotas de 10, 50, 100, 250, 500 y 1.000 µL, se sembraron en placas de BHIA-1 con kanamicina (25 µg mL⁻¹) y rifampicina (50 µg mL⁻¹), y se incubaron durante 48 h a 28 °C. Las colonias resultantes se reaislaron en placas nuevas, y se analizaron para comprobar si se había producido en ellas el evento de recombinación.

E. Detección de clones mutantes de *P. damsela* subsp. *piscicida*

Para analizar si había tenido lugar el evento de recombinación en la cepa DI21, se extrajo el DNA genómico de uno de los mutantes obtenidos (cepa CS27), y se utilizó como molde para hacer una PCR con los cebadores delhutB-1 y delhutB-4. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: un primer paso de desnaturalización de 3 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos que constaron de 1 min de desnaturalización a 95 °C, una temperatura de hibridación de 70 °C durante 1 min y 2 min y de elongación a 72 °C.

F. Análisis funcional del mutante

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 2,2'-dipyridyl

Se llevó a cabo la determinación de la CMI del quelante de hierro 2,2'-dipyridyl (Sigma) a la cual la cepa DI21 era capaz de crecer con hemina en el medio como única fuente de hierro. Para ello se prepararon ocho tubos de ensayo con 3 mL de medio mínimo CM9, y concentraciones crecientes de 0, 50, 75, 100, 150, 200, 250, y 300 µM de 2,2'-dipyridyl con hemina a una concentración final de 10 µM. Se preparó una solución stock de hemina, a partir de la hemina comercial en polvo (Sigma). Para ello, ésta se disolvió en una solución de NaOH 10 mM hasta una concentración final de 5

mM de hemina. Posteriormente se esterilizó filtrándola a través de un filtro de 0,2 µm, y se conservó a -20 °C.

Seguidamente se preparó un inóculo de la cepa DI21 en 5 mL de medio TSC-1 que se dejó creciendo con agitación toda la noche a 25 °C. A la mañana siguiente, se inocularon 30 µL de este cultivo en cada uno de los tubos, y se incubaron a 25 °C con agitación durante 24 h. A continuación se midió la densidad óptica (DO) de cada tubo a 600 nm.

Análisis de la capacidad de captación de hemina del mutante CS27

Se prepararon dos matraces con 5 mL de medio CM9 con 75 µM de 2,2'-dipyridyl y 10 µM de hemina, y se inocularon 50 µL a partir de dos cultivos preparados como en el apartado anterior, uno de la cepa DI21 y el otro de la CS27 (DI21 mutante), previamente ajustados a la misma DO a 600 nm, para que en ambos hubiera aproximadamente el mismo número de células. Los cultivos se incubaron a 25 °C con agitación y su DO se midió durante 12 h.

4.2.3. Búsqueda del receptor de membrana externa responsable de la captación de grupos hemo del medio extracelular

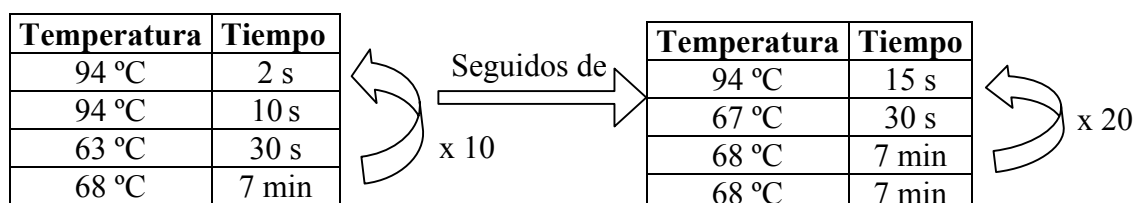
4.2.3.1. Estrategia seguida en la identificación

A. Secuenciación de las zonas adyacentes a *hutZ* por PCR inversa

Sobre la base de lo observado en *V. anguillarum* (Mouriño *et al.*, 2004) o *Plesiomonas shigelloides* (Henderson *et al.*, 2001), se pensó que el gen que codifica el receptor responsable de la captación de hemo podría estar localizado a continuación del gen *hutZ* en el genoma de *P. damsela*. Para tratar de amplificar y secuenciar la zona contigua a este gen, se procedió a realizar una PCR inversa según el protocolo que se describe a continuación:

Se digirieron 14 µL de DNA genómico de la cepa DI21 con 2 U de *XbaI* en un volumen final de 70 µL. La digestión se incubó toda la noche a 37 °C, se limpió, y se eluyó en un volumen final de 50 µL, de los cuales se tomaron 17 µL para preparar una

reacción de ligación en un volumen final de 50 μ L con 2 U de enzima ligasa, que se incubó toda la noche a 15 °C. Tras inactivar la ligasa 65 °C durante 10 min, se utilizaron 3 μ L de la ligación como molde para una amplificación por PCR usando para ello el *Expand Long Template PCR System* (Roche) y el siguiente programa.



Los componentes de la reacción de PCR fueron 3 μ L de DNA molde, 2 μ L de dNTPs, 5 μ L de tampón *expand long template buffer* nº 1, 1 μ L de cada cebador IPphu 3'1 y hutZ DI21 5'1, 0,75 μ L de *Expand long template enzyme mix* y agua desionizada estéril hasta completar un volumen de 50 μ L.

El producto de PCR se analizó en un gel, se extrajo, se clonó en el vector pGEM-T Easy y se secuenció.

B. Amplificación con cebadores degenerados

En el segundo intento de localización del receptor responsable de la captación de hemina del medio extracelular, se diseñaron los cebadores degenerados HUP-DEG 5A, HUP-DEG 3A, HUP-DEG 5C, HUP-DEG 5D y HUP-DEG 3. Éstos se diseñaron seleccionando las zonas más conservadas de los receptores de hemina conocidos, evidenciadas mediante un alineamiento comparativo de sus secuencias de aminoácidos en diversas especies del género *Vibrio*. Se realizaron PCRs utilizando un gradiente de temperaturas de hibridación que fue de los 40 °C a los 60 °C, tiempos de elongación de 2 min, y como DNA molde el de la cepa DI21.

C. Complementación de la cepa 101 ESD de *E. coli*

Se transformó en primer lugar la cepa de *E. coli* 101 ESD con el plásmido pSJR24 (conteniendo los genes *hutZXW*, *tonBexbBDhutBCD*) y de la cepa resultante se prepararon células competentes. Se procedió entonces a construir una librería génica de las cepas DI21 y CDC 2227-81 de *P. damsela* subsp. *piscicida* y *damsela* respectivamente.

Para ello, se realizó una digestión parcial del DNA de ambas cepas con el enzima de restricción *Sau3AI* mezclando 89 μ L de DNA genómico, 10 μ L del tampón del enzima 10X y 1 μ L (1 U) de *Sau3AI*. Se realizó una incubación en un baño a 37 °C durante 10 min y se visualizó en un gel una alícuota de la digestión para comprobar en qué rango de tamaños moleculares se hallaba digerido el DNA. El resto, se limpió y se eluyó en 50 μ L finales. Entonces se preparó una reacción de ligación con 14 μ L de este DNA digerido, 2 μ L del tampón de la ligasa, 1 μ L de ligasa y 3 μ L del plásmido pACYC177 digerido con *Bam*HI. La ligación se incubó durante 12 h a 15 °C, se transformó en las células competentes anteriormente preparadas, se sembró en placas de CM9 con 150 μ M de 2,2'-dipyridyl, 10 μ M de hemina, ampicilina (50 mg mL⁻¹) y kanamicina (25 mg mL⁻¹) y se incubó durante 48 h a 37 °C. Las colonias resultantes, que serían aquellas capaces de utilizar la hemina como fuente de hierro, serían candidatos a contener, clonado en el pACYC177 el gen para el receptor de hemina de *P. damsela*.

4.2.3.2. Amplificación del gen *hutA* en *P. damsela* subsp. *piscicida*: Distribución en distintos aislados de *P. damsela*

Para amplificar y secuenciar el receptor de *P. damsela* subsp. *piscicida*, una vez conocida la secuencia en la subespecie *damsela*, se diseñaron dos cebadores en los extremos del gen *hutA* de ésta, que se denominaron delhutADI21 5'1 y delhutADI21 3'1. Se prepararon diversas reacciones de PCR usando 62,5 °C de temperatura de hibridación y 2 min de elongación, y como DNA molde, el de la cepa DI21. Ante la imposibilidad de amplificar el gen en esta cepa, se repitieron estas reacciones con las siguientes cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida*: B51, ATCC 17911, ATCC 29690, 666.1, 1083.1, IT-2, 069A, ATIT-2, MP7801, EPOY 8803-II, MZS8001, PC 554.2, PC 435.1, Lgr52/02, PP5, TW 515/02, EW 194/97, Nu no, PC 610.1 y 91.197. A

continuación se realizaron también con las cepas RG-205.2, RG-91, RG-153, RG-214, RM 71, CDC2227-81 y LD 07 de *P. damsela* subsp. *damsela*.

El producto de amplificación resultante de la PCR, en la que se utilizó como molde la cepa MP7801, se clonó en el vector pGEM-T Easy y se secuenció.

Dado que en determinadas cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* no fue posible amplificar el gen con estos cebadores, se repitieron las reacciones de PCR con una pareja diferente que amplificaba una zona del inicio del gen: IP-hutA 3'1 y hupADI215'2.

Para intentar amplificar todo el gen *hutA* en la cepa DI21, se empleó la estrategia de utilizar un cebador basado en la zona conocida, el delhutADI21 5'1, y un cebador universal M13. Para ello, se digirió el genoma de la cepa DI21 con *Cla*I, se ligó al vector pT7-7 (Figura IV.9) y esta ligación se usó como molde de una reacción de PCR con una temperatura de 59 °C de hibridación y 3 min de elongación usando el cebador universal pT7-7 uni y el delhutADI21 5'1. El fragmento de PCR resultante se clonó en pGEM-T Easy y se secuenció.

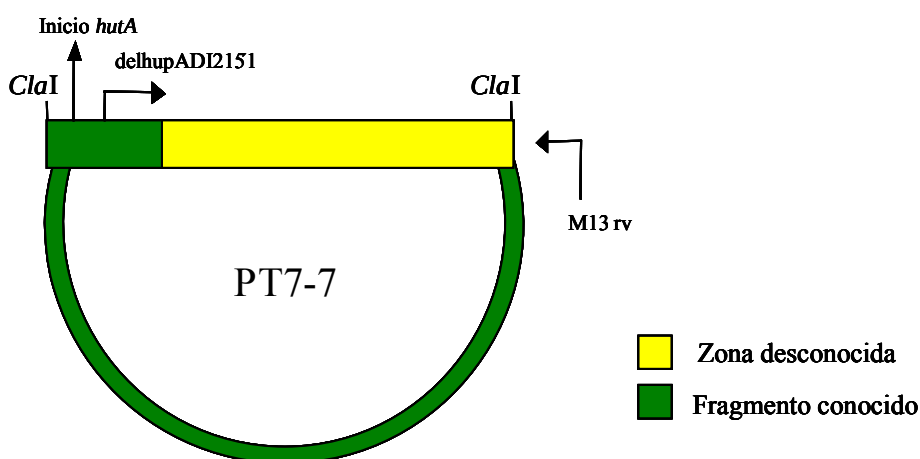
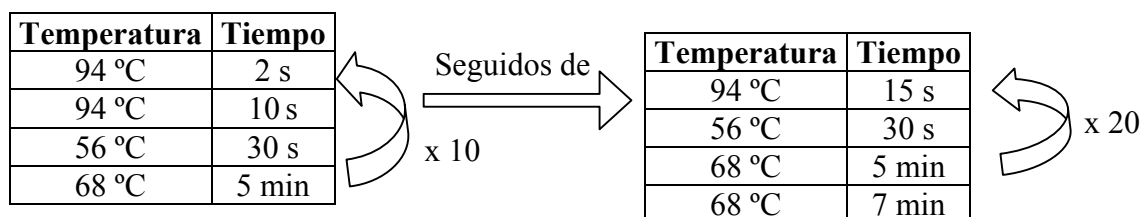


Figura IV.9.-Construcción realizada para clonar y secuenciar el gen *hutA* de la cepa DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida* utilizando un cebador interno al gen *hutA* y otro del plásmido pT7-7. El cebador delhutADI215'1 se diseñó en la zona conocida del gen *hutA*.

4.2.3.3. Análisis funcional del sistema de internalización de grupos hemo de *P. damsela*

Se realizaron dos tipos de construcciones. Para la primera, se amplificó por PCR, utilizando el *High fidelity PCR system* (Roche), un fragmento de PCR de 5,6 kb con los cebadores IP-phu 3'1 y del hutD DI21 3'1, que incluía los genes *tonB*, *exbB*, *exbD*, *hutB*, *hutC* y *hutD* utilizando el programa siguiente:



El producto de amplificación resultante se clonó en el plásmido pCR 2.1 TOPO (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En segundo lugar, se escindió del pSJR24 un fragmento de 6 kb con los enzimas *SacI* y *EcoRI*, que contenía los genes *hutZ*, *hutX*, *hutW*, *tonB*, *exbB* y *exbD*, y se clonó en el plásmido pWKS30 cortado con los mismos enzimas. Se procedió entonces a transformar la cepa *E. coli* 101 ESD con distintas combinaciones de las construcciones realizadas hasta el momento.

Se transformaron también diversas combinaciones de estos plásmidos en la cepa mutante de *E. coli* EB53 (*aroB hemA*) (Eberspächery Braun, 1980). La EB53 y sus derivados, se crecieron siempre de forma inicial a 37 °C en medio LB suplementado con ácido δ -aminolevulínico (ALA) (Sigma) a una concentración final de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y los antibióticos correspondientes.

Todas estas cepas transformadas con diversas combinaciones de genes, se ensayaron en sobrecapa de placas de medio mínimo CM9 con 150 μM de 2,2'-dipyridyl y los antibióticos correspondientes. En la sobrecapa se colocaron discos estériles con hemina (100 μM , 1 mM y 5 mM) o hemoglobina (1 μM) tal y como se describió anteriormente. Las cepas derivadas de la EB53, se analizaron también en cultivo líquido de medio LB con y sin hemina a concentraciones crecientes de 2,2'-dipyridyl que fueron de 0 a 400 μM . Como controles, se utilizaron en cada caso las cepas de *E. coli* 101 ESD y EB53 sin transformar con ningún plásmido.

4.2.4. Análisis transcripcional del sistema de captación de grupos hemo

4.2.4.1. Procedimiento

A. Extracción del RNA de *P. damsela*

Se preparó en primer lugar un inóculo de la cepa en 5 mL de medio TSC-1, y se dejó creciendo toda la noche a 25 °C. Al día siguiente, se utilizaron 300 µL de este cultivo para inocular (1:100) 30 mL de medio CM9, que se creció a 25 °C con agitación durante 16 h, transcurridas las cuales 20 mL del cultivo, repartidos en dos tubos, se centrifugaron a 4 °C durante 10 min en una centrífuga Avanty J-25 (Beckman) a 4.000 rpm para precipitar las células. El precipitado se homogenizó con 500 µL de *RNAwiz RNA Isolation Agent* (Ambion), y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para disociar las nucleoproteínas de los ácidos nucleicos. Se añadieron entonces 0,2 volúmenes de cloroformo, se agitó la muestra, se incubó 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó durante 15 min a 10.000 x g a 4 °C y se transfirió la fase superior semi-acuosa a un tubo de centrifuga nuevo. A continuación se procedió a precipitar el RNA, para lo cual se añadieron 0,5 volúmenes de agua libre de RNasas (Promega), 1 volumen de isopropanol, y se centrifugó para recoger el RNA, que se lavó con 1 volumen de etanol al 75% (v/v) y se centrifugó durante 5 min a 10.000 x g a 4 °C. El precipitado se dejó secar al aire, se resuspendió en 100 µL de agua libre de RNasas y el RNA extraído se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm utilizando cubetas de cuarzo.

B. Tratamiento con DNasa

Se preparó la reacción a un volumen final de 10 µL, añadiendo 1 µL de RNA, 5 µL de DNasa RQ1 (Promega), 1 µL del tampón de la DNasa y 3 µL de agua libre de RNasas. Se incubó durante 30 min a 37 °C, se añadió 1 µL de solución de parada y se incubó durante 10 min a 65 °C para inactivar la DNasa.

C. Reversotranscripción y PCR (RT-PCR): Obtención del cDNA

Las reacciones de RT-PCR se realizaron utilizando el enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Cada reacción se preparó con 2 μL del RNA tratado con DNasa, 1 μL de dNTPs, 1 μL del cebador (2 pmol μL^{-1}) y se llevó a 12 μL finales con agua desionizada estéril. Se incubó durante 5 min a 65 °C, y se pasó rápidamente a hielo, mientras se le añadieron 4 μL de *First-Strand Buffer* y 2 μL de DTT 0,1 M, ambos suministrados con el kit de Invitrogen. La mezcla se incubó a 37 °C 2 min, y se añadió 1 μL (200 U) de la reversotranscriptasa M-MLV RT. A continuación se incubó durante 50 min a 37 °C, y se inactivó la reacción durante 15 min a 70 °C.

D. Preparación de las PCRs

Cada reacción de PCR se preparó mezclando los siguientes componentes: 2 μL de cDNA, 2 μL de dNTPs, 1 μL de cada cebador, 1,8 μL de MgCl_2 (se tuvo en cuenta el MgCl_2 que se fue sumando en los pasos previos), 5 μL del tampón de PCR, 1 μL de la Taq polimerasa y se completó con agua desionizada estéril hasta un volumen de 50 μL .

4.2.4.2. Análisis de la organización transcripcional de los genes del sistema de captación de grupos hemo

La organización transcripcional de los genes *tonBexbBexbDhutBCD* se ensayó del modo descrito a continuación: en primer lugar se realizó una reacción RT-PCR con un cebador localizado en el extremo 3' del gen *hutD* (*hutD* 3'1). A continuación se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando este cDNA como molde, y cebadores que amplificaban los genes *tonB* (*phuseqA-deltonB2*), *exbB* (*prom-exbDXba-5'/exbDepxpr3'*) y *hutB* (*hutB5'1-hutB5'4*).

La organización transcripcional de los genes *hutWXZ* se analizó llevando a cabo primero una RT-PCR con un cebador del extremo 3' del gen *hutZ* (*hutA* DI21-5'2). Seguidamente se llevó a cabo una PCR con los cebadores *phudams3'-delhutX.1*.

4.2.4.3. Estudio transcripcional del mutante *hutCD*

Se extrajo el RNA de la cepa mutante para el sistema de transporte ABC, y usándolo como molde se realizaron tres RT-PCR con tres cebadores situados en distintos puntos del sistema: RT1, RT2 y RT3 (Figura IV.10).

Se utilizaron como molde de la reacción los cDNAs RT1, RT2 y RT3, y se llevaron a cabo reacciones de PCR con los cebadores lacZ*hutB*5'1 y *exbD*-*expr*-3' utilizando las condiciones de PCR siguientes: un primer paso de desnaturalización de 3 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos que constaron de 1 min de desnaturalización a 95 °C, una temperatura de hibridación de 60 °C durante 1 min, y 30 s de elongación a 72 °C. Transcurridos los 30 ciclos de amplificación, las cadenas se completaron durante 5 min a 72 °C. Como control positivo se utilizó como molde el DNA genómico de la cepa DI21 y como control negativo el RNA tratado con DNasa.

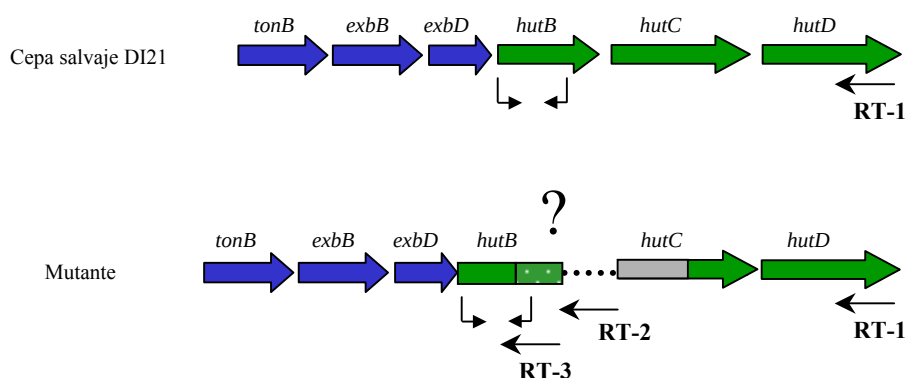


Figura IV.10.-Análisis transcripcional de la cepa mutante CS27. Las RT-PCRs se llevaron a cabo con los cebadores *hutD*3'1 (RT-1), *hutB*5'4 (RT-2) y *ExbD*-*expr*-3' (RT-3). Las flechas L y J señalan la zona de los cebadores utilizados en la PCR usando como molde los tres cDNAs.

4.2.4.4. Análisis de la regulación mediada por hierro de los promotores de *hutA*, *hutW* y *tonB*

A. RT-PCR

La cepa de *P. damsela* subsp. *piscicida* elegida para este experimento fue la MP7801. Se prepararon cuatro tipos de condiciones de cultivo, utilizando siempre como medio base el TSC-1. Al medio I, se añadió FeSO_4 a una concentración final de 10 μM , el II consistió en TSC-1, y en los III y IV se añadió 2,2'-dipyridyl a concentraciones de

100 y 300 μM respectivamente. El RNA se extrajo como ya se describió, y la RT-PCR se llevó a cabo utilizando como molde cada uno de los cuatro RNAs con los cebadores: delhutA3'1 (RT-I), OPCDC5'1 (RT-II) y hutB5'4 (RT-III) (Figura IV.11).

A continuación se llevaron a cabo distintas reacciones de PCR utilizando como molde el cDNA obtenido en cada caso. Los cebadores utilizados fueron: PCR-1: IphutA2-IphutA3; PCR-2: hutX 3'1-hutX 5'1 y PCR-3: phuseqA-deltonB2 5'1. Como control se realizó la RT-PCR con el cebador universal PH del extremo 3' del transcrito 16S y la PCR utilizando los cebadores específicos para el gen 16S de *P. damsela*, car1 y car2 (Osorio *et al.*, 1999).

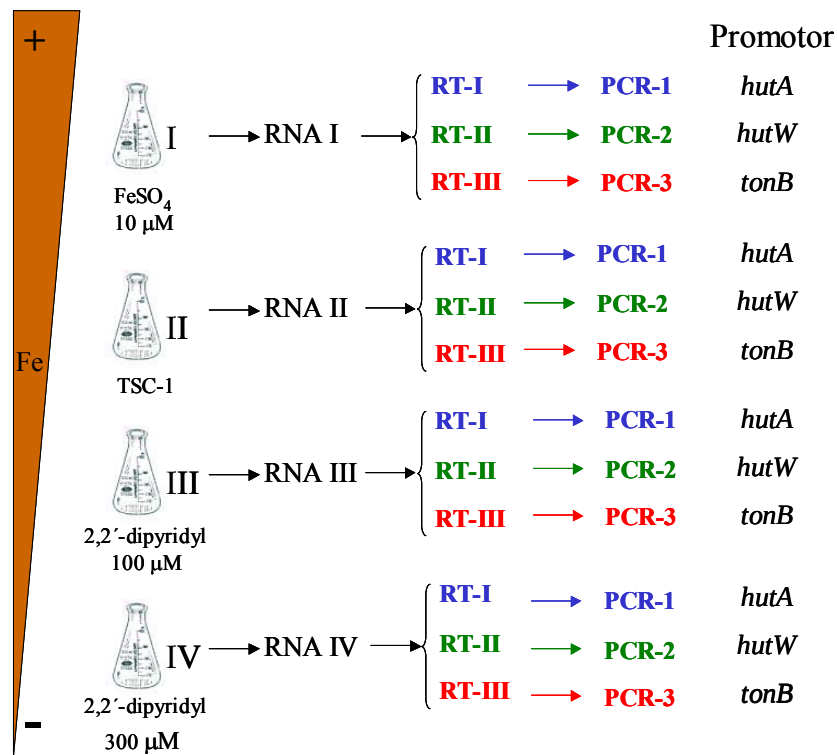


Figura IV.11.-Análisis de la regulación mediada por hierro de los promotores de *hutA*, *hutW* y *tonB* de *P. damsela*.

B. Ensayo FURTA

Se transformó el plásmido conteniendo el fragmento de DNA que se quería analizar en células competentes de la cepa H1717. Las células resultantes se sembraron en placas de agar MacConkey suplementados con 40 μM de FeSO_4 . Véase capítulo III sección 3.2.8.

C. Fusiones *LacZ*

El método seguido se basó en el descrito por Miller (Miller, 1992). Se construyó una fusión génica entre el promotor del gen *hutA* de *P. damsela* subsp. *piscicida* y la región codificante del gen *lacZ* clonado en el plásmido pHRP309 (Parales y Harwood, 1993). Para ello se diseñaron los cebadores lacZhutA5'1 y lacZhutA3'1 con prolongaciones en sus extremos que llevaban las dianas de restricción para los enzimas *Bam*HI y *Sal*I, para amplificar a partir del DNA cromosómico de la cepa DI21, un fragmento de 133 pb que contuviera el promotor del gen *hutA*. El producto de PCR se limpió y digirió con *Sal*I y *Bam*HI y se clonó en el plásmido pHRP309, obteniéndose así la construcción denominada pSJR51 en *E. coli* DH5 α , que se comprobó por PCR con los cebadores lacZhutA5'1 y lacZhutA3'1. Seguidamente se realizaron los ensayos de actividad β -galactosidasa para cuantificar la expresión del gen *hutA* en presencia o ausencia de hierro. Para ello, se realizaron cultivos en medio TSC-1 en presencia de 10 μ M de FeSO₄ o 100 μ M de 2,2'-dipyridyl que se incubaron a 25 °C hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de entre 0,3-0,4. Se mezclaron entonces 0,3 mL de cada cultivo con 0,7 mL de tampón Z (Na₂HPO₄.2H₂O 60 mM; NaH₂PO₄.H₂O 40 mM; KCl 10 mM; MgSO₄.7H₂O 1 mM; β -mercaptoetanol 50 mM) (volumen final de 1 mL). Se preparó al mismo tiempo en un tubo el blanco de la reacción, mezclando los mismos componentes pero con medio de cultivo sin inocular.

A cada mezcla se añadieron 2 gotas de cloroformo y 1 gota de SDS 0,1% (p/v) y se incubaron en un baño durante 5 min a 37 °C. La reacción se comenzó añadiendo 200 μ L de ONPG (4 mg mL⁻¹) a cada tubo, incluyendo el blanco, momento en el cual se empezó a medir el tiempo que tardaba en producirse el revelado, que se reflejó en un cambio de color a amarillo (el blanco no debe cambiar de color). La reacción se paró entonces con 500 μ L de Na₂CO₃ 1 M, la DO de las reacciones se midió a 420 nm y se calcularon las unidades Miller de β -galactosidasa según la siguiente fórmula:

$$\frac{OD_{420}}{OD_{600} \cdot t \cdot v} \cdot 10^3 = \text{Unidades Miller}$$

t = min

v = volumen del cultivo en mL

4.2.4.5. Análisis de la expresión *in vivo* de los genes *hutC* y *hutD*

Se llevaron a cabo infecciones experimentales de peces siguiendo básicamente el protocolo descrito por Magariños *et al.*, (1994c) utilizando como modelo experimental rodaballos jóvenes con una media de peso de 14 g.

Las células de la cepa DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida* se resuspendieron en solución salina (NaCl 0,85%) y 100 μ L de la suspensión se inyectaron intraperitonealmente en los peces a una concentración de 10^5 células mL⁻¹. Tres días después de la infección se les extrajo el bazo y el riñón a los rodaballos, se purificó el RNA y se sometió a análisis por RT-PCR como se describió anteriormente. En este caso la amplificación para la RT se llevó a cabo con un cebador del extremo 3' del gen *hutD* (*hutD* 3'1) y la PCR se realizó con los cebadores lacZ*hutB*5'1 y *exbD*-*expr*-3' que amplificaban un fragmento interno de 230 pb del gen *hutB*. Como control se llevaron a cabo la RT-PCR y la PCR del gen del rRNA 16S como se describió anteriormente.

4.3. Resultados

4.3.1. Identificación de los genes que intervienen en la captación del grupo hemo en *P. damsela*

4.3.1.1. Secuenciación y descripción de los genes del sistema de *P. damsela* subsp. *piscicida*

Secuenciación del gen *tonB*

La secuenciación del inserto del plásmido F-64 reveló la presencia de una ORF completa de 252 aminoácidos con un peso molecular de 27,3 kDa con homología con la proteína TonB de distintas especies del género *Vibrio*. Esta ORF (Figura IV.14) codifica una proteína que mostró un 67% y un 56% de similitud (Tabla IV.1) con las proteínas TonB de *P. profundum* y *V. parahaemolyticus* respectivamente.

Tabla IV.1.-Porcentajes de identidad (Id) y similitud (Sim) de las proteínas pertenecientes al sistema de captación de hemina de *P. damsela* subsp. *piscicida* con respecto a sus homólogos en otras especies de los géneros *Photobacterium* y *Vibrio*.

Proteína	Homologo	EMBL No Acc	Id. (%)	Sim. (%)
HutA	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> HutA	Q5K376	98	99
	<i>P. profundum</i> hipotético receptor de hemo	Q6LRY0	66	81
	<i>V. mimicus</i> MhuA	Q9AQK5	45	63
	<i>V. parahaemolyticus</i> HutA	Q87HSH4	31	49
	<i>V. anguillarum</i> HuvA	Q70YH5	34	52
HutZ	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> HutZ	Q659W2	98	100
	<i>P. profundum</i> proteína hipotética HugZ	Q6LQC8	76	89
	<i>V. vulnificus</i> proteína hipotética HupZ	Q7MF93	69	81
	<i>V. cholerae</i> HutZ	Q9KL41	68	80
	<i>V. parahaemolyticus</i> proteína hipotética HutZ	Q87J24	66	82
HutX	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> HutX	Q659W1	100	100
	<i>P. profundum</i> proteína hipotética HutX	Q6LQC7	79	90
	<i>V. cholerae</i> HutX	Q9KL40	66	83
	<i>V. vulnificus</i> proteína hipotética HupX	Q7MF94	66	83
	<i>V. anguillarum</i> HuvX	Q70YH3	63	81
HutW	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> HutW	Q659W0	96	97
	<i>P. profundum</i> hipotética coproporfirógeno oxidasa	Q6LQC6	67	80
	<i>V. parahaemolyticus</i> PhuW	Q87J26	60	76
	<i>V. vulnificus</i> proteína hipotética HupW	Q7MF95	59	76
	<i>V. cholerae</i> HutW	Q9KL39	59	76
TonB1	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> TonB1	Q659V9	94	96
	<i>P. profundum</i> proteína hipotética TonB	Q6LQC5	54	67
	<i>V. parahaemolyticus</i> TonB1	Q87J27	41	56
	<i>V. cholerae</i> TonB1	Q52042	43	58
ExbB1	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> ExbB1	Q659V8	97	98
	<i>P. profundum</i> proteína hipotética ExbB1	Q6LQC4	79	88
	<i>V. anguillarum</i> ExbB1	Q70YH1	64	81
	<i>V. parahaemolyticus</i> ExbB1	Q9XCY5	67	83
ExbD1	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> ExbD1	Q659V7	97	100
	<i>P. profundum</i> proteína hipotética ExbD	Q6LQC3	67	87
	<i>V. vulnificus</i> ExbD1	Q8D3S5	53	78
	<i>V. anguillarum</i> ExbD1	Q70YH0	55	72
HutB	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> HutB	Q659V6	96	99
	<i>P. profundum</i> proteína hipotética HutB	Q6LQC2	62	73
	<i>V. parahaemolyticus</i> HutB	Q87J30	49	68
	<i>V. anguillarum</i> HuvB	Q70YG9	53	70
	<i>V. vulnificus</i> transportador de hemo	Q7MF99	48	67
HutC	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> HutC	Q659V5	99	99
	<i>P. profundum</i> proteína hipotética HutC	Q6LQC1	73	85
	<i>V. parahaemolyticus</i> HutC	Q87J31	64	81
	<i>V. vulnificus</i> transportador de hemo	Q8D3S7	62	79
	<i>V. anguillarum</i> HuvC	Q70YG8	64	81
HutD	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> HutD	Q659V4	97	98
	<i>P. profundum</i> proteína hipotética HutD	Q6LQC0	65	81
	<i>V. parahaemolyticus</i> HutD	Q87J32	57	74
	<i>V. cholerae</i> HutD	O52047	54	74
	<i>V. vulnificus</i> transportador de hemo	Q7MFA1	54	72

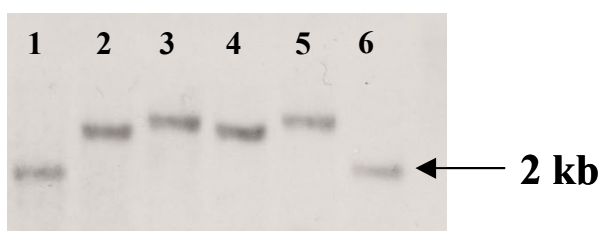
La proteína TonB presenta características conservadas presentes en otras proteínas TonB descritas en otras especies, como por ejemplo un residuo de histidina en la zona N-terminal que según Karlsson *et al.* (1993) podría tener alguna función en la unión a la membrana citoplasmática. También se localizaron secuencias repetitivas de los dímeros Glu-Pro y Lys-Pro que jugarían un papel en la ubicación de TonB en el periplasma (Larsen *et al.*, 1993).

A cada lado del gen *tonB* se localizaron dos ORFs incompletas que codifican para proteínas con homología con las proteínas ExbB y PhuW de *Photobacterium profundum*.

Clonación de las regiones contiguas al gen *exbB*

Para clonar los genes vecinos a *tonB*, y completar la secuencia del gen *exbB*, el fragmento *XbaI-KpnI* del plásmido F-64 se utilizó como sonda para realizar una hibridación con el DNA genómico de la cepa DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida* digerido con varias enzimas de restricción. Los resultados obtenidos, se utilizaron para construir un mapa de restricción en el que se identificó un fragmento de aproximadamente 2 kb flanqueado por el sitio de corte *BglII* (Figura IV.12).

Figura IV.12.-Esquema de las bandas de DNA de *P. damsela* subsp. *piscicida* obtenidas por Southern blot utilizando como sonda el fragmento escindido del clon F-64. El DNA fue digerido con: *HindIII* (1), *XbaI* (2), *ClaI* (3), *EcoRV* (4), *SacI* (5) y *BglII* (6).

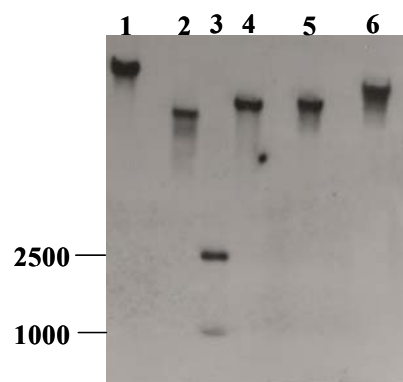


Este resultado condujo a la construcción del pCAR084 del modo descrito en los materiales y métodos (sección 4.2.1.1). La secuenciación del inserto de este plásmido reveló la secuencia restante del gen *exbB*. La ORF resultante se transcribe en la misma hebra que el gen *tonB* y codifica una proteína de 223 aminoácidos con un peso molecular de 24,5 kDa con un 88%, y un 81% de similitud con las proteínas ExbB de *P. profundum* y *V. anguillarum* respectivamente (Tabla IV.1) (Figura IV.15), y por ello se denominó proteína ExbB de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

A continuación y siguiendo el sentido de transcripción del gen *exbB*, se localizó una nueva ORF completa, que codifica una proteína de 141 aminoácidos con un peso molecular de 15,7 kDa. Al comparar la secuencia aminoacídica con otras especies se comprobó que mostraba un 87% y un 78% de similitud con las proteínas ExbD de *P. profundum* y *V. vulnificus* respectivamente, por lo que se le asignó el nombre de proteína ExbD de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Figura IV.16).

El codón de inicio de la ORF localizada a continuación del extremo 3' del gen *exbD*, se superpone con el de parada de éste. Esta nueva ORF codifica una proteína que mostró un 73% y un 70% de similitud con las proteínas HutB de *P. profundum* y *V. anguillarum* respectivamente (Figura IV.17 y Tabla IV.1) por lo que se le denominó proteína HutB de *P. damsela* subsp. *piscicida*, una proteína de 298 aminoácidos con un peso molecular de 31,7 kDa. Este tipo de proteínas están implicadas generalmente en el transporte del grupo hemo a través del periplasma, y su función es ceder la molécula de hemo a un transportador ABC localizado en la membrana interna de la bacteria. Como esta ORF estaba incompleta, se realizó una segunda hibridación utilizando una nueva membrana con digestiones dobles de enzimas (Figura IV.13). Como sonda se utilizó el fragmento *XbaI-HindIII* escindido del pCAR084.

Figura IV.13.-Esquema de las bandas de DNA de *P. damsela* subsp. *piscicida* obtenidas por Southern blot utilizando como sonda el fragmento *XbaI-HindIII* escindido del plásmido pCAR 084. El DNA fue digerido con: *HindIII-EcoRI* (1), *HindIII-BamHI* (2), *HindIII-EcoRV*(3), *HindIII-KpnI* (4), *HindIII-PstI* (5) y *HindIII-SalI* (6).



Los resultados sirvieron para generar el pCAR094 del modo descrito en materiales y métodos. La secuenciación de este plásmido reveló que 84 nucleótidos a continuación del codón de parada del gen *hutB*, y transcribiéndose en la misma cadena, se localizaba el codón de inicio de la siguiente ORF, que codifica una proteína de 345 aminoácidos de 36,1 kDa con un 85% y un 81% de similitud con las proteínas HutC de

P. profundum y *V. parahaemolyticus* respectivamente (Tabla IV.1), por lo que se le denominó proteína HutC de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Figura IV.18). Este tipo de proteínas pertenecen a la familia de las ABC-permeasas implicadas en la captación de hierro, y suelen aparecer asociadas a sistemas TonB y receptores de captación de hemo en diferentes especies del género *Vibrio*.

Para seguir avanzando en la secuenciación del sistema, se llevó a cabo una nueva hibridación en la misma membrana utilizada en el caso anterior, y como sonda en este caso se utilizó el fragmento escindido con *EcoRI* del pCAR094. Los resultados de esta última hibridación sirvieron para completar el mapa de restricción de esta región del sistema y generar el pCAR110 como se describió en materiales y métodos. La secuenciación del inserto contenido en este plásmido, reveló una nueva ORF que se transcribía en la misma hebra que su predecesora, y que codifica una proteína de 266 aminoácidos y de 28,6 kDa que resultó tener un 81% de similitud con la proteína HutD de *P. profundum*, y un 74% con las proteínas HutD de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* (Tabla IV.1), por lo que se le denominó proteína HutD de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Figura IV.19).

Las proteínas HutC y HutD constituyen el “sistema de transporte ABC”, donde HutC sería la permeasa, y HutD el componente de unión de ATP (ATPasa) asociado generalmente a permeasas (tipo HutC) implicadas en el ingreso del grupo hemo al interior de la bacteria, así como asociado a otras proteínas de unión de ATP involucradas en sistemas de transporte de citrato y ferrocromos. HutD contiene características comunes a otras ATPasas pertenecientes a transportadores ABC: el motivo consenso WalkerA GPNGAGKS y el motivo WalkerB LMLDE. Estos dos sitios son parte de una zona de unión de ATP altamente conservada, que conforma una estructura conocida como “bolsillo de unión de ATP” (Walker *et al.*, 1982). También se identificó una región LSGGE característica de los transportadores ABC (Figura IV.19).

		Inicio de tonB																
1 1		ATG M	AAC N	AAC N	GTT V	GCT A	TTA L	TTA L	GGT G	CAT H	CAG Q	ATG M	GAT D	ACG T	ACA T	AGA R	45 15	
46 16		TAT Y	GTA V	ATA I	GCA A	GGT G	GCA A	GTT V	TCA S	GTC V	ATT I	ATT I	CAT H	GGT G	TTG L	ATT I	90 30	
91 31		CTC L	TCT S	GCT A	GTG V	CCA P	AGC S	CAA Q	AAC N	GCA A	ATA I	GCA A	ATG M	CCA P	ATA I	GGT G	135 45	
136 46		AAT N	CAA Q	ATA I	GCG A	CCC P	GTT V	TCT S	TTA L	AAT N	CTA L	GTG V	ACG T	GCA A	CCT P	ATT I	180 60	
181 61		GCT A	CCG P	CCA P	CCA P	CCG P	GCT A	CAA Q	GAT D	GTT V	GCA A	AAA K	GCA A	GAA E	GTC V	AAA K	225 75	
226 76		CCC P	CAA Q	AAA K	TCT S	GTT V	AAA K	AAA K	ACA T	CAG Q	CAA Q	ATT I	GAA E	CAA Q	AAA K	ACA T	270 90	
271 91		GCG A	GTA V	AAA K	AAA K	CTA L	GTA V	AAA K	AAG K	ACG T	ACA T	CCA P	AAA K	AAG K	AAA K	GCG A	315 105	
316 106		GCT A	AAG K	AAA K	GTA V	GCG A	AAT N	AAA K	ACA T	ACA T	AAA K	ACA T	AAA K	AAA K	GCG A	GAG E	360 120	
361 121		CAA Q	CAG Q	CCG P	TTA L	GTA V	AAA K	AAC N	CGT R	GAT D	GGC G	AAG K	CCA P	GTA V	AAG K	AGT S	405 135	
406 136		GCA A	ACT T	AAA K	CCA P	CAA Q	CCT P	CAG Q	AGC S	AAG K	CCG P	AAA K	AAT N	CAA Q	ACA T	AGC S	450 150	
451 151		CAA Q	GTA V	GTG V	AAT N	ACC T	ACT T	AAC N	AAT N	AAA K	AAG K	GCA A	CTG L	TTA L	TCT S	AGC S	495 165	
496 166		GGT G	ACT T	CAA Q	TCC S	CCT P	GAA E	TTA L	GTC V	AGT S	AGA R	CCA P	ACA T	TTT F	GCC A	ACT T	540 180	
541 181		CGA R	CCA P	GGA G	CCA P	GTT V	TCT S	TAC Y	CCA P	AGA R	TTG L	GCA A	AAA K	CGC R	CGA R	GGG G	585 195	
586 196		ATT I	CAA Q	GGA G	CAG Q	GTA V	ATG M	GTT V	GAG E	ATC I	TGG W	ATT I	GAT D	CCA P	AAG K	GGC G	630 210	
631 211		AAA K	CAA Q	ATT I	AAG K	CAA Q	AAA K	GTG V	ATC I	TCA S	TCG S	TCA S	GGT G	ACA T	GAG E	ATC I	675 225	
676 226		CTT L	GAT D	CAA Q	GCG A	GCA A	TTA L	AAA K	GCC A	ATT I	AAG K	AAG K	TGG W	GAG E	TTT F	TCT S	720 240	
721 241		TCA S	CAT H	ATC I	GTT V	GAT D	GGG G	CAA Q	GCT A	ATT I	GCT A	CAC H	CGC R	GTT V	CAT H	ATT I	765 255	
766 256		CCT P	GTA V	CGT R	TTT F	CAA Q	TTG L	GAT D	TAA *	789								
		Parada de tonB																

Figura IV.14.-Secuencia del gen *tonB* y la proteína TonB de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

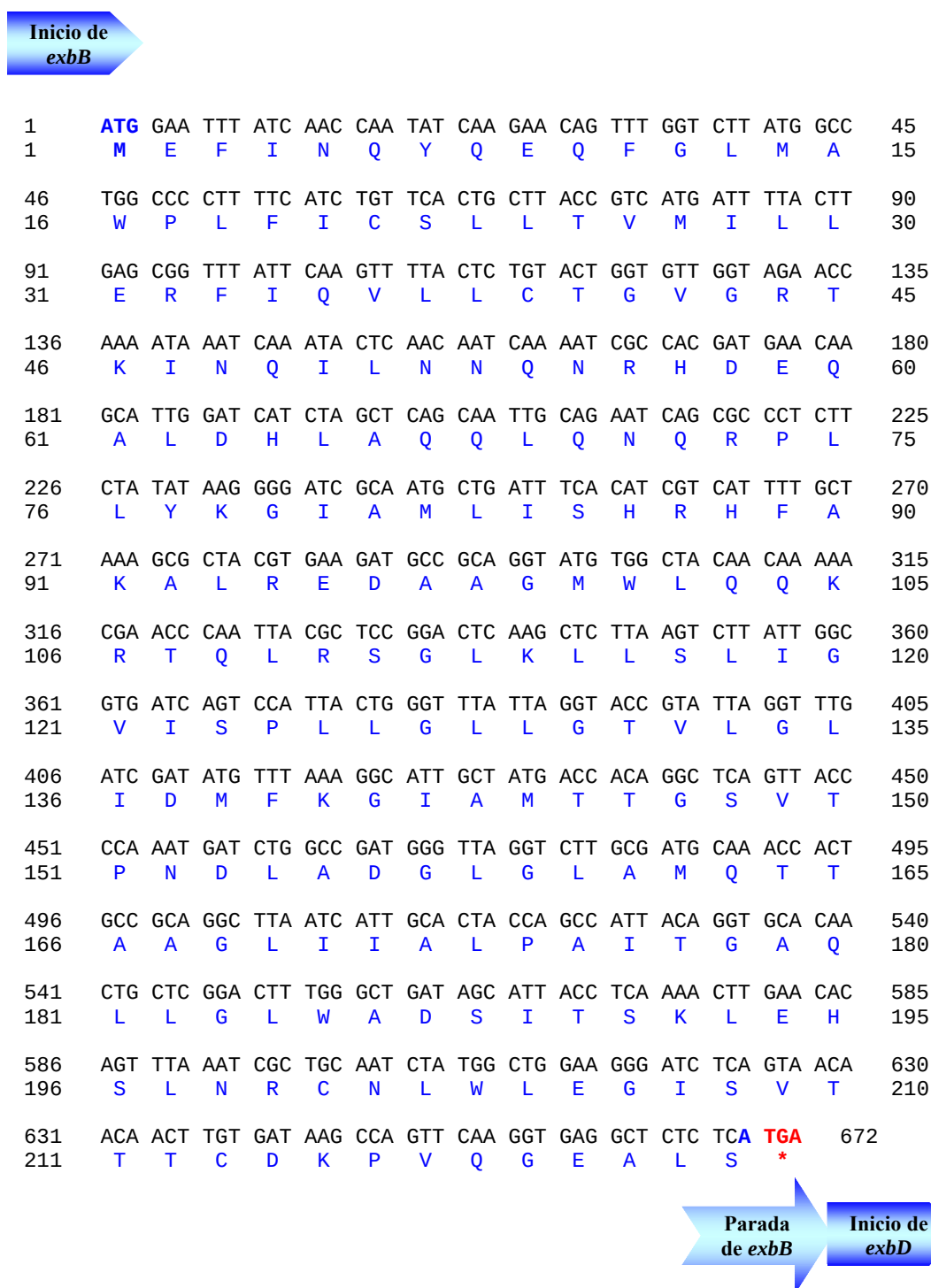


Figura IV.15.-Secuencia del gen *exbB* y la proteína ExbB de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

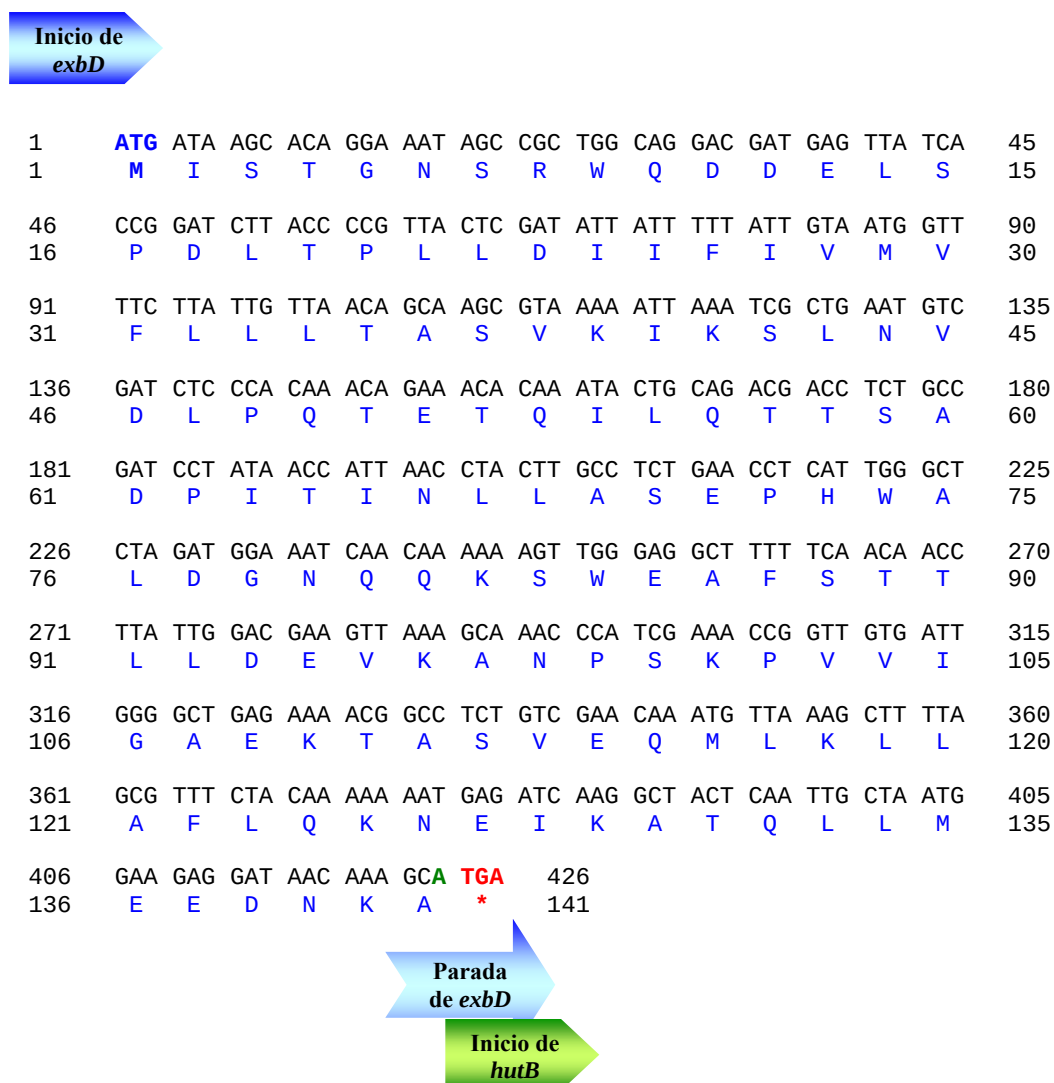


Figura IV.16.-Secuencia del gen *exbD* y la proteína ExbD de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Inicio de hutB																
1	ATG	AGT	CTA	ATT	AAA	CCA	GCA	CCA	GTG	TTT	AAA	ACC	GTA	TCT	TTA	45
1	M	S	L	I	K	P	A	P	V	F	K	T	V	S	L	15
46	GCT	GTT	GCT	ATC	CTA	TTT	GGA	GCG	ACG	TCA	GCT	TAT	GCA	CAA	AAC	90
16	A	V	A	I	L	F	G	A	T	S	A	Y	A	Q	N	30
91	AAT	GAC	TCG	CGT	ATT	ATC	AGT	GCC	GGA	TCG	GCA	ATT	ACT	GAG	ATT	135
31	N	D	S	R	I	I	S	A	G	S	A	I	T	E	I	45
136	ATC	AAT	GCC	TTA	GAT	GCC	AGC	AAT	CAA	CTG	GTT	GCC	GTA	GAC	AGT	180
46	I	N	A	L	D	A	S	N	Q	L	V	A	V	D	S	60
181	ACC	AGT	CAA	ACA	TTG	GTT	GAT	ACC	AAG	ATG	CCT	AAA	GTT	GGC	TAT	225
61	T	S	Q	T	L	V	D	T	K	M	P	K	V	G	Y	75
226	CAT	CGT	CAA	TTA	TCA	GCA	GAA	AAT	CTC	ATG	TCA	CTC	ACA	CCA	ACT	270
76	H	R	Q	L	S	A	E	N	L	M	S	L	T	P	T	90
271	CGT	ATT	ATT	GGT	TCA	AAT	GAA	ATG	GGT	CCA	GAA	TCG	ACG	CTT	ACC	315
91	R	I	I	G	S	N	E	M	G	P	E	S	T	L	T	105
316	ATA	TTG	AAA	CAA	GCT	GGC	GTT	GCA	GTC	GAT	ATT	GTC	AAC	TCA	GGA	360
106	I	L	K	Q	A	G	V	A	V	D	I	V	N	S	G	120
361	AAT	ACC	GTT	TCA	GAC	CTT	AGT	AAG	CGA	ATT	GAA	CAA	GTT	GCG	CAA	405
121	N	T	V	S	D	L	S	K	R	I	E	Q	V	A	Q	135
406	TTA	ACA	GGC	CAT	CAG	AAA	CAA	GCT	AAT	AAG	TTA	GAA	CAA	ACT	GTG	450
136	L	T	G	H	Q	K	Q	A	N	K	L	E	Q	T	V	150
451	CAA	CAT	ACC	GTT	CAA	ACA	TTA	ACG	GAG	CAT	CGT	TCT	CAA	CTT	AAG	495
151	Q	H	T	V	Q	T	L	T	E	H	R	S	Q	L	K	165
496	AAA	CAA	CCT	AAT	TTT	AAA	GAA	AAA	AAA	GTT	TTG	TTT	GTG	ATG	ATT	540
166	K	Q	P	N	F	K	E	K	K	V	L	F	V	M	I	180
541	CAT	GAT	GGG	AGA	CCT	GTC	AAT	GTG	GCA	GGT	AAA	GGA	ACA	ACG	GCA	585
181	H	D	G	R	P	V	N	V	A	G	K	G	T	T	A	195
586	GAT	ACC	GTT	ATC	AAC	CTT	GCT	GGA	GCC	ATA	AAC	CCG	GCT	GCT	GCA	630
196	D	T	V	I	N	L	A	G	A	I	N	P	A	A	A	210
631	TTT	GTT	GAA	AAC	TAT	AAA	CCT	ATT	TCA	TCA	GAA	GCC	ATG	CTT	CAA	675
211	F	V	E	N	Y	K	P	I	S	S	E	A	M	L	Q	225
676	ATG	CAG	CCT	GAT	ATC	ATT	TTA	TTG	AGC	TCT	AGA	ACC	GCC	GCA	ACC	720
226	M	Q	P	D	I	I	L	L	S	S	R	T	A	A	T	240
721	ATC	AAA	ACA	ATG	CCA	GAT	CTA	ATT	AAG	AAG	ATT	CCA	GTA	CTA	GCC	765
241	I	K	T	M	P	D	L	I	K	K	I	P	V	L	A	255
766	CAA	ACA	CCC	GCA	GCG	CAA	AAT	AAT	GCA	TTC	GCT	GTG	ATA	GAT	GGT	810
256	Q	T	P	A	A	Q	N	N	A	F	A	V	I	D	G	270
811	ACA	GCG	CTT	ATT	GGT	GGT	CTC	GGT	ATC	CAT	AGC	CTC	AAC	GAA	GCG	855
271	T	A	L	I	G	G	L	G	I	H	S	L	N	E	A	285
856	GCT	CGA	TTA	TCA	AAT	GTT	TTC	TAT	CCA	ACT	GTG	AAT	CAG	TAA		897
286	A	R	L	S	N	V	F	Y	P	T	V	N	Q	*		
Parada de hutB																

Figura IV.17.-Secuencia del gen *hutB* y la proteína HutB de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Inicio de hutC	1	ATG	GGA	AAT	CAA	CGT	TTA	TCC	ATC	CGC	TCC	CTC	TAC	CCT	ATT	GGC	45
	1	M	G	N	Q	R	L	S	I	R	S	L	Y	P	I	G	15
	46	TTT	GGC	CTT	TTA	CTA	CTC	GCC	ATC	GTC	AGT	TCT	ATT	GTT	ATT	GGC	90
	16	F	G	L	L	L	L	A	I	V	S	S	I	V	I	G	30
	91	CCA	ATG	TCT	ATT	AGC	TAT	AGT	GAT	AGC	ATT	AAA	GCC	TTA	CTG	CCT	135
	31	P	M	S	I	S	Y	S	D	S	I	K	A	L	L	P	45
	136	TGG	CAT	ACC	GAA	CTG	CCA	AAT	CAT	ATC	AGC	TTA	GTT	ATC	AAT	CAG	180
	46	W	H	T	E	L	P	N	H	I	S	L	V	I	N	Q	60
	181	ATT	CGT	CTA	CCG	AGA	ACT	CTG	CTC	TGT	ATT	ATG	ATT	GGA	GCA	ATT	225
	61	I	R	L	P	R	T	L	L	C	I	M	I	G	A	I	75
	226	CTC	GCC	ATT	TGT	GGT	GCG	GTA	ATG	CAG	GGG	CTA	TTT	CGT	AAT	CCA	270
	76	L	A	I	C	G	A	V	M	Q	G	L	F	R	N	P	90
	271	CTT	GCC	GAT	CCC	GCC	ATC	ATT	GGG	GTA	ACA	GGT	GGT	GCA	GGG	CTT	315
	91	L	A	D	P	A	I	I	G	V	T	G	G	A	G	L	105
	316	GGT	GCT	GCG	TTA	GCG	ATC	ATT	GTA	TTT	GCA	CCT	ATT	GCA	GCG	CAA	360
	106	G	A	A	L	A	I	I	V	F	A	P	I	A	A	Q	120
	361	TTT	CCC	ACC	ATT	TTA	AAC	TTA	GGC	GCA	ATC	CCT	CTG	TTT	GCC	TTT	405
	121	F	P	T	I	L	N	L	G	A	I	P	L	F	A	F	135
	406	ATT	GGC	GGT	GTT	ATC	AGT	ACT	TTC	TTT	GTT	TAT	CGT	TTA	GGT	ACT	450
	136	I	G	G	V	I	S	T	F	F	V	Y	R	L	G	T	150
	451	GGA	ACT	AAT	GGA	ACA	TCG	GTG	ACT	GTG	ATG	CTG	TTA	GCG	GGG	GTG	495
	151	G	T	N	G	T	S	V	T	V	M	L	L	A	G	V	165
	496	GCA	ATC	TCA	GCT	ATA	TCA	GGT	GCG	GGC	TTA	GGC	TTA	CTC	AAT	TAT	540
	166	A	I	S	A	I	S	G	A	G	L	G	L	L	N	Y	180
	541	GTT	GCC	GAC	GAT	CAA	GCG	CTT	CGT	GAT	TTC	TCT	TTA	TGG	TCA	ATG	585
	181	V	A	D	D	Q	A	L	R	D	F	S	L	W	S	M	195
	586	GGT	TCA	TTG	GCT	GGC	GCA	ACG	TGG	TCA	GGG	ATC	GCT	CTA	GCA	ACC	630
	196	G	S	L	A	G	A	T	W	S	G	I	A	L	A	T	210
	631	GTA	TCT	TTT	GTT	GCA	CTG	TTT	TTC	TTT	TTC	TAT	CGT	AAA	GCC	AAT	675
	211	V	S	F	V	A	L	F	F	F	F	Y	R	K	A	N	225
	676	GCG	CTC	AAT	GCT	TTT	TTA	TTG	GGT	GAA	TCA	GAA	GCC	AAA	CAT	ATG	720
	226	A	L	N	A	F	L	L	G	E	S	E	A	K	H	M	240
	721	GGC	GTA	AAT	GTC	CAA	CGC	CTT	AAA	AAA	CAG	TTA	ATC	ATT	ACT	TGT	765
	241	G	V	N	V	Q	R	L	K	K	Q	L	I	I	T	C	255
	766	GCC	GCA	GGT	GTT	GGC	GTT	ACC	GTG	TCA	CTA	ACA	GGT	CCG	ATA	GGG	810
	256	A	A	G	V	G	V	T	V	S	L	T	G	P	I	G	270
	811	TTT	ATT	GGC	CTT	ATT	ATT	CCT	CAT	CTG	GGA	CGA	ATG	CTA	ATT	GGA	855
	271	F	I	G	L	I	I	P	H	L	G	R	M	L	I	G	285
	856	CCA	AAC	CAT	AAA	AAC	TTA	ATT	CCG	GTA	TCA	GCC	CTA	TTA	GGC	GCC	900
	286	P	N	H	K	N	L	I	P	V	S	A	L	L	G	A	300
	901	TTC	ATT	TTG	TTA	CTT	GCA	GAT	ATG	ATT	GCT	CGT	ACC	GCT	TTT	GCT	945
	301	F	I	L	L	L	A	D	M	I	A	R	T	A	F	A	315
	946	CCT	CAA	GAG	TTA	CCA	GTT	GGT	ATT	ATC	ACT	GCC	ATC	ATC	GGT	GCT	990
	316	P	Q	E	L	P	V	G	I	I	T	A	I	I	G	A	330
	991	CCC	TTC	TTT	ATT	ATG	TTA	TTG	ATC	CAG	CAA	AAA	GGA	CGT	ATG	GCA	1035
	331	P	F	F	I	M	L	L	I	Q	Q	K	G	R	M	A	1035

Parada de
hutCInicio de
hutDFigura IV.18.-Secuencia del gen *hutC* y la proteína HutC de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Inicio de hutD																
1	ATG	ATG	AGC	AGC	ACA	CTA	TCC	TCT	CAT	AAC	GTA	ATA	GCA	CTA	AAA	45
1	M	M	S	S	T	L	S	S	H	N	V	I	A	L	K	15
46	GCT	TCT	AAC	CTT	CAC	TTG	CAG	CTG	GGC	GGA	AAG	ACC	TTA	CTA	GAT	90
16	A	S	N	L	H	L	Q	L	G	G	K	T	L	L	D	30
91	AAT	GTT	GAT	TTA	GAA	ATA	AGG	TCT	GGG	CAA	ATA	ACC	GCG	CTG	TTA	135
31	N	V	D	L	E	I	R	S	G	Q	I	T	A	L	L	45
136	GGT	CCA	AAT	GGC	GCC	GGT	AAA	AGT	AGT	CTA	TTG	AAG	GTA	TTA	AAC	180
46	G	P	N	G	A	G	K	S	S	L	L	K	V	L	N	60
181	GGT	GAA	ATA	ACG	CCA	AAT	TCA	GGA	TCG	ATT	GAG	ATC	TTT	TCA	AGC	225
61	G	E	I	T	P	N	S	G	S	I	E	I	F	S	S	75
226	CCC	AAA	GAT	CAT	TGG	CCA	TCT	GAA	TTA	TTG	GCA	AAA	CAC	ATG	GGT	270
76	P	K	D	H	W	P	S	E	L	L	A	K	H	M	G	90
271	ATA	TTG	CCG	CAG	CAC	AGT	ACC	CTA	TCG	TTC	TCA	TTT	CTT	GCT	CAT	315
91	I	L	P	Q	H	S	T	L	S	F	S	F	L	A	H	105
316	GAA	GTT	GCA	GAG	CTT	GGT	GCG	ATG	CCT	TTA	GCA	ATA	TCA	AAT	CAT	360
106	E	V	A	E	L	G	A	M	P	L	A	I	S	N	H	120
361	CAA	GCG	CAA	CAA	CTC	GCG	GCT	AAG	AAT	ATG	GTT	AAA	GTT	GGT	GTA	405
121	Q	A	Q	Q	L	A	A	K	N	M	V	K	V	G	V	135
406	GAT	CAT	CTC	GCA	AAC	AGG	CTT	TAT	CCA	ACG	CTA	TCT	GGC	GGG	GAA	450
136	D	H	L	A	N	R	L	Y	P	T	L	S	G	G	E	150
451	AAA	CAA	CGC	GTT	CAT	TTT	GCC	AGA	GTA	TTA	ACC	CAG	TTA	TCG	CAC	495
151	K	Q	R	V	H	F	A	R	V	L	T	Q	L	S	H	165
496	TCT	GGC	GAA	CAA	TGT	ATT	TTA	ATG	CTT	GAT	GAA	CCC	ACA	TCT	GCT	540
166	S	G	E	Q	C	I	L	M	L	D	E	P	T	S	A	180
541	CTT	GAT	CTT	GCT	CAT	CAA	CAT	CAT	ACT	TTA	GAG	ATT	GCA	CAA	GCG	585
181	L	D	L	A	H	Q	H	H	T	L	E	I	A	Q	A	195
586	CTT	TCG	CAA	CAG	GGT	GCT	GCC	GTT	ATC	ATT	GTT	ATT	CAT	GAT	CTG	630
196	L	S	Q	Q	G	A	A	V	I	I	V	I	H	D	L	210
631	AAC	TTA	GCC	GCT	CAA	TAT	GCG	GAT	CGT	TTG	ATC	ATT	TTG	AAC	CAA	675
211	N	L	A	A	Q	Y	A	D	R	L	I	I	L	N	Q	225
676	GGC	AAA	ATT	CAA	GCT	GAT	GGT	ACG	CCA	TGG	CAA	GTA	CTA	ACC	CCA	720
226	G	K	I	Q	A	D	G	T	P	W	Q	V	L	T	P	240
721	ACC	GCA	GTC	GAA	AAT	GTT	TAC	GGC	TGG	CCA	GTT	CAA	GTT	ATC	GCT	765
241	T	A	V	E	N	V	Y	G	W	P	V	Q	V	I	A	255
766	CAT	CCA	GAA	CAT	AAC	TAT	CCG	GTT	ATT	TTG	GCT	TAA				801
256	H	P	E	H	N	Y	P	V	I	L	A	*				266
Parada de hutD																

Figura IV.19.-Secuencia del gen *hutD* y la proteína HutD de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Se somborean en amarillo las regiones consenso “WalkerA” y “WalkerB” y en verde la zona conservada con otras proteínas de transportadores ABC.

Clonación de las regiones contiguas al gen *hutW*

Para seguir secuenciando el gen *hutW* y el DNA adyacente a éste, se procedió a realizar una nueva hibridación utilizando como sonda el producto de PCR resultante de la amplificación con los cebadores phudams 5'1 y phudams 3'1. Ésta reveló un sitio *Hind*III localizado entre 2 y 3 kb “corriente abajo” del situado antes del inicio del gen *tonB*. La secuenciación del clon pCAR112 conteniendo un inserto *Hind*III-*Hind*III rindió la secuencia completa del gen *hutW*, que se transcribe en la hebra contraria al gen *tonB*, y se determinaron además dos nuevas ORFs. La proteína HutW resultó constar de 465 aminoácidos con un peso de 51,7 kDa, y mostró un 80% de similitud con una coproporfirinógeno III oxidasa de *P. profundum* (Figura IV.20).

Las dos ORFs situadas a continuación se transcriben en la misma hebra que *hutW*. La primera de ellas, cuyo codón de inicio se localiza a 131 nucleótidos del codón de parada del gen *hutW*, codifica una proteína de 148 aminoácidos que se denominó HutX, ya que comparte un 90% y un 83% de similitud con la proteína HutX de *P. profundum* y *V. cholerae* respectivamente (Figura IV.21). La segunda ORF codifica una proteína de 185 aminoácidos que guarda un 89% y un 81% de similitud con la proteína HutZ de *V. vulnificus* y *V. cholerae* y a la que se denominó proteína HutZ de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Figura IV.22).

Inicio de hutW																			
1	ATG	AAT	CAA	GAA	CAC	CAG	ATA	GAT	ATA	AAT	AAG	TTA	GAT	GAA	AGT		45		
1	M	N	Q	E	H	Q	I	D	I	N	K	L	D	E	S		15		
46	ATT	TTG	GGT	TTG	CAT	TCT	CCA	GAC	TCT	CTT	CGT	TTT	GCT	TTT	AGT		90		
16	I	L	G	L	H	S	P	D	S	L	R	F	A	F	S		30		
91	CGC	AAG	AAA	TCT	GCA	CAT	GCA	GGT	GGT	ATG	AAT	GCA	GTG	GTT	CCA		135		
31	R	K	K	S	A	H	A	G	G	M	N	A	V	V	P		45		
136	GCT	GAG	CAA	CAA	CAA	TCT	TTA	GGA	TTA	TCT	TTA	CTT	GGC	GAG	GAG		180		
46	A	E	Q	Q	Q	S	L	G	L	S	L	L	G	E	E		60		
181	AAA	AAA	GGA	TCT	CTA	GAA	CCT	TAT	AGC	CAA	GTC	AAA	AAA	CGT	TGC		225		
61	K	K	G	S	L	E	P	Y	S	Q	V	K	K	R	C		75		
226	CTT	TAT	GTG	CAT	ATC	CCA	TTT	TGT	CGA	GTA	CGC	TGT	ACT	TAC	TGC		270		
76	L	Y	V	H	I	P	F	C	R	V	R	C	T	Y	C		90		
271	AAT	TTC	TTC	CAA	TAC	GCA	TCA	AGC	CAA	CAA	CTT	ATC	GAT	GAT	TAT		315		
91	N	F	F	Q	Y	A	S	S	Q	Q	L	I	D	D	Y		105		
316	TTT	GCT	GCA	TTG	ATG	ATT	GAG	CTG	AAA	TTA	AAA	GCA	CAA	CAG	CCA		360		
106	F	A	A	L	M	I	E	L	K	L	K	A	Q	Q	P		120		
361	TGG	ACC	CAA	TCA	GCA	CCG	TTT	CAT	GCT	GTC	TAT	ATT	GGT	GGT	GGT		405		
121	W	T	Q	S	A	P	F	H	A	V	Y	I	G	G	G		135		
406	ACG	CCA	ACC	GAT	TTA	ACC	GCA	CAG	CAA	GTT	AAA	CAA	TTA	GGA	ACG		450		
136	T	P	T	D	L	T	A	Q	Q	V	K	Q	L	G	T		150		
451	ATG	ATT	CGC	AAA	CAT	TTT	CCA	CTC	ACT	ACC	GAT	TGC	GAA	TTA	ACG		495		
151	M	I	R	K	H	F	P	L	T	T	D	C	E	L	T		165		
496	CTT	GAA	GGT	CGT	ATT	AAT	CGA	TTC	AGT	GAT	GAA	ATG	TTT	TAT	TCT		540		
166	L	E	G	R	I	N	R	F	S	D	E	M	F	Y	S		180		
541	GCA	TTA	GAA	GGG	GGA	TTT	AAC	CGT	TTC	TCT	TTT	GGT	GTT	CAG	AGT		585		
181	A	L	E	G	G	F	N	R	F	S	F	G	V	Q	S		195		
586	TTT	GAT	ACT	CAA	GTA	AGA	CGT	AAA	GCT	AAG	CGT	TTA	GAT	GAT	CGA		630		
196	F	D	T	Q	V	R	R	K	A	K	R	L	D	D	R		210		
631	GAG	GTT	GTA	CTC	GAT	CGC	GTT	GCT	GCT	CTG	GCT	GCG	ACA	GAT	CAA		675		
211	E	V	V	L	D	R	V	A	A	L	A	A	T	D	Q		225		
676	GCT	CCG	ATC	GTT	ATT	GAT	CTG	TTA	TAT	GGA	CTG	CCT	TAT	CAG	ACT		720		
226	A	P	I	V	I	D	L	L	Y	G	L	P	Y	Q	T		240		
721	TTA	GAT	GTG	TGG	CAA	CAA	GAC	CTA	GAA	GAT	TTT	ATG	GCC	TCA	GGC		765		
241	L	D	V	W	Q	Q	D	L	E	D	F	M	A	S	G		255		
766	GCT	CAT	GGT	GTA	GGT	GTT	GAT	CTT	TAT	CAG	TTG	ATC	GAA	ATG	GGT		810		
256	A	H	G	V	G	V	D	L	Y	Q	L	I	E	M	G		270		
811	GGG	ACT	CCA	ATG	AAA	AAC	CTT	ATT	GAT	AAA	GGT	AAG	CTC	CCT	GAA		855		
271	G	T	P	M	K	N	L	I	D	K	G	K	L	P	E		285		
856	CCT	GCT	GAT	ACA	CAA	ACA	AAA	GCG	ACC	ATG	TTT	TTG	ATG	GGG	CAT		900		
286	P	A	D	T	Q	T	K	A	T	M	F	L	M	G	H		300		

991	AAA	ACT	ACA	GCA	GAA	GTC	TTA	CCT	CTA	GGG	GCA	GGT	GCT	GGT	GGC	1035
331	K	T	T	A	E	V	L	P	L	G	A	G	A	G	G	345
1036	AAT	ATT	GCA	GGT	TTT	GGC	ATG	ATG	CAA	CAT	CGT	ACT	TTA	GAT	GCT	1080
346	N	I	A	G	F	G	M	M	Q	H	R	T	L	D	A	360
1081	TAT	TTA	GCT	GCG	ATT	AAA	CGT	GGT	GAA	TTA	CCG	ATT	GCA	ATG	ATG	1125
361	Y	L	A	A	I	K	R	G	E	L	P	I	A	M	M	375
1126	ACC	AAA	CAA	GCA	AAT	CAA	GCC	TCT	CTT	CAT	GCC	GAA	ATT	AAA	GCC	1170
376	T	K	Q	A	N	Q	A	S	L	H	A	E	I	K	A	390
1171	AGT	TTT	GAT	CGA	GGC	GTA	CTT	AGC	CGA	TCT	TCA	CTA	GAT	TCG	ATT	1215
391	S	F	D	R	G	V	L	S	R	S	S	L	D	S	I	405
1216	GGA	GGC	AAA	GGG	CTA	TAT	TCT	TCT	TGT	TTA	CCT	CTG	TTT	AAA	GCA	1260
406	G	G	K	G	L	Y	S	S	C	L	P	L	F	K	A	420
1261	TGG	CGA	GAA	AAC	GGT	TTA	GTT	GAA	GTG	AAC	TCA	CAC	TAT	GTC	ACT	1305
421	W	R	E	N	G	L	V	E	V	N	S	H	Y	V	T	435
1306	TTA	ACG	TTA	GCA	GGA	CAG	TTT	TGG	GCT	GTA	ACC	TTA	GCT	CAA	GCA	1350
436	L	T	L	A	G	Q	F	W	A	V	T	L	A	Q	A	450
1351	TTA	ATA	GAA	GCA	ATA	ACA	CAG	CAA	TTG	AAT	CAG	TCT	CTG	GCT	GCC	1395
451	L	I	E	A	I	T	Q	Q	L	N	Q	S	L	A	A	465
1396	TAA															1398
466	*															

Parada de hutW

Figura IV.20.-Secuencia del gen *hutW* y la proteína HutW de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Inicio de hutX																		
1	ATG	AGC	TTA	GCA	GAG	CAA	CTT	AAA	GTG	ACA	GAA	GGT	GAA	GTG	GTT		45	
1	M	S	L	A	E	Q	L	K	V	T	E	G	E	V	V		15	
46	TTA	TCA	TTT	CCT	GAA	TCT	ATG	GTC	AGC	CAT	CTT	CCT	GGC	AAG	TTA		90	
16	L	S	F	P	E	S	M	V	S	H	L	P	G	K	L		30	
91	GCT	CAG	TCT	ATT	CTT	GAA	CAA	TTG	CCA	CAG	TGG	GGG	CCG	GTT	ACA		135	
31	A	Q	S	I	L	E	Q	L	P	Q	W	G	P	V	T		45	
136	ACG	ATT	GTC	CAT	TCA	ATG	GGC	TCT	ATC	TTT	GAG	GTA	AAA	GCG	CCG		180	
46	T	I	V	H	S	M	G	S	I	F	E	V	K	A	P		60	
181	TTT	CCA	AAA	GGT	AAA	GAA	GCG	CGT	GGC	TAC	TAT	AAT	TTG	ATG	GGA		225	
61	F	P	K	G	K	E	A	R	G	Y	Y	N	L	M	G		75	
226	CGT	GAC	GGT	GAG	CTT	CAT	GGT	CAT	TTA	CGC	TTA	GAT	TTG	GTC	TCT		270	
76	R	D	G	E	L	H	G	H	L	R	L	D	L	V	S		90	
271	GAT	ATT	GCG	CTT	GTT	AGT	AAA	CCT	TTT	ATG	GGG	CAA	GAA	AGT	TAC		315	
91	D	I	A	L	V	S	K	P	F	M	G	Q	E	S	Y		105	
316	TTT	ATT	GGC	TTT	TTT	GCA	GCT	CAA	GGG	GAG	TGT	GTA	TTT	AAA	GTT		360	
106	F	I	G	F	F	A	A	Q	G	E	C	V	F	K	V		120	
361	TAT	TTA	GGG	CGA	GAT	AAA	AAG	CGA	CAA	CTC	TTT	CCC	GAA	CAA	ATT		405	
121	Y	L	G	R	D	K	K	R	Q	L	F	P	E	Q	I		135	
406	GAG	ATG	TTT	AAA	AAA	CTA	AAA	CAA	TTA	GGA	GAA	GAT	TCG	TAA			447	
136	E	M	F	K	K	L	K	Q	L	G	E	D	S	*			149	
															Parada de hutX			

Figura IV.21.-Secuencia del gen *hutX* y la proteína HutX de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

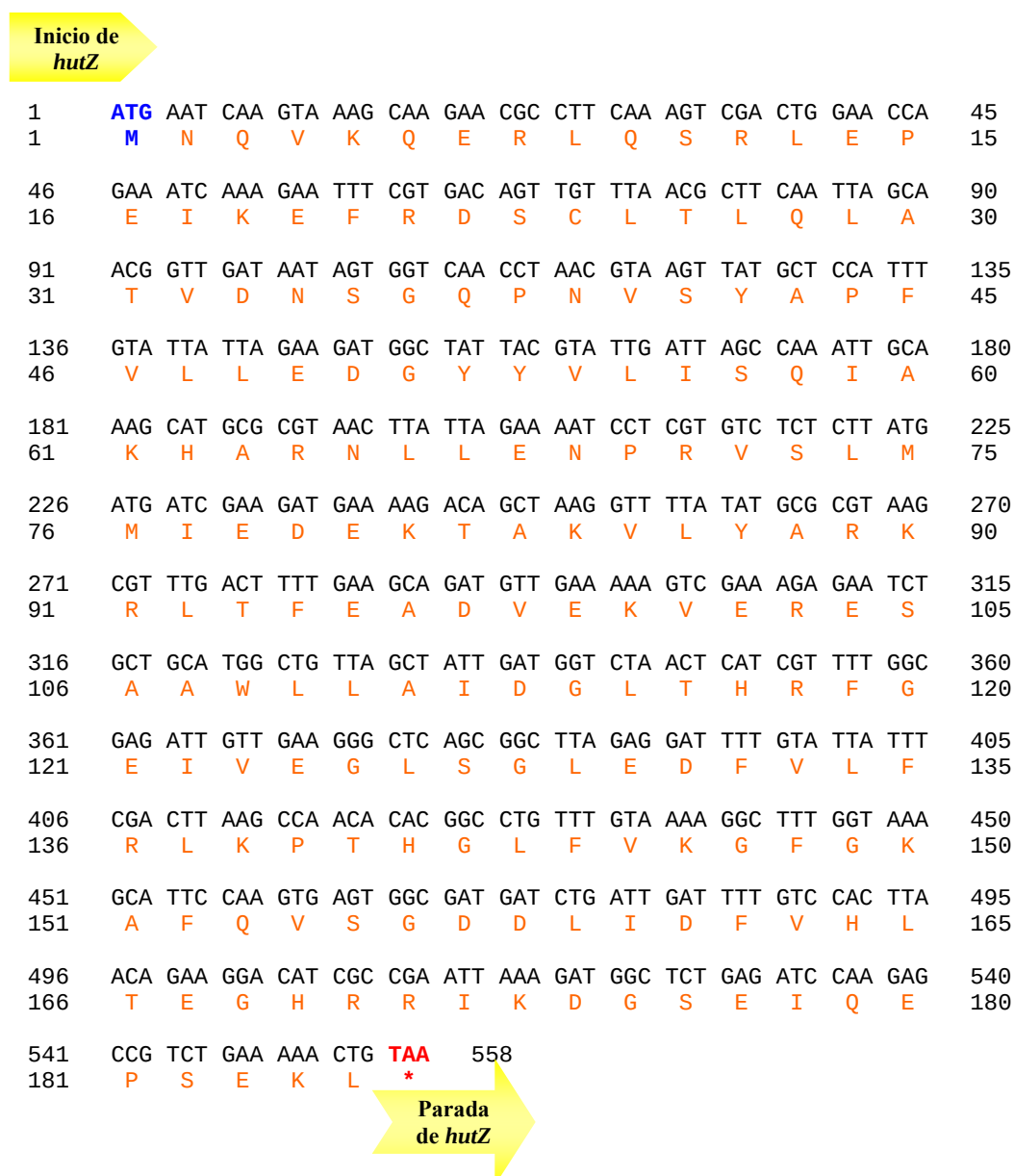


Figura IV.22.-Secuencia del gen *hutZ* y la proteína HutZ de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

En la Figura IV.23 se resume la información concerniente a los genes de los que se ha hablado hasta el momento. También se han esquematizado las funciones que realizarían en la célula las distintas proteínas que se predijeron, en función de la homología que guardan con las descritas en otras especies bacterianas.

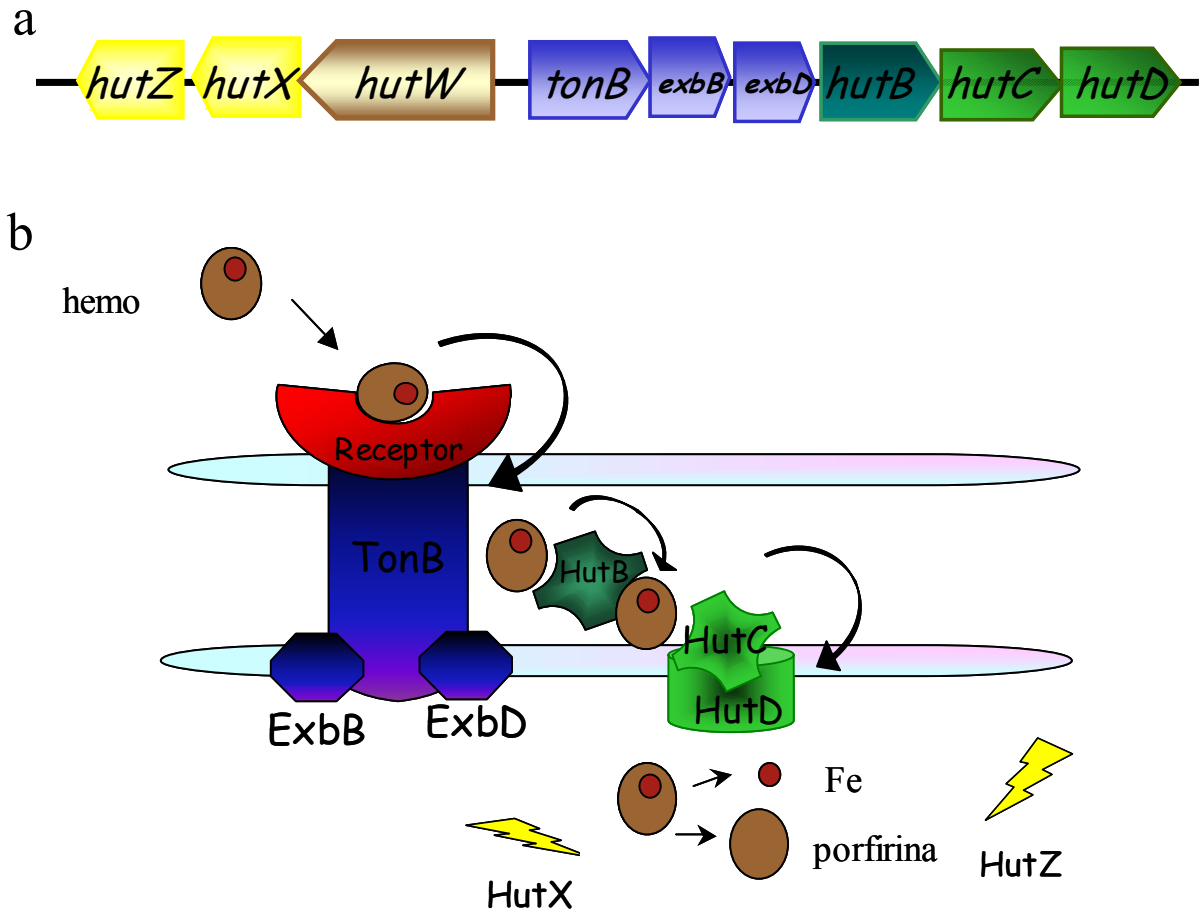


Figura IV.23.-(a) Resumen de la organización de los genes implicados en la captación de grupos hemo en el cromosoma de *P. damsela* subsp. *piscicida* y (b) esquema de las funciones que realizarían cada una de las proteínas que codifican estos genes: Receptor; HutX y HutZ; Proteína periplásmica de unión de hemina: HutB; Transducción de energía al receptor: TonB, ExbB y ExbD y Transportador ABC: HutC y HutD.

4.3.1.2. Secuenciación y descripción de los genes del sistema de *P. damsela* subsp. *damsela*

La reacción de PCR llevada a cabo con los cebadores del *hutZ*-DI21-5'1 y del *hutD*-DI21-3'1 utilizando como molde el DNA de *P. damsela* subsp. *damsela* CDC 2227-81, rindió un producto de amplificación de aproximadamente 8 kb, que se clonó en el pGEM-T Easy para dar lugar al pSJR30; éste se secuenció por completo y se comparó con la secuencia nucleotídica del sistema de la cepa DI21.

A partir de la alineación de secuencias generada con el programa ClustalW, se determinó el porcentaje de similitud entre ambas subespecies. Tal y como se puede observar en la Figura IV.24 éste fue muy elevado, de un 97% en las 7.598 posiciones comparadas, lo cual corresponde a 189 diferencias nucleotídicas. En la cepa DI21 existen dos cortas inserciones de 3 y 6 nucleótidos respectivamente que no afectan a las pautas de lectura.

```

CDC2227-81      TTACAGTTTTTTCAGACGGTCTTGGATCTCAGAGCCATCTTTAATTCTGCGATGCCCTTC 60
DI21            TTACAGTTTTTTCAGACGGCTCTTGGATCTCAGAGCCATCTTTAATTCTGCGCATGTCCTTC 60
*****

CDC2227-81      TGTTAAGTGGACAAAATCAATCAGATCATCACCCTCACTTGAATGCTTTACCAAAGCC 120
DI21            TGTTAAGTGGACAAAATCAATCAGATCATCGCCCTCACTTGAATGCTTTACCAAAGCC 120
*****

CDC2227-81      TTTTACAAACAGGCCGTGTGTTGGCTTAAGTCGAAATAATACAAAATCCTCTAAGCCGCT 180
DI21            TTTTACAAACAGGCCGTGTGTTGGCTTAAGTCGAAATAATACAAAATCCTCTAAGCCGCT 180
*****

CDC2227-81      GAGCCCTTCAACAATCTCGCCAAAACGGTTAGTTAGACCATCAATAGCTATAAGCCATGC 240
DI21            GAGCCCTTCAACAATCTCGCCAAAACGATGAGTTAGACCATCAATAGCTAACAGCCATGC 240
*****

CDC2227-81      AGCAGATTCTCTTTTCGACTTTTTCAACATCTGCTTCAAAAGTCAAACGCTTGCGCGCATA 300
DI21            AGCAGATTCTCTTTTCGACTTTTTCAACATCTGCTTCAAAAGTCAAACGCTTACGCGCATA 300
*****

CDC2227-81      TAAACCTTAGCTGTCTTTTCATCTTCGATCATCATAAGAGAGACGCGGGGATTTTCTAA 360
DI21            TAAACCTTAGCTGTCTTTTCATCTTCGATCATCATAAGAGAGACGAGGATTTTCTAA 360
*****

CDC2227-81      TAAGTTACGCGCATGCTTTGCAATTTGGCTAATCAATACATAATAGCCGTCTTCTAATAA 420
DI21            TAAGTTACGCGCATGCTTTGCAATTTGGCTAATCAATACGTAATAGCCATCTTCTAATAA 420
*****

CDC2227-81      TACAAATGGAGCATAAATTATGTTGGGTTGACCGCTATTATCAACCGTTGCTAATTGAAG 480
DI21            TACAAATGGAGCATAAATTACGTTAGGTTGACCACTATTATCAACCGTTGCTAATTGAAG 480
*****

CDC2227-81      CGTTAAACAACGTGCACGAAATCTTTGATTCTGTTCCAGTCGACTTTGAAGGCGTTC 540
DI21            CGTTAAACAACGTGCACGAAATCTTTGATTCTGTTCCAGTCGACTTTGAAGGCGTTC 540
*****

CDC2227-81      TTGCTTTACTTGATTCAATACGAATCTTCTCCTAATTGTTTTAGTTTTTAACATCTCA 600
DI21            TTGCTTTACTTGATTCAATACGAATCTTCTCCTAATTGTTTTAGTTTTTAACATCTCA 600
*****

CDC2227-81      ATTTGTTGCGGAAAGAGTTGTGCTTTTATCTCGCCCTAAATAAACTTTAAATACACAC 660
DI21            ATTTGTTGCGGAAAGAGTTGTGCTTTTATCTCGCCCTAAATAAACTTTAAATACACAC 660
*****

CDC2227-81      TCTCCTTGAGCTGCAAAAAAGCCAATAAAGTAACCTTTGCCCCATAAAAGGTTTACTA 720
DI21            TCCCTTGAGCTGCAAAAAAGCCAATAAAGTAACCTTTGCCCCATAAAAGGTTTACTA 720
** *****

CDC2227-81      ACAAGCGCAATATCAGAGACCAAACTAAACGTAATGACCATGAAGCTCACCATCACGT 780
DI21            ACAAGCGCAATATCAGAGACCAAACTAAAGCGTAATGACCATGAAGCTCACCGTACGT 780
*****

CDC2227-81      CCCATCAAATTATAGTAGCCACGCGCTTCTTTACCTTTTGAAACGGCGCTTTTACCTCA 840
DI21            CCCATCAAATTATAGTAGCCACGCGCTTCTTTACCTTTTGAAACGGCGCTTTTACCTCA 840
*****

CDC2227-81      AAGATAGAGCCCATGAATGGACAATCGTTGTAACGGCCCCACTGTGGCAATTGTTCA 900
DI21            AAGATAGAGCCCATGAATGGACAATCGTTGTAACGGCCCCACTGTGGCAATTGTTCA 900
*****

```


CDC2227-81 DI21	AGAATAGACTGAGCTAACTTGCCAGGAAGATGGCTGACCATAGATTCAGGAAACGATAAA 960 AGAATAGACTGAGCTAACTTGCCAGGAAGATGGCTGACCATAGATTCAGGAAATGATAAA 960 *****
CDC2227-81 DI21	ACCACTTCACCTTCTGTCACTTTAAGTTGCTCTGCTAAGCTCATGGCATGTAAAGCAGGA 1020 ACCACTTCACCTTCTGTCACTTTAAGTTGCTCTGCTAAGCTCATGGCATGTAAAGCAGGA 1020 *****
CDC2227-81 DI21	TCTTGTTCAGTAATTGCGCCACTTGTGTTTTAGTTCTTGTGGGTAATAGTAGAAAAC 1080 TCTTGTTCAGTAATTGCGCCACTTGTGTTTTAGTTCTTGTGGGTAATAGTAGAAAAC 1080 *****
CDC2227-81 DI21	AAGATAACTCTCCCTATGTCTTTGTGATGTAAAGTTTAATAACTGGATTAATAATTAGG 1140 AAGATAACTCTCCCTATGTCTTTGTGATGTAAAGTTTAATAACTGGATTAATAATTAGG 1140 *****
CDC2227-81 DI21	CAGCCAGAGACTGATTCAATTGCTGTGTTATTGCTTCTATTAATGCTTGAGCTAAGGTTA 1200 CAGCCAGAGACTGATTCAATTGCTGTGTTATTGCTTCTATTAATGCTTGAGCTAAGGTTA 1200 *****
CDC2227-81 DI21	CAGCCCAAACTGTCTGCTAACGTTAAAGTGACATAGTGTGAGTTCACCTCAACTAAAC 1260 CAGCCCAAACTGTCTGCTAACGTTAAAGTGACATAGTGTGAGTTCACCTCAACTAAAC 1260 *****
CDC2227-81 DI21	CGTTTTCTCGCCATGCTTTAAACAGAGGTAACAAGAAGATATAGCCCTTTGCCTCCAA 1320 CGTTTTCTCGCCATGCTTTAAACAGAGGTAACAAGAAGATATAGCCCTTTGCCTCCAA 1320 *****
CDC2227-81 DI21	TCGAATCTAGTGAAGATCGGTTAAGTACGCCTCGATCAAACTGGCTTTAATTTGCGCAT 1380 TCGAATCTAGTGAAGATCGGTTAAGTACGCCTCGATCAAACTGGCTTTAATTTGCGCAT 1380 *****
CDC2227-81 DI21	GGAGAGAGGCTTGATTGCTTGTGTTGGTTCATTTGCAATCGGTAATTCGCCACGTTTAA 1440 GAAGAGAGGCTTGATTGCTTGTGTTGGTTCATTTGCAATCGGTAATTCGCCACGTTTAA 1440 * *****
CDC2227-81 DI21	TCGCAGCTAAATAAGCATCTAAAGTACGATGTTGCATCATGCCAAAACCTGCAATATTGC 1500 TCGCAGCTAAATAAGCATCTAAAGTACGATGTTGCATCATGCCAAAACCTGCAATATTGC 1500 *****
CDC2227-81 DI21	CACCAGCACCGGCCCTAGAGGTAAGACTTCTGCTGTAGTTTTTGTAGGCTGTTATATA 1560 CACCAGCACCTGCCCTAGAGGTAAGACTTCTGCTGTAGTTTTTGTAGGCTGTTATATA 1560 *****
CDC2227-81 DI21	AGCTTCGCTCTCGATTATCAGAGCCCAATGATTTACACTGAGTTTGCGCATATGATGAT 1620 AACTACGCTCTCGATTATCTCGAGCCCAATGATTTACACTGAGTTTGCGCATATGATGAT 1620 * * *****
CDC2227-81 DI21	GGCTCATGTAATCGTGTCCCATCAAAAACATGGTCGCTTTTGTGTTGTATCAGCAGGTT 1680 GACTCATGTAATCATGCCCATCAAAAACATGGTCGCTTTTGTGTTGTATCAGCAGGTT 1680 * *****
CDC2227-81 DI21	CAGGGAGCTTTCTTTATCAATAAGGTTTTTCATTGGAGTCCCACCCATTTCAATCAACT 1740 CAGGGAGCTTACCTTTATCAATAAGGTTTTTCATTGGAGTCCCACCCATTTCAATCAACT 1740 *****
CDC2227-81 DI21	GATAGAGATC- - - -TACACCATGAGCGCCTGAGGCCCTGAAATCTTCTAGGTCTTGTT 1794 GATAAAGATCAACACCTACACCATGAGCGCCTGAGGCCATAAAATCTTCTAGGTCTTGTT 1800 *** * *****
CDC2227-81 DI21	GCCACACATCTAAAGTCTGATAGGGCAGTCCGTATAACAGATCAATAACGATCGGAGCTT 1854 GCCACACATCTAAAGTCTGATAAGGCAGTCCATATAACAGATCAATAACGATCGGAGCTT 1860 *****
CDC2227-81 DI21	GATCTGTGCGCAGCCAGAGCAGCAACGCGATCGAGTACTACCTCTCGATCATCTAAACGCT 1914 GATCTGTGCGCAGCCAGAGCAGCAACGCGATCGAGTACTACCTCTCGATCATCTAAACGCT 1920 *****
CDC2227-81 DI21	TAGCTTTACGTCTTACTTGAGTATCAAAACTCTGAACACCAAAAGAGAAACGGTTAAATC 1974 TAGCTTTACGTCTTACTTGAGTATCAAAACTCTGAACACCAAAAGAGAAACGGTTAAATC 1980 *****
CDC2227-81 DI21	CCCCTTCTAATGCAGAATCAAACATTTTCATCACTGAATCGATTAACACGACCTTCAAGCG 2034 CCCCTTCTAATGCAGAATCAAACATTTTCATCACTGAATCGATTAATACGACCTTCAAGCG 2040 *****

CDC2227-81 DI21	TTAATTCACAATCGGTAGTCAGTGGAAAATGTTTGCGAATCATCGTTCCTAATTGTTTAA TTAATTCGCAATCGGTAGTGAGTGGAAAATGTTTGCGAATCATCGTTCCTAATTGTTTAA *****	2094 2100
CDC2227-81 DI21	CTTGCTGTGCGGTTAAATCGGTTGGCGTACCACCACCAATATAGACAGCATGAAACGGTG CTTGCTGTGCGGTTAAATCGGTTGGCGTACCACCACCAATATAGACAGCATGAAACGGTG *****	2154 2160
CDC2227-81 DI21	CTGATTGGGTCCATGGCTGCTGTGCTTTTAAATTCAGCTCAATCATCAAAGCGGCAAAAT CTGATTGGGTCCATGGCTGCTGTGCTTTTAAATTCAGCTCAATCATCAATGCAGCAAAAT *****	2214 2220
CDC2227-81 DI21	AATCATCGATAAGTTGTTGGCTTGATGCGTATGGGAAGAAATTGCAGTAAGTACAGCGTA AATCATCGATAAGTTGTTGGCTTGATGCGTATGGGAAGAAATTGCAGTAAGTACAGCGTA *****	2274 2280
CDC2227-81 DI21	CTCGACAAAATGGGATATGCACATAAAGGCAACGTTTTTGGACTTGGCTATAAGGTTCTA CTCGACAAAATGGGATATGCACATAAAGGCAACGTTTTTGGACTTGGCTATAAGGTTCTA *****	2334 2340
CDC2227-81 DI21	GCGATCTTTTTTCTCCTACTAAGTAAAGATAATCCTAAAGATTGGTGTGCTCAGCAG GAGATCCTTTTTTCTCCTCGCAAGTAAAGATAATCCTAAAGATTGGTGTGCTCAGCTG *****	2394 2400
CDC2227-81 DI21	GAACCATTTGATTACATACCACCTGCATGTGCAGATTTCTTGCGACTAAAAGCAAACGAA GAACCACTGCATTACATACCACCTGCATGTGCAGATTTCTTGCGACTAAAAGCAAACGAA *****	2454 2460
CDC2227-81 DI21	GAGGGTCTGGAGAATGCAAACCCAAAACACTTTTCATCTAATTTATTTATATCTATCTGGT GAGAGTCTGGAGAATGCAAACCCAAAATACTTTTCATCTAATTTATTTATATCTATCTGGT ***	2514 2520
CDC2227-81 DI21	GTTCTTGATTCATTGAAATCTAGTCTTTAAAAGCCCTTACCCATCAGCCATGATTCCCT GTTCTTGATTCATTGAAATCTAGTCTTTAAAAGCCCTTACCCATCAGCCATGATTCCCT *****	2574 2580
CDC2227-81 DI21	ATTATTGAATATGCTTAGTGATCATTAGCTGCCCTCAATATCTTCTTTATCTCGACTAT ATTATTGAATATGCTTAGTGATCATTAGCTGCCCTCAGTATCTTCTTTATCTCGACTAT *****	2634 2640
CDC2227-81 DI21	CTCGATGACGAACATGTCGTTTTGTATACAAGTCTTTCCTATGCTCTTATTGAGAATGA CTCGATGACGAACATGTCGTTTTGTATACAAGTCTTTCCTATGCTCTTATTGAGAATGA *****	2694 2700
CDC2227-81 DI21	CTCTTAATTCGCTGCATAATAGTTTCGCCTGAATAATATTGCAAATGATAATTGATATTA CTCTTAATTCGCTGCATGATAGTTTCGCCTGAATAATATTGCAAATGATAATTGATATTA *****	2754 2760
CDC2227-81 DI21	TTTTCATCTTATGGATAATGATAACGATTCTTAATCAATGGCGATGCTTGTTTATACTAT TTTTCATCTTATGGATAATGATAACGATTCTTAATCAATGGTGATGCTCGTTTATACCA *****	2814 2820
CDC2227-81 DI21	AACAGAATAAAACAGTGTAACCAATAATCTTAATTCATCACAGATTATTATCACCATTA AACAGAATAAAACAGTGTAACCAATAAGCTTAATTAACCTTGATTATTACCATTATTA *****	2874 2880
CDC2227-81 DI21	ATCGCTATTTTTAACTTTTATGAATAACGTTGCTTTATTAGGTCATCAGATGGATACGAC ATCGCTATTTTTAACTTTTATGAACAACGTTGCTTTATTAGGTCATCAGATGGATACGAC *****	2934 2940
CDC2227-81 DI21	AAGATATGTAATAGCAGGTGCAGTTTCAGTCATTATTTCATGGTTTGATTCTCTCTGCTGT AAGATATGTAATAGCAGGTGCAGTTTCAGTCATTATTTCATGGTTTGATTCTCTCTGCTGT *****	2994 3000
CDC2227-81 DI21	GCCAAGCCAAAACGCAATAGCAATGCCAATAGGTAATCAAATAGCGCCCGTTTCTTTAA GCCAAGCCAAAACGCAATAGCAATGCCAATAGGTAATCAAATAGCGCCCGTTTCTTTAA *****	3054 3060
CDC2227-81 DI21	TCTAGTGACGGCACCTATTGCTCCGCCACCACGGCTCAAGATGTTGCAAAAGCAGAAGT TCTAGTGACGGCACCTATTGCTCCGCCACCACGGCTCAAGATGTTGCAAAAGCAGAAGT *****	3114 3120
CDC2227-81 DI21	CAAACCGCAAAAATCTGTTAAAAAACACAGCAAATTGAACAAAAACAGCGGTAAAAA CAAACCCCAAAAATCTGTTAAAAAACACAGCAAATTGAACAAAAACAGCGGTAAAAA *****	3174 3180

CDC2227-81 DI21	ACTAGTAAAAAGACGACACCAACAAAGAAAGCGGCTAAGAAAGTAGCGAATAAAACAAC ACTAGTAAAAAGACGACACCAAAAGAAAGCGGCTAAGAAAGTAGCGAATAAAACAAC *****	3234 3240
CDC2227-81 DI21	AAAAACGAAAAAGCGGAGCAAAAGCCGGTAGCAAAAACCGTGATAGCAAGCAAGTAA AAAAACGAAAAAGCGGAGCAACAGCCGTTAGTAAAAACCGTGATGGCAAGCCAGTAA *****	3294 3300
CDC2227-81 DI21	GAGTGCAACTAAACCACAACCTCAGAGCAAGCTGAAAAATGAAACAAGCCAAGTAGCTAA GAGTGCAACTAAACCACAACCTCAGAGCAAGCCGAAAAATCAAACAAGCCAAGTAGTGAA *****	3354 3360
CDC2227-81 DI21	TACCGCTAACAAATAAAAGGCACTGTTATCTAGTGGTACTCAATCTCCTGAATTAGTCAG TACCACTAACAAATAAAAGGCACTGTTATCTAGCGGTACTCAATCCCCTGAATTAGTCAG ****	3414 3420
CDC2227-81 DI21	CCGGCCAACATTTGCCACTCAACCAGGGCCAGTTTCTTACCCAAGATTGGCAAAACGCCG TAGACCAACATTTGCCACTCGACCAGGACCAGTTTCTTACCCAAGATTGGCAAAACGCCG * *****	3474 3480
CDC2227-81 DI21	AGGGATTCAAGGACAGGTAATGGTTGAGATCTGGATTGATCCAAAGGGGAAACAAATTAA AGGGATTCAAGGACAGGTAATGGTTGAGATCTGGATTGATCCAAAGGGGAAACAAATTAA *****	3534 3540
CDC2227-81 DI21	ACAAAAAGTGATCTCATCATCAGGTACAGAGATCCTTGATCAAGCGGCATTAAACAGCCAT GCAAAAAGTGATCTCATCGTCAGGTACAGAGATCCTTGATCAAGCGGCATTAAACAGCCAT *****	3594 3600
CDC2227-81 DI21	TAAGAAGTGGAAGTTTTCTTCACATATCGTTGATGGGCAAGCTATTGCTCACCGCGTTCA TAAGAAGTGGGAGTTTTCTTCACATATCGTTGATGGGCAAGCTATTGCTCACCGCGTTCA *****	3654 3660
CDC2227-81 DI21	TATTCCTGTACGTTTTCAATTGGATTAATTATGGAATTTATCAACCAATATCAAGAACAG TATTCCTGTACGTTTTCAATTGGATTAATTATGGAATTTATCAACCAATATCAAGAACAG *****	3714 3720
CDC2227-81 DI21	TTTGGTCTTATGGCCTGGCCCTTTTCATCTGTTCACTGCTTACCGTCATGATTTTACTT TTTGGTCTTATGGCCTGGCCCTTTTCATCTGTTCACTGCTTACCGTCATGATTTTACTT *****	3774 3780
CDC2227-81 DI21	GAGCGGTTTATTCAAGTTTTACTCTGTACTGGTGTGGTAAAACCAAAATAAATCAAATA GAGCGGTTTATTCAAGTTTTACTCTGTACTGGTGTGGTAGAACCACAAATAAATCAAATA *****	3834 3840
CDC2227-81 DI21	CTCAACAATCAAAATCGCCACGATGAACAAGCATTGGATCATCTGGCTCAGCAATTGCAG CTCAACAATCAAAATCGCCACGATGAACAAGCATTGGATCATCTAGCTCAGCAATTGCAG *****	3894 3900
CDC2227-81 DI21	AATCAGCGCCTCTTCTGTATAAGGGGATCGCAATGCTGATTTACATCGTCATTTTGCT AATCAGCGCCTCTTCTATATAAGGGGATCGCAATGCTGATTTACATCGTCATTTTGCT *****	3954 3960
CDC2227-81 DI21	AAAGCGCTACGTGAAGATGCCGAGGTATGTGGCTACAACAAAAACGAACCTCAATTACGA AAAGCGCTACGTGAAGATGCCGAGGTATGTGGCTACAACAAAAACGAACCTCAATTACGC *****	4014 4020
CDC2227-81 DI21	TCCGGACTCAAGCTCTTAAGTCTTATTGGCGTGATCAGTCCATTACTGGGTTTATTAGGT TCCGGACTCAAGCTCTTAAGTCTTATTGGCGTGATCAGTCCATTACTGGGTTTATTAGGT *****	4074 4080
CDC2227-81 DI21	ACCGTATTGGGTTTGATCGATATGTTTAAAGGCATTGCTATGACCACAGGCTCAGTTACC ACCGTATTAGGTTTGATCGATATGTTTAAAGGCATTGCTATGACCACAGGCTCAGTTACC *****	4134 4140
CDC2227-81 DI21	CCCAATGATCTGGCCGATGGATTAGGTCTTGCGATGCGAACCCTGCGCAGGCTTGATC CCAAATGATCTGGCCGATGGGTTAGGTCTTGCGATGCGAACCCTGCGCAGGCTTAATC ** *****	4194 4200
CDC2227-81 DI21	ATTGCACTGCCAGCTATTACAGGTGCACAACCTGCTCGGACTTTGGGCTGATAGCATTACC ATTGCACTACCAGCATTACAGGTGCACAACCTGCTCGGACTTTGGGCTGATAGCATTACC *****	4254 4260
CDC2227-81 DI21	TCAAACTTGAACACAGTTTAAATCGCTGCAATTTATGGCTTGAAGGGATCTCAGTAACA TCAAACTTGAACACAGTTTAAATCGCTGCAATCTATGGCTGGAAGGGATCTCAGTAACA *****	4314 4320

CDC2227-81 DI21	ACAAATTGTGATAAGCCAGCTCAAGGTGAGGTTCTCTCATGATAACTACAGGAAATAACC ACAACTTGTGATAAGCCAGTTCAAGGTGAGGCTCTCTCATGATAAGCACAGGAAATAGCC *****	4374 4380
CDC2227-81 DI21	GCTGGCAGGACGATGAGTTATCACCAGATCTTACCCCGTTACTCGATATTATTTTTATTG GCTGGCAGGACGATGAGTTATCACCAGATCTTACCCCGTTACTCGATATTATTTTTATTG *****	4434 4440
CDC2227-81 DI21	TAATGGTTTTCTTGTGTTAACAGCAAGCGTAAAAATTAATCGCTGAATGTCGATCTCC TAATGGTTTTCTTGTGTTAACAGCAAGCGTAAAAATTAATCGCTGAATGTCGATCTCC *****	4494 4500
CDC2227-81 DI21	CACAAACAGAAACACAAATACTGCAGACGACTTCAGCCGATCCTATAACCATTAACTAC CACAAACAGAAACACAAATACTGCAGACGACCTCTGCCGATCCTATAACCATTAACTAC *****	4554 4560
CDC2227-81 DI21	TTGCCTCTGAACCTCATTGGGCTCTAGATGGAAATCAACAAAAAGTTGGGAGGCTTTTT TTGCCTCTGAACCTCATTGGGCTCTAGATGGAAATCAACAAAAAGTTGGGAGGCTTTTT *****	4614 4620
CDC2227-81 DI21	CAACAACCTTATTGGACGAAGTTAAAGCAAAACCCATCAAAACCGGTTGTGATTGGGGCTG CAACAACCTTATTGGACGAAGTTAAAGCAAAACCCATCGAAACCGGTTGTGATTGGGGCTG *****	4674 4680
CDC2227-81 DI21	AGAAAACGGCTTCAGTCGAACAAATGTTAAAGCTTTTAGCGTTTCTACAAAAAATGACA AGAAAACGGCTTCAGTCGAACAAATGTTAAAGCTTTTAGCGTTTCTACAAAAAATGAGA *****	4734 4740
CDC2227-81 DI21	TCAAGGCTACTCAATTGCTAATGGAAGAGGATAACAAAGCATGAGTCTAATAAAACCGAGC TCAAGGCTACTCAATTGCTAATGGAAGAGGATAACAAAGCATGAGTCTAATAAAACCGAGC *****	4794 4800
CDC2227-81 DI21	ACCAAGTGTTTAAAACCGTATCTTTAGCTGTTGCTATCCTATTTGGAGCGACGTCAGCTTA ACCAAGTGTTTAAAACCGTATCTTTAGCTGTTGCTATCCTATTTGGAGCGACGTCAGCTTA *****	4854 4860
CDC2227-81 DI21	TGCACAAAACAATGACTCGCGTATTATCAGTGCCGGATCTGCAATTACTGAGATTATCAA TGCACAAAACAATGACTCGCGTATTATCAGTGCCGGATCTGCAATTACTGAGATTATCAA *****	4914 4920
CDC2227-81 DI21	TGCCCTAGATGCCAGCGATCAACTGGTTGCTGTAGACAGTACCAGTCAAGCATTGGTTGA TGCCCTAGATGCCAGCAATCAACTGGTTGCCGTAGACAGTACCAGTCAACATTGGTTGA *****	4974 4980
CDC2227-81 DI21	TACCAAGATGCCTAAAGTTGGCTATCATCGTCAATTATCAGCAGAAAATCTCATGTCACT TACCAAGATGCCTAAAGTTGGCTATCATCGTCAATTATCAGCAGAAAATCTCATGTCACT *****	5034 5040
CDC2227-81 DI21	CACACCAACTCGTATTATTGGTTCAAATGAAATGGGTCCAGAATCGACGCTACCATATT CACACCAACTCGTATTATTGGTTCAAATGAAATGGGTCCAGAATCGACGCTACCATATT *****	5094 5100
CDC2227-81 DI21	GAAACAAGCTGGCGTTGCAAGTCGATATTGTCAACTCAGGAAATACCGTTTCCGACCTTAG GAAACAAGCTGGCGTTGCAAGTCGATATTGTCAACTCAGGAAATACCGTTTCCGACCTTAG *****	5154 5160
CDC2227-81 DI21	TAGGCGAATAGAACAAGTTGCGCAATTAACAGGCCATCAGAAACAAGCTAATAAGTTAAA TAAGCGAATTGAACAAGTTGCGCAATTAACAGGCCATCAGAAACAAGCTAATAAGTTAGA ** ***** *	5214 5220
CDC2227-81 DI21	ACAAACAGTGCAACATACCGTTCAAACATTAACGGATCATCGTTCTCAACTTAAGGAACA ACAAACTGTGCAACATACCGTTCAAACATTAACGGAGCATCGTTCTCAACTTAAGGAACA *****	5274 5280
CDC2227-81 DI21	ACCTAATTTCAAAGAAAAAAGAGTTTTGTTGTGATGATTGATGATGGGAGACCTGTCAA ACCTAATTTCAAAGAAAAAAGTTTTGTTGTGATGATTGATGATGGGAGACCTGTCAA *****	5334 5340
CDC2227-81 DI21	TGTGGCAGGTAAAGGAACAACGGCAGATACCGTTATCAACCTTGCTGGAGCCATAAACCC TGTGGCAGGTAAAGGAACAACGGCAGATACCGTTATCAACCTTGCTGGAGCCATAAACCC *****	5394 5400
CDC2227-81 DI21	GGCTGCTGCATTTGTTGAAAACTATAAACCTATTTCAACAGAAGCCATGCTTCAAATGCA GGCTGCTGCATTTGTTGAAAACTATAAACCTATTTCAACAGAAGCCATGCTTCAAATGCA *****	5454 5460

CDC2227-81 DI21	GCCTGATATCATTTTATTGAGCTCTAGAACC GCGCAACCATCAAAACGATGCCAGATCT 5514 GCCTGATATCATTTTATTGAGCTCTAGAACC GCGCAACCATCAAAACAATGCCAGATCT 5520 *****
CDC2227-81 DI21	AATTAAGAAGATTCCAGTACTAGCCCAACACCCG CAGCGCAAAATAATGCATTAGCTGT 5574 AATTAAGAAGATTCCAGTACTAGCCCAACACCCG CAGCGCAAAATAATGCATTGCTGT 5580 *****
CDC2227-81 DI21	GATAGATGGTACAGCGCTTATTGGTGGTCTCGGTATCCATAGCCTCAACGAAGCGGCTCG 5634 GATAGATGGTACAGCGCTTATTGGTGGTCTCGGTATCCATAGCCTCAACGAAGCGGCTCG 5640 *****
CDC2227-81 DI21	ATTATCAAATGTTTTCTATCCAACGTGAATCAGTAACAGATAACGAAATTTTCAGTAAAA 5694 ATTATCAAATGTTTTCTATCCAACGTGAATCAGTAACAGATAACGAAATTTTCAGTAAAA 5700 *****
CDC2227-81 DI21	TAATTATCATCAGAGGGAGCATCTGATCCCTCTCTTTTCTCCTGTTTATAGTTTGAGTT 5754 TAATTATCATCAGAGGGAGCATCTGATCCCTCTCTTTTCTCCTGTTTATAGTTTGAGTT 5760 *****
CDC2227-81 DI21	TTTATGGGAAATCAACGTTTATCCATCCGCTCCCTCTACCTATTGGCTTTGGCCTTTTA 5814 TTTATGGGAAATCAACGTTTATCCATCCGCTCCCTCTACCTATTGGCTTTGGCCTTTTA 5820 *****
CDC2227-81 DI21	CTACTCGCCATCGTCAGTTCTATTGTTATTGGCCCAATGTCTATTAGCTATAGTGATAGC 5874 CTACTCGCCATCGTCAGTTCTATTGTTATTGGCCCAATGTCTATTAGCTATAGTGATAGC 5880 *****
CDC2227-81 DI21	ATTAAGCCTTACTGCCTTGGCATACCGAACTGCCAAATCATATCAGCTTAGTTATCAAT 5934 ATTAAGCCTTACTGCCTTGGCATACCGAACTGCCAAATCATATCAGCTTAGTTATCAAT 5940 *****
CDC2227-81 DI21	CAGATTCGTCTACCGAGAACTCTGCTCTGTATTATGATTGGAGCAATTCTCGCCATTTGT 5994 CAGATTCGTCTACCGAGAACTCTGCTCTGTATTATGATTGGAGCAATTCTCGCCATTTGT 6000 *****
CDC2227-81 DI21	GGTGCGGTAATGCAGGGGCTATTTTCGTAATCCACTTGCCGATCCCGCCATCATTGGGGTA 6054 GGTGCGGTAATGCAGGGGCTATTTTCGTAATCCACTTGCCGATCCCGCCATCATTGGGGTA 6060 *****
CDC2227-81 DI21	ACAGGTGGTGCAGGGCTTGGTGCTGCGTTAGCGATCATTGTATTGACCTATTGCAACG 6114 ACAGGTGGTGCAGGGCTTGGTGCTGCGTTAGCGATCATTGTATTGACCTATTGCAACG 6120 *****
CDC2227-81 DI21	CAATTTCCACCATTTTAACTTAGGCGCAATCCCTCTGTTTGCCTTTATTGGCGGTGTT 6174 CAATTTCCACCATTTTAACTTAGGCGCAATCCCTCTGTTTGCCTTTATTGGCGGTGTT 6180 *****
CDC2227-81 DI21	ATCAGTACTTTCTTTGTTTATCGTTTAGGTACTGGAACATATGGAACATCGGTGACTGTG 6234 ATCAGTACTTTCTTTGTTTATCGTTTAGGTACTGGAACATATGGAACATCGGTGACTGTG 6240 *****
CDC2227-81 DI21	ATGCTGTTAGCGGGGTGGCAATCTCAGCAATATCAGGCGGGGCTTAGGCTTACTCAAT 6294 ATGCTGTTAGCGGGGTGGCAATCTCAGCTATATCAGGTGCGGGCTTAGGCTTACTCAAT 6300 *****
CDC2227-81 DI21	TATGTTGCCGACGATCAAGCGCTTCGTGATTTCTTTTATGGTCAATGGGTTTCATTGGCT 6354 TATGTTGCCGACGATCAAGCGCTTCGTGATTTCTTTTATGGTCAATGGGTTTCATTGGCT 6360 *****
CDC2227-81 DI21	GGTGAACGTGGTCAGGGATCGCTCTAGCAACCGTATCTTTTGTGCACTGTTTTCTTT 6414 GGTGAACGTGGTCAGGGATCGCTCTAGCAACCGTATCTTTTGTGCACTGTTTTCTTT 6420 ** *****
CDC2227-81 DI21	TTCTATCGTAAAGCCAATGCGCTCAATGCTTTTTTATTGGGTGAATCAGAAGCCAAACAT 6474 TTCTATCGTAAAGCCAATGCGCTCAATGCTTTTTTATTGGGTGAATCAGAAGCCAAACAT 6480 *****
CDC2227-81 DI21	ATGGGCGTAAATGTCCAACGCCTTAAAAAACAGTTAATCATTACTTGTGCTGCAGGTGTT 6534 ATGGGCGTAAATGTCCAACGCCTTAAAAAACAGTTAATCATTACTTGTGCTGCAGGTGTT 6540 *****
CDC2227-81 DI21	GGCGTTACCGTGCTACTAACAGGTCCGATAGGGTTTATTGGCCTTATTATTCCTCATTTG 6594 GGCGTTACCGTGCTACTAACAGGTCCGATAGGGTTTATTGGCCTTATTATTCCTCATCTG 6600 *****

CDC2227-81 DI21	GGACGAATGCTAATTGGACCAAACCATAAAAACTTAATTCCGGTATCAGCCCTATTAGGC 6654 GGACGAATGCTAATTGGACCAAACCATAAAAACTTAATTCCGGTATCAGCCCTATTAGGC 6660 *****
CDC2227-81 DI21	GCCTTCATTTTGTACTTGCGATATGATTGCTCGTACCGCTTTTGCTCCTCAAGAGTTA 6714 GCCTTCATTTTGTACTTGCGATATGATTGCTCGTACCGCTTTTGCTCCTCAAGAGTTA 6720 *****
CDC2227-81 DI21	CCTGTTGGTATTATCACTGCCATCATCGGTGCTCCCTTCTTTATTATGTTATTGATCCAG 6774 CCAGTTGGTATTATCACTGCCATCATCGGTGCTCCCTTCTTTATTATGTTATTGATCCAG 6780 ** *****
CDC2227-81 DI21	CAAAAAGGACGTATGGCATGA--GCAGCACACTATCCTCTCATCACGCAATAGCACTAA 6831 CAAAAAGGACGTATGGCATGATGAGCAGCACACTATCCTCTCATAACGTAATAGCACTAA 6840 *****
CDC2227-81 DI21	AAGCATCTAACCTTCACTTGCGAGTGGGCGGAAAAACCTTACTGGATAATGTTGATTTAG 6891 AAGCTTCTAACCTTCACTTGCGAGTGGGCGGAAAGACCTTACTAGATAATGTTGATTTAG 6900 *** *****
CDC2227-81 DI21	AAATAATGTCTGGGCAAATAACGGCGCTGTTAGGGCCAAATGGTGCCGGTAAAAGTAGTC 6951 AAATAAGGTCTGGGCAAATAACCGCGCTGTTAGGTCCAAATGGCGCCGGTAAAAGTAGTC 6960 *****
CDC2227-81 DI21	TACTGAAGGTATTAACGGTGAAATAAAGCCAAATTCAGGATCAATTGAGATCTTTTCAA 7011 TATTGAAGGTATTAACGGTGAAATAAAGCCAAATTCAGGATCGATTGAGATCTTTTCAA 7020 ** *****
CDC2227-81 DI21	GACCTAAAGATCATTGGCCATCTGAATTATTAGCCAAACACATGGGTATATTGCCGCAGC 7071 GCCCAAAGATCATTGGCCATCTGAATTATTGGCAAACACATGGGTATATTGCCGCAGC 7080 * * *****
CDC2227-81 DI21	ATAGTACCCTATCGTTCTCATTTCTTGCTCATGAAGTTGCAGAGCTCGGTGCGATGCCTT 7131 ACAGTACCCTATCGTTCTCATTTCTTGCTCATGAAGTTGCAGAGCTTGGTGCGATGCCTT 7140 * *****
CDC2227-81 DI21	TAGCGATATCAAATCATCAAGCACAACAACCTCGCGGCTAAGAATATGGTTAAAGTTGGTG 7191 TAGCAATATCAAATCATCAAGCGCAACAACCTCGCGGCTAAGAATATGGTTAAAGTTGGTG 7200 *** *****
CDC2227-81 DI21	TTGATCATCTCGCAACAGGCTATATCCAACCTTTATCTGGTGGAGAAAAACAGCGCGTTC 7251 TAGATCATCTCGCAACAGGCTTTATCCAACGCTATCTGGCGGGGAAAAACAACGCGTTC 7260 * *****
CDC2227-81 DI21	ATTTTGCCAGAGTATTAACCTCAGTTATCGCACTCTGGCAAACAATGTATTTTAATGCTTG 7311 ATTTTGCCAGAGTATTAACCCAGTTATCGCACTCTGGCGAAACAATGTATTTTAATGCTTG 7320 *****
CDC2227-81 DI21	ATGAACCCACATCCGCCCTTGATCTTGCTCATCAACATCATACTTTAGAGATTGCAACAAG 7371 ATGAACCCACATCTGCTCTTGATCTTGCTCATCAACATCATACTTTAGAGATTGCAACAAG 7380 *****
CDC2227-81 DI21	CGCTTTCGCAACAGGGTGCTGCCGTTATCATTGTTATTCATGATCTGAACCTTAGCTGCTC 7431 CGCTTTCGCAACAGGGTGCTGCCGTTATCATTGTTATTCATGATCTGAACCTTAGCCGCTC 7440 *****
CDC2227-81 DI21	AATATGCGGATCGTTTAATCATTTTGAACCAAGGCAAAATTCAGCTGATGGTACGCCAT 7491 AATATGCGGATCGTTTGATCATTTTGAACCAAGGCAAAATTCAGCTGATGGTACGCCAT 7500 *****
CDC2227-81 DI21	GGCAAGTGCTAACCCCAACCGCAGTCGAAAATGTTTACGGCTGGCCAGTTCAAGTTATCG 7551 GGCAAGTACTAACCCCAACCGCAGTCGAAAATGTTTACGGCTGGCCAGTTCAAGTTATCG 7560 *****
CDC2227-81 DI21	CTCATCCAGAACATAACTACCGGTTATTTTGGCTTAA 7589 CTCATCCAGAACATAACTACCGGTTATTTTGGCTTAA 7598 *****

Figura IV.24.- Alineamiento de la secuencia nucleotídica de los genes del sistema de captación de grupos hemo de *P. damsela* subsp. *damsela* CDC2227-81 y *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21.

4.3.1.3. Presencia de los genes de captación de grupos hemo en distintas cepas de *P. damsela*

Con el propósito de comprobar la presencia o ausencia de los 9 genes pertenecientes al sistema de captación de hemina de *P. damsela* se llevó a cabo un análisis por PCR, utilizando como DNA molde la mayor parte de las cepas de las que se disponía de ambas subespecies de *P. damsela* (Tablas II.1 y II.2). Se utilizaron dos parejas de cebadores, una para comprobar la presencia del operón *tonBexbBexbDhutBCD* y la otra para el *hutWXZ*. En ambos casos se produjo amplificación de los fragmentos esperados en el 100% de las cepas (Figuras IV.25 y IV.26). Esto demuestra que el cluster de genes de transporte de hemo está presente en todas las cepas de las dos subespecies de *P. damsela*.

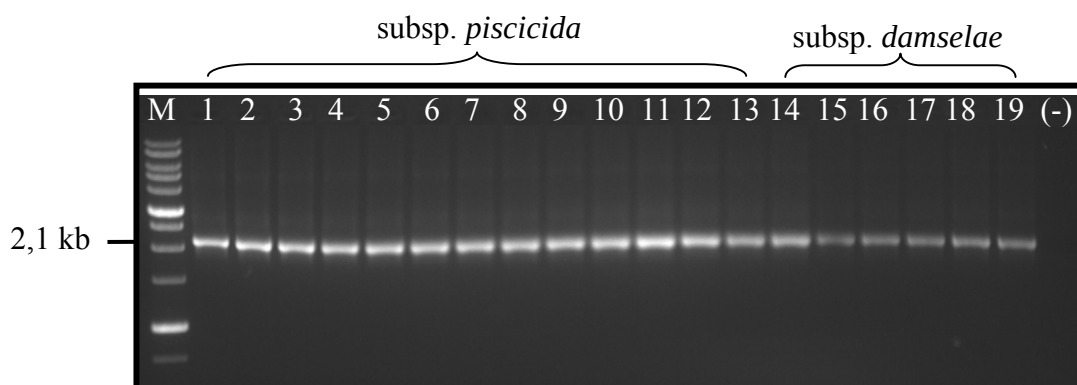


Figura IV.25.-Resultado de la amplificación por PCR de parte de los genes *tonBexbBexbDhutBCD* en las cepas DI21 (1), B51 (2), ATCC 17911 (3), ATCC 29690 (4), 666.1 (5), 1083.1 (6), IT-2 (7), 069A(8), ATIT-2 (9), Lgr52/02 (10), MP7801 (11), EPOY 8803-II (12) y MZS8001 (13) de *P. damsela* subsp. *piscicida* y RG-91 (14), RM 71(15), CDC2227-81(16) ATCC 33539 (17), LD-07 (18) y ATCC 35083 (19) de *P. damsela* subsp. *damsela*. M es el marcador de peso molecular, y (-) el control negativo.

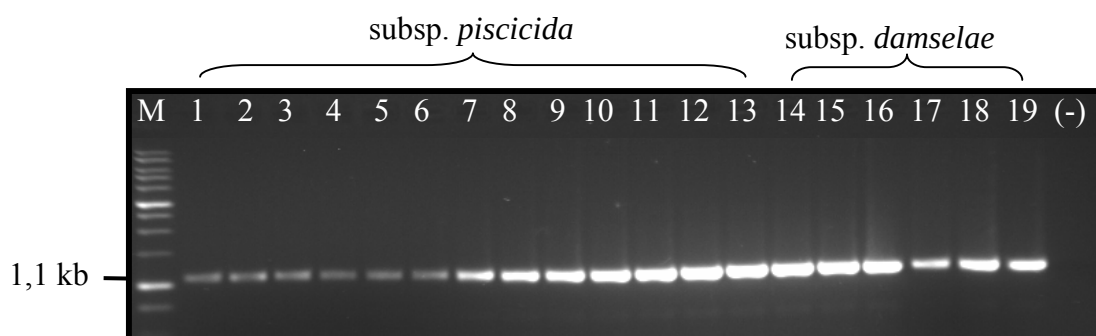


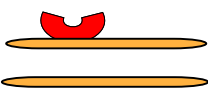
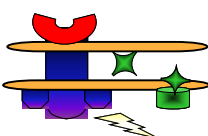
Figura IV.26.-Resultado de la amplificación por PCR de parte de los genes *hutWXZ* en las cepas DI21 (1), B51 (2), ATCC 17911 (3), ATCC 29690 (4), 666.1 (5), 1083.1 (6), IT-2 (7), 069A(8), ATIT-2 (9), Lgr52/02 (10), MP7801 (11), EPOY 8803-II (12) y MZS8001 (13) de *P. damsela* subsp. *piscicida* y RG-91 (14), RM 71(15), CDC2227-81(16) ATCC 33539 (17), LD-07 (18) y ATCC 35083 (19) de *P. damsela* subsp. *damsela*. M es el marcador de peso molecular, y (-) el control negativo.

4.3.2. Análisis funcional del sistema de transporte de hemo de *P. damsela*

4.3.2.1. Análisis del sistema híbrido de captación de hemo *V. anguillarum*-*P. damsela* en *E. coli*

La cepa de *E. coli* 101 ESD $\Delta(entC-entA)$, presenta una delección de los genes *entC-entA* que la imposibilita para crecer en un medio con el hierro quelado. Sin embargo, esta cepa sí es capaz de utilizar hemina añadida al medio de cultivo, si se le proporciona un sistema genético para la captación de ésta. La cepa generada por complementación de *E. coli* 101 ESD con el plásmido pSJR24, se denominó CS7. La cepa con los plásmidos conteniendo el gen *huvA* (pCAR121) y el resto del sistema de captación de hemina de *P. damsela* (pSJR24) se conservó como CS9. Para comprobar qué combinaciones de genes otorgaban a *E. coli* 101 ESD la capacidad de captar hemina y hemoglobina del medio extracelular y utilizarla como fuente de hierro, se realizó un análisis de crecimiento en sobrecapa de agarosa como se describió anteriormente (Tabla IV.2).

Tabla IV.2.-Complementación de la cepa de *E. coli* 101 ESD con plásmidos portando distintas combinaciones de los genes implicados en la captación de hemina:  Receptor HuvA (*V. anguillarum*);  HutX y HutZ;  Proteína periplásmica de unión de hemina: HutB;  Transducción de energía al receptor: TonB, ExbB y ExbD y  Transportador ABC: HutC y HutD. En la columna de resultados se refleja sólo el del crecimiento con hemina, al ser igual al del crecimiento con hemoglobina. Los plásmidos contenidos en cada cepa se indican entre paréntesis.

Cepa	Genes	Características	Resultado
CS6 (pCAR 121)	<i>huvA</i> (<i>V. anguillarum</i>)		 -
CS7 (pSJR24)	<i>tonB-exbB-exbD-hutB-hutC-hutD-hutW-hutX-hutZ</i> (<i>P. damsela</i>)		 -
CS9 (pCAR 121, pSJR24))	<i>HuvA</i> (<i>V. anguillarum</i>)+ <i>tonB-exbB-exbD-hutB-hutC-hutD-hutW-hutX-hutZ</i> (<i>P. damsela</i>)		 +

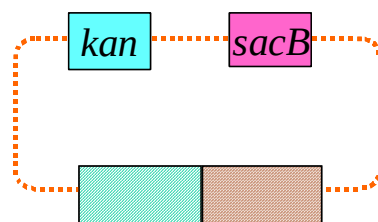
Como se refleja en la Tabla IV.2, la única cepa capaz de desarrollar un halo de crecimiento en estas condiciones es la cepa CS9. Los resultados demuestran por tanto, que la cepa de *E. coli* 101 ESD es capaz de utilizar hemina y hemoglobina como fuente de hierro en placas de medio de cultivo mínimo CM9 con 2,2'-dipyridyl y hemina o hemoglobina, cuando está complementada con el plásmido pSJR24 y pCAR121 simultáneamente, pero no si cuenta únicamente con uno de los dos. Dado que el papel de HuvA de *V. anguillarum* como transportador de hemo ya se había demostrado (Mazoy *et al.*, 2003; Mouriño *et al.*, 2004), estos resultados demuestran que los genes *tonBexbBDhutBCD-hutZXW* (clonados en el pSJR24) forman parte de un sistema de transporte de hemina capaz de transportar dicha molécula al menos desde el periplasma hasta el interior celular.

4.3.2.2. Estudio del mutante del sistema de transporte ABC de *P. damsela* subsp. *piscicida*

Para evaluar la importancia del sistema de transporte ABC en la utilización de hemina en *P. damsela* subsp. *piscicida*, se procedió a la construcción de un mutante por inserción en el gen *hutB*, que inactivará así la transcripción del operón génico a partir de este punto, impidiendo la formación del RNA mensajero que daría lugar a la traducción de las proteínas HutC y HutD.

En primer lugar se llevó a cabo la construcción del plásmido pNid-Kan con los dos insertos *delhutb1-2* y *delhutb3-4* para dar lugar al pSJR19, que se transformó en la cepa de *E. coli* S17-1 λ pir (Figura IV.27).

Figura IV.27.-pSJR29: Plásmido suicida pNid-Kan con la construcción realizada para obtener un mutante del gen *hutB*.



Tras transferir el pSJR19 por conjugación a la cepa DI21 resistente a la rifampicina, se analizaron por PCR diferentes colonias para detectar alguna en la que se hubiese producido el primer evento de recombinación. Éste consistía en la recombinación de uno de los dos fragmentos clonados en el pSJR19 (*delhutb1-2* ó *delhutb 3-4*), con su región homóloga en el cromosoma, de modo que el plásmido

quedaría integrado dentro del cromosoma bacteriano y, como consecuencia del proceso, se formarían una de las dos posibles estructuras descritas en la Figura IV.28.

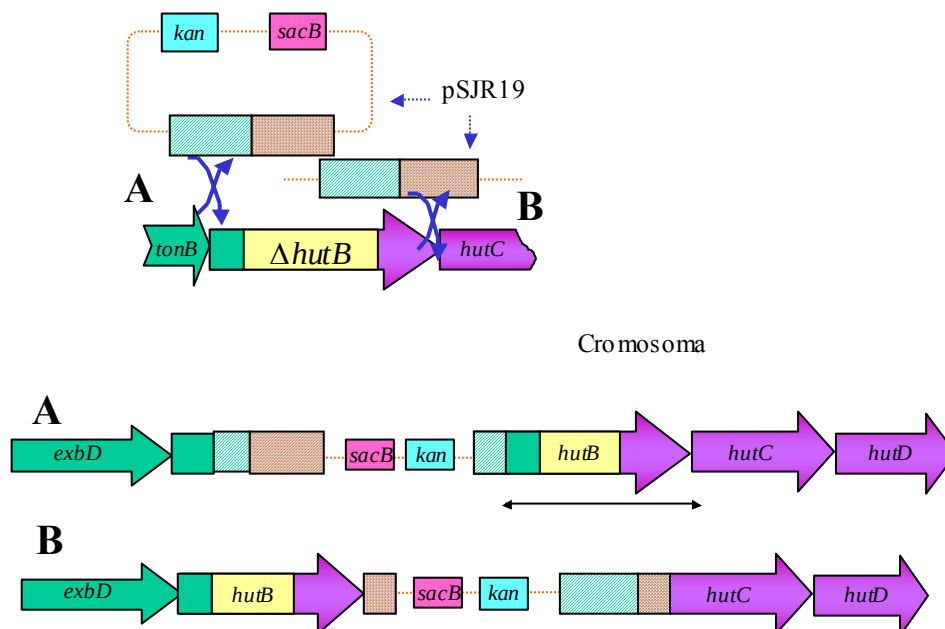
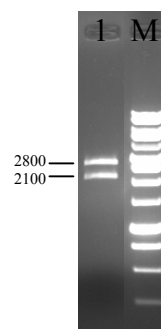


Figura IV.28.-Esquema de los dos posibles eventos de recombinación (A y B) que tendrían lugar entre el plásmido pSJR19 y el DNA cromossômico de la cepa DI21 dependiendo de que el punto de recombinación se produjera en el fragmento 1-2 ó en el fragmento 3-4 de la versión mutada del gen, contenida en pSJR19.

Se detectó un clon positivo para la primera recombinación tras el análisis por PCR, es decir, un clon de la cepa DI21, que tenía integrado en su cromosoma el pSJR19 en alguno de los dos casos (A ó B). Así, se obtuvieron dos productos de amplificación; uno de 2800 pb correspondiente a la amplificación del fragmento del cromosoma flanqueado por los cebadores delhutB-1 y delhutB-4, y el otro de 2100 pb, resultado de la amplificación del segmento delhutB 1-4 clonado en el pSJR19, y ahora integrado en el cromosoma de la bacteria (Figura IV.29).

Figura IV.29.-Análisis por PCR realizado para localizar un clon de la cepa DI21 en el que hubiera tenido lugar el primer evento de recombinación.



El clon positivo se conservó con el nombre de CS27, y como ya se describió, con él se trató de obtener el segundo evento de recombinación, en el cual el plásmido se debería escindir del cromosoma de la bacteria dejando en éste la construcción descrita en la Figura IV.30.

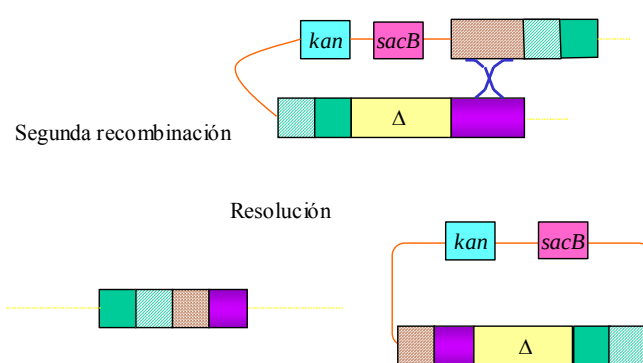


Figura IV.30.-Esquema del resultado del segundo evento de recombinación que se debería producir en el mutante CS27.

Así, las colonias en las que se hubiera llevado a cabo la segunda recombinación, perderían el plásmido, y serían las que crecerían únicamente en el medio con rifampicina, pero serían sensibles a la kanamicina.

Dado que resultó imposible obtener un clon en el que hubiera tenido lugar este segundo evento de recombinación, se procedió a comprobar en cuál de los dos casos descritos en la Figura IV.28 se encontraba el mutante en el que se había ya demostrado la primera recombinación (CS27). Para ello se realizó el análisis por RT-PCR descrito en los materiales y métodos de este capítulo, obteniendo el resultado que se muestra en la Figura IV.31.

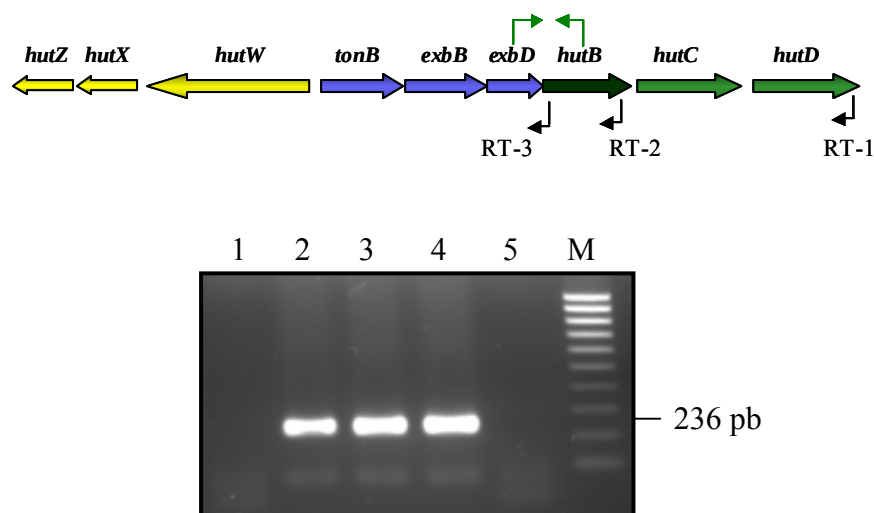


Figura IV.31.-Análisis transcripcional del mutante CS27. Se realizaron PCRs con los cebadores lacZ*hutB*5'1 y *exbD*-*expr*-3' que se indican con las flechas ►◄ utilizando como molde los cDNAs RT-1 (1), RT-2 (2) y RT-3 (3) (ver materiales y métodos). La línea 4 es el control positivo y la 5 el negativo de la PCR. M es el marcador de peso molecular.

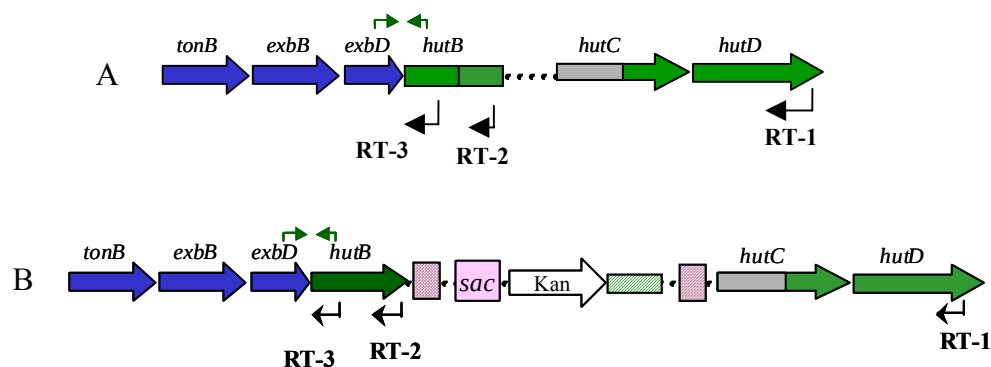


Figura IV.32.-Deducción por RT-PCR de la distribución de los genes *hutBCD* en el genoma de la cepa CS27 tras el primer evento de recombinación. A. Se interrumpe la transcripción de *hutBCD*. B. Se interrumpe la transcripción de *hutCD* pero *hutB* se transcribe.

A la vista de los resultados (Figura IV.31), se deduce que la conformación del mutante de la cepa CS27, es la descrita en la Figura IV.32-B. Como las PCRs 2 y 3 resultaron ser positivas en la cepa CS27, se estaría transcribiendo *hutB*, mientras que la transcripción de *hutC* y *hutD* quedaría interrumpida. No se estarían sintetizando las proteínas HutC y HutD, es decir, lo que se consiguió es crear un mutante del transportador ABC.

Análisis funcional del mutante

El siguiente experimento a realizar tuvo el objetivo de comprobar si la cepa mutante CS27 estaba o no afectada en la captación de hemina, al carecer en principio de unas proteínas supuestamente necesarias para introducirla en el interior celular.

A. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 2,2'-dipyridyl

Para simular las condiciones de limitación de hierro características de los organismos hospedadores, fue necesario determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 2,2'-dipyridyl. Así pues se midió el crecimiento (DO_{600}) de las cepas DI21 (salvaje) y CS27 (mutante del sistema de transporte ABC) después de 12 h de cultivo en concentraciones crecientes del quelante. Los resultados se reflejan en la Figura IV.33.

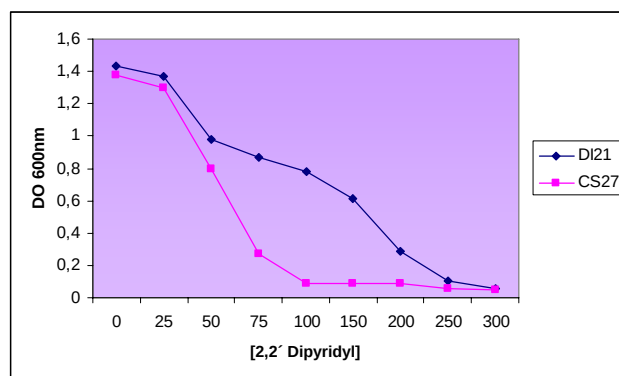


Figura IV.33.-Determinación de la CMI de 2,2'-dipyridyl en medio CM9 complementado con hemina 10 μ M de las cepas DI21 y CS27. En el eje de abscisas figuran las absorbancias registradas a 600 nm, y en el de ordenadas las concentraciones (μ M) de 2,2'-dipyridyl utilizadas.

Se observó un claro descenso del crecimiento de la bacteria en ambos casos cuando se le añadió el quelante 2,2'-dipyridyl. En el caso de la cepa salvaje el crecimiento comenzó a descender poco a poco a partir de una concentración de alrededor de 50 μ M de 2,2'-dipyridyl, mientras que en la cepa mutante cayó bruscamente a partir esta concentración. Esto nos confirma la capacidad ya conocida de la cepa DI21 para utilizar hemina como fuente de hierro en ausencia de éste. Por otro lado, se demuestra que el mutante CS27 está de alguna forma afectado en la captación de hemina del medio.

B. Análisis de la capacidad de captación de hemina de la cepa mutante CS27

A la vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior, se decidió tomar como CMI de 2,2'-dipyridyl la concentración 75 μM para realizar los experimentos de análisis de la capacidad de captación de hemina de la cepa mutante CS27. Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras IV.34 y IV.35.

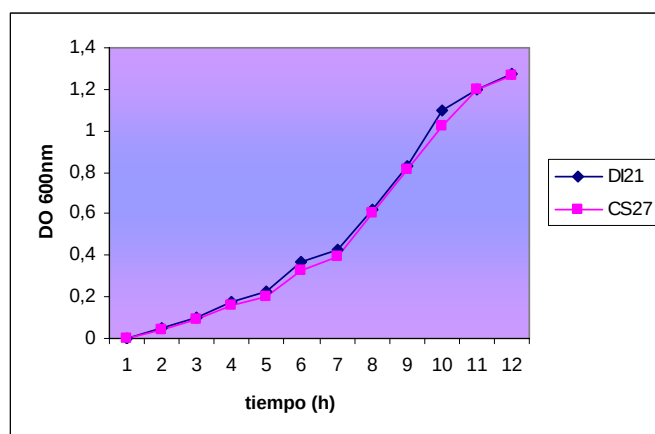


Figura IV.34.-Curva de crecimiento de las cepas DI21 y CS27 en medio CM9 con hemina 10 μM . En el eje de abscisas figuran las absorbancias registradas a 600 nm, y en el de ordenadas el tiempo en horas.

Como se observa en la Figura IV.34, en ausencia de 2,2'-dipyridyl, tanto la cepa salvaje (DI21) como la mutante (CS27) son capaces de crecer en medio mínimo CM9 con hemina sin que se observe ninguna diferencia entre ambas en las curvas de crecimiento.

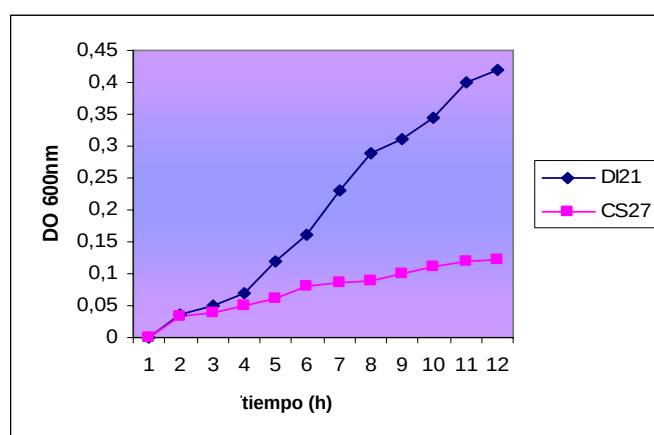


Figura IV.35.-Curva de crecimiento de las cepas DI21 y CS27 en medio CM9 con hemina 10 μM y 2,2' dipyridyl a una concentración final de 75 μM . En el eje de abscisas figuran las absorbancias registradas a 600 nm, y en el de ordenadas el tiempo en horas.

Sin embargo, cuando se añadió al medio el quelante a una concentración de 75 μ M, la cepa CS27 prácticamente no fue capaz de crecer, mientras que la cepa DI21 es capaz de seguir creciendo, si bien a una tasa mucho menor (Figura IV.35). Estos resultados, nos demuestran que el sistema de transporte ABC está implicado en la utilización de hemina del medio como fuente de hierro en *P. damsela* subsp. *piscicida*.

4.3.3. Caracterización del receptor responsable de la captación de hemo del medio extracelular de *P. damsela*

4.3.3.1. Identificación del receptor en *P. damsela* subsp. *damsela*

El producto de PCR resultante de la PCR inversa realizada para tratar de conocer la secuencia adyacente al gen *hutZ* rindió un producto de PCR de unas 4,5 kb, que se clonaron en el pGEM-T Easy para dar el pSJR12. La secuenciación de éste, no reveló la presencia de una ORF con homología con el receptor esperado, sino una ORF situada a continuación de *hutZ*, que se transcribía en la hebra contraria a éste, y que codifica una proteína de 127 aminoácidos, con un 90% de homología con una “proteína hipotética” de *P. profundum* (Q6LS23). Así, se concluyó que la distribución génica de *P. damsela* subsp. *piscicida* no implicaba la presencia de un gen que codificara para el receptor responsable de la captación de hemina contiguo al gen *hutZ*.

La siguiente estrategia de búsqueda del receptor, se centró en utilizar los cebadores degenerados mencionados en materiales y métodos, y también resultó infructuosa, ya que a pesar de que se lograron productos de amplificación usando estos cebadores, la secuencia de los mismos nunca se correspondió con la de un posible receptor.

A la luz de los resultados obtenidos tras la construcción del sistema híbrido de captación de hemina *V. anguillarum*-*P. damsela*, que indicaron la necesidad de la presencia de los 9 genes del cluster de captación de hemina, además del receptor para complementar la cepa de *E. coli* 101ESD, se pensó en la posibilidad de que si existía un receptor de membrana externa para la captación de hemina en *P. damsela*, se podría conseguir aislarlo complementando la cepa CS7 (*E. coli* 101ESD + pSJR24) con una librería génica de *P. damsela*. Tras construir las genotecas y transformarlas en células competentes de la cepa CS7, tras 3 días de incubación se obtuvo una única colonia

resultante de la transformación de la genoteca de la cepa CDC2227-81, de la cual se extrajo el plásmido y se secuenció. Esta colonia, contenía el plásmido pACYC177 con un inserto de DNA de 4 kb capaz de complementar la cepa CS7. A la nueva cepa se le llamó CS12. Al plásmido se le llamó pSJR29, y su secuenciación reveló la presencia de dos ORFs completas y una tercera incompleta. La mayor de las tres, codificaba una proteína de 718 aminoácidos y presentaba gran homología con varios receptores de membrana externa de diversas especies del género *Vibrio*. Sobre la base de esta homología y de su capacidad para complementar funcionalmente la cepa CS7, se denominó a esta ORF gen *hutA* de *P. damsela* subsp. *damsela*, y a la proteína que codifica proteína HutA de unos 177,59 kDa, quedando así identificado el receptor de membrana externa implicado en la captación de hemina de *P. damsela* subsp. *damsela*.

La ORF situada antes de *hutA*, codifica para una proteína de 92 aminoácidos, y mostró un 89% de similitud con la proteína ribosómica L25 de *V. vulnificus*. La ORF situada a continuación, estaba incompleta en el clon pSJR29, y mostró un 95% de similitud con una helicasa dependiente de ATP de *P. profundum*.

4.3.3.2. Identificación del gen *hutA* en *P. damsela* subsp. *piscicida*: Distribución y estructura en distintos aislados de *P. damsela*

Conocida la secuencia del gen *hutA* en *P. damsela* subsp. *damsela*, y en base a la alta homología genética existente entre esta subespecie y la subsp. *piscicida*, se procedió a obtener en ésta la secuencia del gen *hutA* completo. La PCR, que se realizó en primer lugar utilizando los cebadores delhutADI21 5'1 y delhutADI21 3'1 y como molde el DNA de la cepa DI21, no rindió en ninguna ocasión y tras varios intentos, ningún producto de amplificación. A la vista de este resultado, se procedió a realizar la misma reacción de PCR con un número superior de cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Los resultados se reflejan en la Figura IV.36.

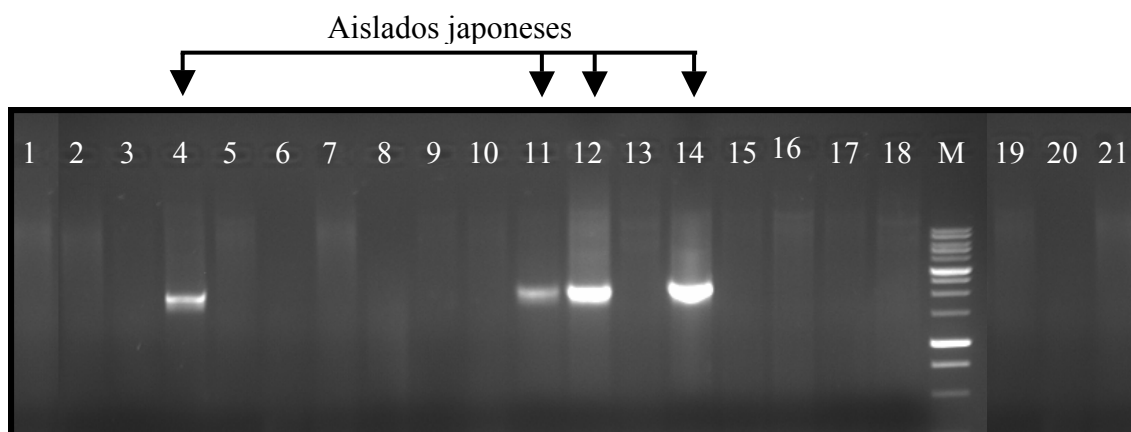


Figura IV.36.-Amplificación por PCR del gen *hutA* de *P. damsela* subsp. *piscicida* con los cebadores delhutADI21 5'1 y delhutADI21 3'1. Como DNA molde se utilizó el de las cepas: DI21 (1), B51 (2), ATCC 17911 (3), ATCC 29690 (4), 666.1 (5), 1083.1 (6), IT-2 (7), 069A(8), ATIT-2 (9), Lgr52/02 (10), MP7801 (11), EPOY 8803-II (12), PP5 (13), MZS8001 (14), PC 554.2 (15), PC 435.1 (16), TW 515/02 (17), EW 194/97 (18), Nu no (19), PC 610.1 (20) y 91.197 (21).

Como se aprecia en la Figura IV.36 únicamente se logró amplificar el gen *hutA* en cuatro de las cepas de la subespecie *piscicida* que se probaron: ATCC 29690, MP7801, MZS 8001 y EPOY-8803-II, es decir, los aislados de origen japonés.

El producto obtenido en la reacción de PCR realizada con los cebadores delhutADI21 5'1 y delhutADI21 3'1 utilizando como molde el DNA de la cepa MP7801, se clonó en el pGEM-T Easy y se denominó pSJR37. Éste fue secuenciado en su totalidad revelando la presencia de una ORF que codificaba para una proteína de 718 aminoácidos (Figura IV.38), con un 99% de similitud con el receptor HutA de *P. damsela* subsp. *damsela*, con lo cual se estableció que esta ORF constituye el gen *hutA* de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Figura IV.37).

```

1   AGGTCAGTACGTACTACTGCTTCAAATTTCAATAATTTACTCTACATTGAGATTTAAAAA 60
61  ATGCATCGGACAATGCGACCTTGTCCAACACTGTAAATCGAGCGCAGATACTATCAGTGA 120
121 AGAACCGCTCTAGCAAGTACCTTACCGTAAAAATCCTTTCTAATAAATCAATTGCTGTA 180
181 AATCTATCCGCTATAAACACTATTTACCTTATTAATTATTCTGATTTTACAGTACTTAGT 240
      "caja Fur"
241 GAAAATACGATCTAGATCACAATAATAATGATAGTAATTATCATTATATTTGTATGTAA 300
      -35 -10
301 TCCGTGCCTGTTTTGCAGCAACCAATAATGAAAACACTAAGCAGGGATTATGAATATTAAG 360
361 TTATCTTTTATTGCCAGTTCTGTTCTTTTGGCCGTTTCAACCCCATCTTTGGCTAATTCA 420
421 AATAATGAAGCCTCTATTTTTGATGAAGTGGTCGTATCAGGAACCTCGTTCGGAACTAAAGT 480
481 GTTAAAAATATACCGTCGACTGTATCGAAAGTGACAGCAGAGCAGATGGAGAAAACTTA 540
541 GCGACTGATGTTAAACAAGCACTAAAATACGAGCCAGGTGTAACAGTTAATGGTCGTGGA 600
601 CGTTTTGGTATGCAAGACTTTACGATTCGTGGGATGAGCGGCAATCGAGTAAAAATGCTG 660
661 ATTGACGGGGTAGAACCAACCTGTTTCGTACAATCCTGGCGCTGATGTTATGCGCAAAAAC 720
721 TCTAATACCATCGAAGTTGATACATTAACCTGCAATTGAAATTAATAAAGGTCCATCTTCT 780
781 AGCTTATACGGTAGTGATGCACCTTGGTGGTACTGTTTTTCTTCGCACTAAAAATCCAGAA 840
841 GATATGCTAGGTGCTGGTGATGATTGCGATGTAGGCGTCACTTCTGGTTATTCTAGTGCT 900
901 GATGAACAATATAAATTAGGTTTTGAGGTGGCTAATCGTACTGGCGATCTTGAAAGTATG 960
961 TTGATTTATACCTTATCGCAATGGCCATGAAACAGATACCTACTATAAAGACTCAAATGAA 1020
1021 ATTGGGGATGCAAGAAAAGCTGCTAACCCATTTGATATTGCCTCTCATAATGTTTTAGCG 1080
1081 AAGATTTTTCTATCAAAATTAACGATGCAAAACCGAGTTGGATTTACCGCAGAATATTATACG 1140
1141 CGATCTGCCGATGGTCGTATTTTATCCAGTGATGGTAAGACGATCTCAATGCGACCGCCA 1200
1201 ATGCCACCTATTATGTACAGTAATAACAGAGCAGATGATCACGATCATCGTTTACGTTTG 1260
1261 GGTCTTGAACATGAATGGTTAGCCGAGATAGCCGCTTTTGATTATTAGAATGGAAATTG 1320
1321 AACTGGACTGAAAGTGAATCCAAACATAATAGCTACGATAAAACCAATTATTATGGCAAT 1380
1381 CGTAATCGTTACCGTGATGGCACTGATGATACCATTAGCTCGATATTCAGATGAAAAAA 1440
1441 GAGTTAGAGTTGGCTAATAATCGTCACGAGATCACCTATGGCGTGAGTGGTACTAATAAT 1500
1501 ACGTTTGATATTACCTATACTGACTATAACCTAGATAAAGGAACGTCTAAGCTTGGGCCCT 1560
1561 GAAGAAGTACCTAAATCTAAATCTGAAAAACGTGCGGTCTTTGTTCAAGATCAGATGTTT 1620
1621 ATGTTAGATGAGAAGCTAGTTGTTACTGCGGGATTACGTTATGACGATTATCAAGCTGAG 1680
1681 CCAGATTCTGACACATTAAGATCATAGAGTGATGCATTTACTGGGCGTTTAGGTGCG 1740
1741 GTTTACCACCTTTACTGACAAATTCAGTACTTATGGTCAATTTACTCAAGGCTTTAGAGCA 1800
1801 CCAACCATTCATGAGTTGTAAGTAAAGAGAATCTAGCTCACGGTTATAAAGTCATC 1860

```

1861 TCGAATCCTAACTTAAACCAGAGGAGAGTGATGCTGTTGAGTTAGGCTTACGTCTAAAT 1920
 1921 GGACATTTAGGTTGAGTTGCGACATCTGTTTTCTATAATAATTATAAGAACTTCATTA 1980
 1981 GATGTAACGACTTATGATTCAAATAATATCCAGATCACAACGAATGAAATGTCGATAAA 2040
 2041 GCTAAAATTTATGGTGCAGAGTTAAACCTCTATCTGGTTGGATGAAGCACTTAATGCT 2100
 2101 CCAATGGGGACGTATGCGAATCTCTGTGCGATACACTCGTGGTGAAGATAAGAAGACA 2160
 2161 GGGCGTGAGTTAGATACTGTGGCACCATTAACTGCGGTATTAGGGCTAGGCTATGATTCA 2220
 2221 CCTGATGAGATGTGGGGTGGTGTGTTGATGTGACTATGGTTGCAACGAAAGACAAATGG 2280
 2281 CAAGAAGAAGACCACTTTAATACCCAGGCTATACGGTTGTGGATATGACGACGTATTAC 2340
 2341 CGACCAAGTAAAGATTTAACGGTTCGTGCTGGCCTATTTAATGCCTTTGATAAGAAGTAT 2400
 2401 TGGCAGTATCAAAATGTTGATGGTATTATCGTTGGTAAAGAGAAATTTAATTGTAAACA 2460
 2461 GAACCTGGTCTGTAACGGGGCGTGAATGTGAAGTACGATTTTAACTTTAAAGCCGTTCA 2520
 2521 AGACATAAAAGCTGTCTAATACATAAAATTAATCCGCATAACATGATGTTTATGCGGATT 2580
 2581 TTTTGTTTTAGTTATTGTTGGGTTGTAATTAGCTTTATTTTTGGTGGTGACTCCAATT 2640
 2641 GATTTATTAATGGTGAAATTCACGTTCTATAAACGTTCCAATAACCTTATCGTGCATCTC 2700
 2701 TTCGCTTTTCGAAAAACCAATGGTTTTCTTACTAATCTTTTTAGTCGAGATCGTAATGT 2760
 2761 TAAATTTGTTCTTTCAATTCGTTGCGTGATCGCTTACCTATGATGTGATTTTCTCTTGG 2820
 2821 TAAATAGCTTGAATACACCTTAAAATC 2847

Figura IV.37.-Gen *hutA* de la cepa MP7801 de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Se señalan los codones de inicio y final del gen en gris, la “caja Fur” y las probables regiones -35 y -10 deducidas por homología con otras secuencias consenso. Se identificó un posible terminador de transcripción de secuencia palindrómica en la región 3’ del gen, que se marca con dos flechas.

MNIKLSFIASSVLLAVSTPSLANSNNEASIFDEVVVSSTRSEQSVKNIPSTVSKVTAEQMEKNLATDVKQALKYEPGVTNNGRGRFGMQD 90
 FTIRGMSGNRVKMLIDGVEQPVSYNPGADVMRKNSNTIEVDTLTAIEINKGPSSSLYGSDALGGTVFLRTKNPEDMLGAGDDSHVGVTS 180
 YSSADEQYKLGFEVANRTGDLESMLIYTYRNGHETDTYYKDSNEIGDARKAANPFDIASHNVLAKIFYQINDANRVGFTAEEYTRSDGR 270
 ILSSDGKTISMRRPMPPIIMYSNNRADDHDLRLGLLEHWEIAAFDSLEWKLNWTESESKHNSYDKTNYYGNNRNYRDGTDITQLDI 360
 QMKKELELANNRHEITYGVSGTNNTFDITYTDYNLDKGTSLKGPVEVPKSKSEKRAVQVQDMFMLEKLVVTAGLRYDDYQAEPSD 450
 KDHKSDAFTGRLGAVYHFTDNFSTYGQFTQGFRAPTIHELYYDKENLAHGYKVISNPNLKPEESDAVELGLRLNGHLSVATS VFYNNYK 540
 NFIKDVTTYDSNNIQTITNENVDKAKIYGAEKTSIWLDEALNAPMGTYANFSVAYTRGEDKKTGRELDTVAPLTAVLGLGYDSPDEMW 630
 GVVDVTMVATKDKWQEEHFNTPGYTVVDMTTYRPSKDLTVRAGLFNAFDKQYQYQNVGDIIVGKENFNCKTEPGRNWGVNVKYDF 718

Figura IV.38.-Proteína HutA de la cepa MP7801 de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Para conocer la secuencia de las regiones anterior y posterior del gen *hutA*, se llevó a cabo una PCR inversa utilizando como molde DNA de la cepa MP7801 digerido con *ClaI* y recircularizado con DNA Ligasa, y los cebadores IphutA1 y IphutA4. Dicha PCR rindió un producto de aproximadamente 4 kb, que fue secuenciado revelando la presencia de una ORF antes y otra después del gen *hutA* altamente similares a la proteína ribosómica L25 de *V. parahaemolyticus* y a una transposasa de *V. vulnificus* respectivamente.

Se realizaron a continuación reacciones de PCR con los cebadores IP-hutA 3'1 y hupADI215'2, que amplifican un fragmento del extremo 5' del gen, de unas 900 pb, utilizando como molde todos los DNAs genómicos usados en la primera PCR. En esta segunda PCR, todas las cepas ensayadas fueron positivas, evidenciando que al menos esta zona del gen está conservada en todas ellas, y que probablemente en aquéllas en las que la PCR con los cebadores delhutADI21 5'1 y delhutADI21 3'1 había resultado negativa, sería por la existencia de diferencias en la región 3' del gen, o incluso por la posibilidad de que éste estuviera incompleto.

La amplificación por PCR Inversa realizada para tratar de secuenciar el gen *hutA* en la cepa DI21, rindió un producto de 2,7 kb que se clonó en el pGEM-T Easy. Al clon resultante se le llamó pSJR35, y su secuenciación reveló la presencia de una ORF con un 100% de identidad con el receptor HutA de la cepa MP7801, secuenciado previamente, pero cuya pauta de lectura se interrumpe de forma repentina en el aminoácido número 438, a partir del cual parte una nueva ORF con un 87% de similitud con una proteína de multirresistencia de *P. profundum* (Número de Acceso EMBL: Q6LRX0) (Figuras IV.39 y IV.40).

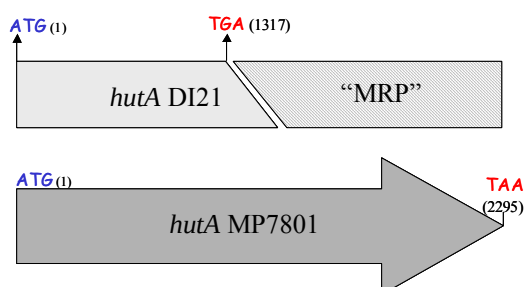


Figura IV.39.-Estructura del gen *hutA* de la cepa DI21, comparada con la de la cepa MP7801 de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

```

1  ATGGATATTAAGTTATCTTTTATTGCCAGTTCTGTTCTTTTGGCCGTTTCAACCCCATCT 60
   M D I K L S F I A S S V L L A V S T P S
61  TTGGCTAATTCAAATAATGAAGCCTCTATTTTTGATGAAGTGGTCGTATCAGGAACTCGT 120
   L A N S N N E A S I F D E V V V S G T R
121 TCGGAACAAAGTGTTAAAAATATACCGTCGACTGTATCGAAAGTGACAGCAGAGCAGATG 180
   S E Q S V K N I P S T V S K V T A E Q M
181 GAGAAAAAATTAGCGACTGATGTAAACAAGCACTAAAAACAAGCCAGGTGTAACAGTT 240
   E K N L A T D V K Q A L K Y K P G V T V
241 AATGGTCGAGGACGTTTGGGTATGCAAGACTTGACGATTCTGTTGGGATGAGCGGCAATCGA 300
   N G R G R L G M Q D L T I R G M S G N R
301 GTAAAAATGCTGATTGACGGGGTAAAAACAACCTGTTTGTACAATCCTGGCGCTGATGTT 360
   V K M L I D G V K Q P V S Y N P G A D V
361 ATGCGCAAAAACCTCTAATACCATCGAAGTTGATACATTAACGCAATGGAAATTAATAAA 420
   M R K N S N T I E V D T L T A M E I N K
421 GGTCCATCTCCTAGCTTATACGGTAGTGATGCACCTTGGTGGTACTGTTTTGCTTCGCACT 480
   G P S P S L Y G S D A L G G T V L L R T
481 AAAAAATCCAGAAGATATGCTAGGTGCTGGTGATGATTGCGATGTAGGCGTCACTTCTGGT 540
   K N P E D M L G A G D D S H V G V T S G
541 TATTCTAGTGCTGATGAACAATATAAATTAGGTTTTGAGGTGGCTAATCGTACTGGCGAT 600
   Y S S A D E Q Y K L G F E V A N R T G D
601 CTTGAAAGTATGTTGATTTTACTTTATCGCAATGGCCATGAAACAGATACCTACTATAAA 660
   L E S M L I Y T Y R N G H E T D T Y Y K
661 GACTCAAATGAAATTGGGGATGCAAGAAAAGCTGCTAACCCATTTGATATTGCCTCTCAT 720
   D S N E I G D A R K A A N P F D I A S H
721 AATGTTTTAGCGAAGATTTTCTATCAAATTAACGATGCAAAACGAGTTGGATTTACCGCA 780
   N V L A K I F Y Q I N D A N R V G F T A
781 GAATATTATACGCGATCTGCCGATGGTCGTATTTTATCCAGTGATGGTAAGACGATCCCA 840
   E Y Y T R S A D G R I L S S D G K T I P
841 ATGCGACCGCCAATGCCACCTATTATGTACAGTAATAACAGAGCAGATGATCACGATCAT 900
   M R P P M P P I M Y S N N R A D D H D H
901 CGTTTACGTTTGGGTCTTGAACATGAATGGTTAGCCGAGATAGCCGCTTTTGATTATTAA 960
   R L R L G L E H E W L A E I A A F D S L
961 GAATGGAAATTTGAAGTGGACTGAAAGTGAATCCAAACATAATAGCTACGATAAAACCAAT 1020
   E W K L N W T E S E S K H N S Y D K T N
1021 TATTATGGCAATCGTAATCGTTACCGTGATGGCACTGATGATACCATTGAGCTCGATATT 1080
   Y Y G N R N R Y R D G T D D T I Q L D I
1081 CAGATGAAAAAAGAGTTAGAGTTGGCTAATAATCGTCACGAGATCACCTATGGCGTGAGT 1140
   Q M K K E L E L A N N R H E I T Y G V S
1141 GGTAATAATAACGTTTGTATTTACCTATACTGACTA TAACCTAGATAAAGGAACGTC
      G T N N T F D I T Y T D Y L R S L P V D

```

Figura IV.40.-Secuencias del gen *hutA* y la proteína HutA de la cepa DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Se señala la zona en que se interrumpe la pauta de lectura del gen ().

La reacción de PCR realizada con los cebadores delhutADI21 5'1 y delhutADI21 3'1 (que flanquean el gen *hutA* completo), produjo un fragmento del tamaño esperado en todas las cepas de la subespecie *damselae* (Figura IV.41), lo cual sugiere que el receptor de grupos hemo HutA, está conservado en la subespecie *damselae*. En cambio, cuando las reacciones de PCR se llevaron a cabo con cepas de la subespecie *piscicida*, solamente se produjo amplificación en cuatro cepas procedentes de Japón (Figura IV.41, líneas 4,5,7,8). Se diseñaron entonces dos cebadores que reconocen secuencias en el extremo 5' de *hutA* (P3) y en la hipotética proteína de multirresistencia (P4), respectivamente, tal y como se esquematiza en la Figura IV.42. Al utilizar estos cebadores, se produjo un producto del tamaño esperado en las cepas de la subespecie *piscicida* en las que anteriormente no se había producido la amplificación del gen completo (Figura IV.41, líneas 1,2,3,6).

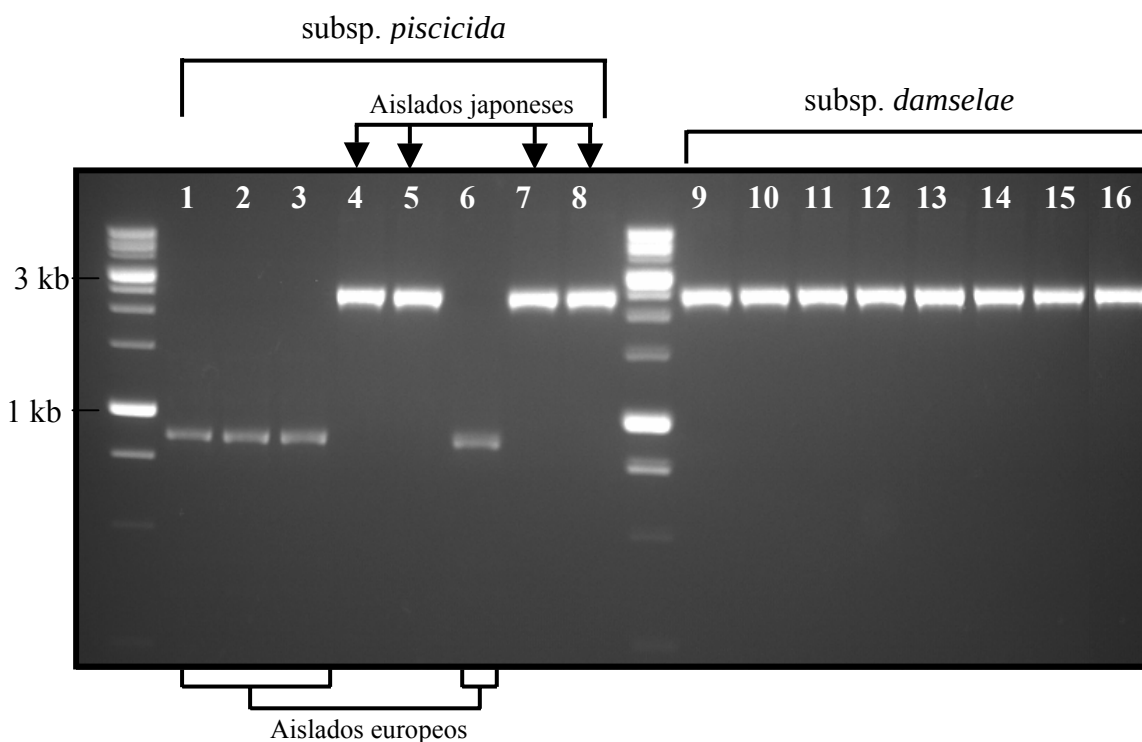


Figura IV.41.-Resultado del análisis por PCR de la presencia del gen *hutA* completo o truncado en distintas cepas de *P. damsela*. Líneas 1-8, *P. damsela* subsp. *piscicida* cepas DI21, 10831, IT-1, MP-7801, MZS-8001, ATCC 17911, ATCC29690, EPOY 8803-II. Líneas 9-16, *P. damsela* subsp. *damsela* cepas RG-91, RM-71, CDC 2227-81, RG-153, RG-214, ATCC 33539, LD-07, ATCC 35083. M, marcador de peso molecular.

Analizando conjuntamente las estructuras encontradas, se demuestra que existen al menos tres tipos diferentes de estructuras genéticas en torno al gen *hutA* en *P. damsela*, que se resumen en la Figura IV.42.

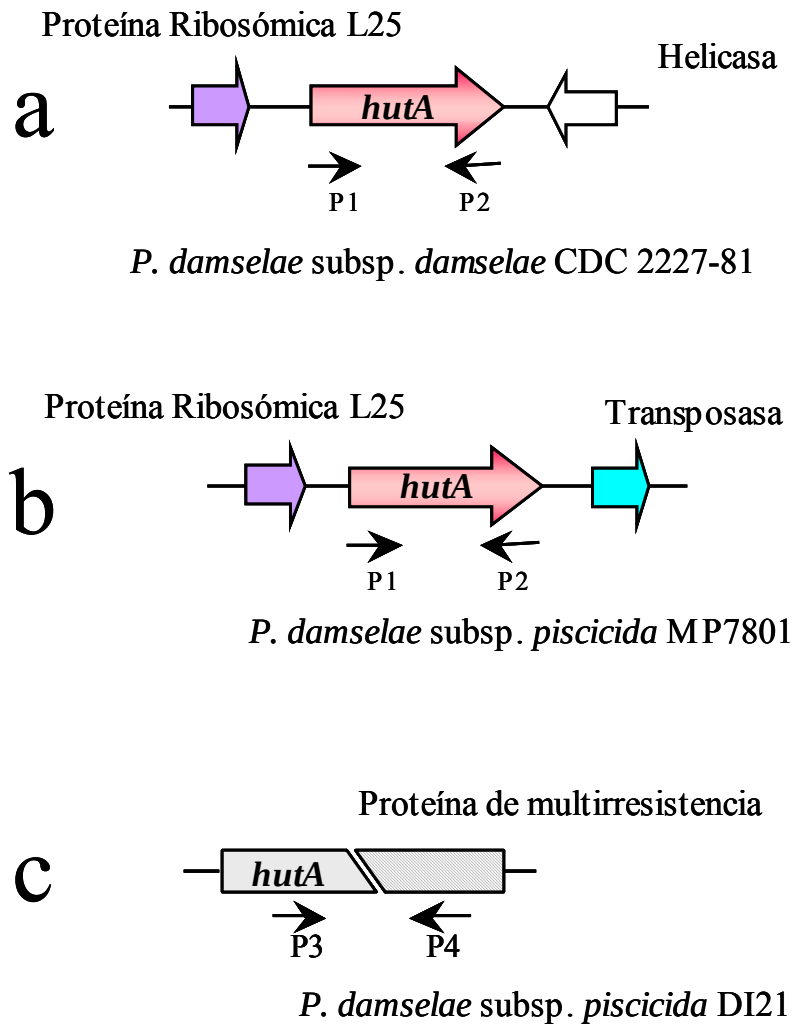


Figura IV.42.-Análisis comparativo de la estructura del gen que codifica para el receptor de membrana externa HutA entre *P. damsela* subsp. *damsela* (a) y subsp. *piscicida* cepas MP7801 (b) y DI21 (c).

Así, el receptor HutA se encuentra completo en *P. damsela* subsp. *damsela* y en las cepas japonesas analizadas de la subespecie *piscicida*, mientras que en el resto de aislados (cepas europeas y americanas fundamentalmente), el gen del receptor se halla truncado por la mitad, y ligado a un gen, también interrumpido, que codifica una proteína con gran similitud con una proteína de multirresistencia de *P. profundum*.

En el extremo 5' del gen *hutA*, se halló en los dos primeros casos (a y b) la presencia de una pequeña ORF de 92 aminoácidos con un 89% de identidad con la proteína ribosómica L25 de *V. parahaemolyticus*, y esta misma disposición se encontró en *P. profundum*, aunque no en el resto de Vibrios. En *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V.*

parahaemolyticus, en el extremo 5' del gen *hutA* se encuentra una ORF de unos 295 aminoácidos, que codifica para una proteína reguladora, de la familia LysR de reguladores transcripcionales.

4.3.3.3. Análisis funcional del sistema de utilización de grupos hemo

Complementación de la cepa *E. coli* 101 ESD

Una vez localizado el gen que codificaba el receptor implicado en la captación de hemina del medio extracelular, se procedió a comprobar cuáles de los nueve genes del sistema, presuntamente implicados en el transporte y la internalización de hemina, eran esenciales para realizar tal función. Para ello se realizaron distintas construcciones de estos genes en plásmidos, que se transformaron en las cepas mutantes de *E. coli* 101ESD y EB53.

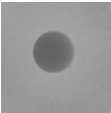
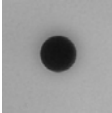
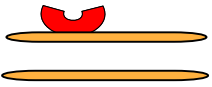
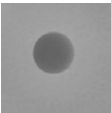
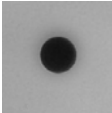
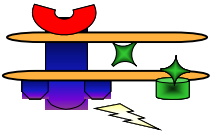
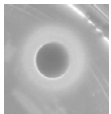
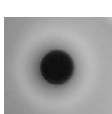
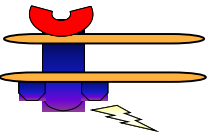
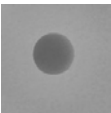
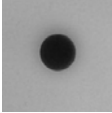
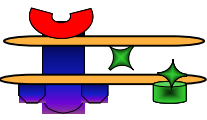
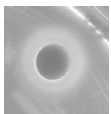
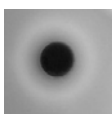
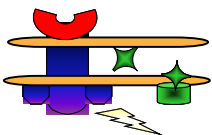
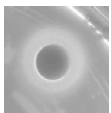
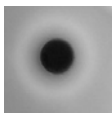
Para comprobar el número mínimo de genes necesarios para la utilización de hemina como fuente de hierro por *E. coli* 101ESD, se ensayaron las diferentes combinaciones creadas (Tabla IV.3) en placas de medio CM9 complementado con 150 μ M de 2,2'-dipyridyl, y sobre ellas se colocaron discos de hemina y hemoglobina.

En los resultados mostrados en la Tabla IV.3, se evidencia que la cepa de *E. coli* 101ESD complementada con un plásmido que lleve los genes *hutZXWtonBexbBDhutBCD* (pSJR24 ó pSJR30) de *P. damsela* puede utilizar hemina como fuente de hierro, siempre que a la vez esté complementada también con el receptor *hutA* (pSJR29 ó pSJR37) de *P. damsela*, al igual que se observó con la construcción del sistema híbrido (receptor *huvA* de *V. anguillarum* + *hutZXWtonBexbBDhutBCD* de *P. damsela*). Esto sugiere que *hutA* es el receptor de membrana externa responsable de la captación de hemina en *P. damsela*.

Otro tipo de construcciones que se realizaron, fueron combinaciones del receptor HutA (pSJR29) con plásmidos portando los genes *tonBexbBDhutBCD*, es decir, sin *hutZXW* (pSJR33), para formar la cepa CS23, o *hutZXWtonBexbBD* es decir, sin *hutBCD* (pSJR27), para formar la cepa CS22. Como se aprecia en la Tabla IV.3, la cepa CS23 creció perfectamente utilizando tanto hemina como hemoglobina como fuente de hierro, mientras que la cepa CS22 fue incapaz de hacerlo en las mismas condiciones. Este resultado, indica por un lado, que los genes *hutZXW* no son esenciales para que la bacteria pueda utilizar la hemina como fuente de hierro, y por otro revela que el sistema no es capaz de restaurar esta capacidad en *E. coli* 101 ESD sin la proteína periplásmica

HutB y el sistema de transporte ABC (HutC y HutD). Se confirma así la implicación e importancia de los genes *hutBCD* en la utilización de hemina del medio extracelular.

Tabla IV.3.-Utilización de hemina y hemoglobina como fuentes de hierro por *E. coli* 101 ESD complementada por diferentes combinaciones de los genes de captación de hemo de *P. damsela*. El ensayo se realizó en placas de medio CM9 complementado con 150 μ M de 2,2'-dipyridyl. Los plásmidos contenidos en cada cepa se indican entre paréntesis.

Cepa	Genes	Características	Crecimiento con hemina 5mM	Crecimiento con hemoglobina 1 μ M
101 ESD	-		 -	 -
CS18 (pSJR29)	<i>hutA</i>		 -	 -
CS21 (pSJR29, pSJR30)	<i>hutA, hutBCD, tonBexbBexbD</i>		 +	 +
CS22 (pSJR29, pSJR27)	<i>hutA, tonBexbBexbD</i>		 -	 -
CS23 (pSJR29, pSJR33)	<i>hutA y hutBCD</i>		 +	 +
CS28 (pSJR24, pSJR29)	<i>hutA, hutBCD, tonBexbBexbD</i>		 +	 +

Complementación de la cepa *E. coli* EB53

La cepa de *E. coli* K-12 EB53 es un mutante *hemA* incapaz de sintetizar hemo porque carece del enzima Glutamyl-tRNA reductasa. Dicho enzima interviene en la ruta C5 de biosíntesis del ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA), el precursor de la biosíntesis de hemo (Panek y O'Brian, 2002) (Figura IV.43).

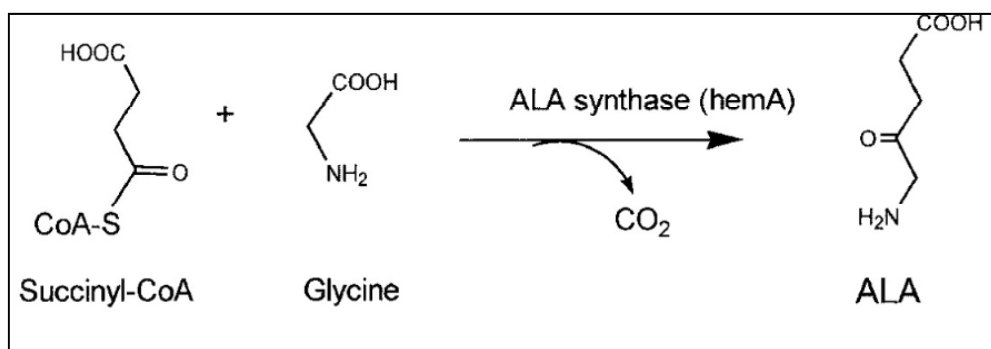


Figura IV.43.-Esquema de la reacción catalizada por el gen *hemA* en el proceso de formación de hemina endógena bacteriana.

En consecuencia, dicho mutante no puede ensamblar correctamente los citocromos que median el proceso de respiración aeróbica y presenta una incapacidad de crecimiento en condiciones de aerobiosis, a no ser que se le suministre en el medio ácido δ -aminolevulínico (Eberspächer y Braun, 1980). La membrana externa de la cepa *E. coli* K-12 es impermeable al hemo extracelular, o a su precursor, la protoporfirina IX, razón por la cual el medio rico suplementado con hemo no permite el crecimiento del mutante *hemA* de *E. coli* K-12 (Stojiljkovic y Hantke, 1992). Además, la cepa EB53 no puede biosintetizar el ácido corísmico, precursor de la biosíntesis del sideróforo enterobactina, debido a una mutación *aroB*. En consecuencia, la suplementación con δ -ALA no puede paliar las dificultades de crecimiento que esta cepa presenta en condiciones de limitación de hierro, siendo necesario un aporte externo de hierro para permitir su crecimiento en dichas condiciones (Eberspächer y Braun, 1980).

Esta cepa se transformó con los plásmidos pSJR24 y pSJR29 por separado y con ambos a la vez para formar las cepas CS2, CS32 y CS29 respectivamente y se probó en un cultivo en sobrecapa de agarosa como se explica en materiales y métodos.

La cepa EB53, fue capaz de utilizar tanto hemina como hemoglobina como fuentes de porfirinas, tanto si se complementaba con la combinación pSJR29 (portando

el gen *hutA*) y pSJR24 (portando los genes *hutZXWtonBexbBDhutBCD*) a la vez, como si se complementaba únicamente con el plásmido pSJR29 (Figura IV.44). Sin embargo, cuando esta bacteria se complementó individualmente con el pSJR24, no se observó crecimiento. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla IV.4.

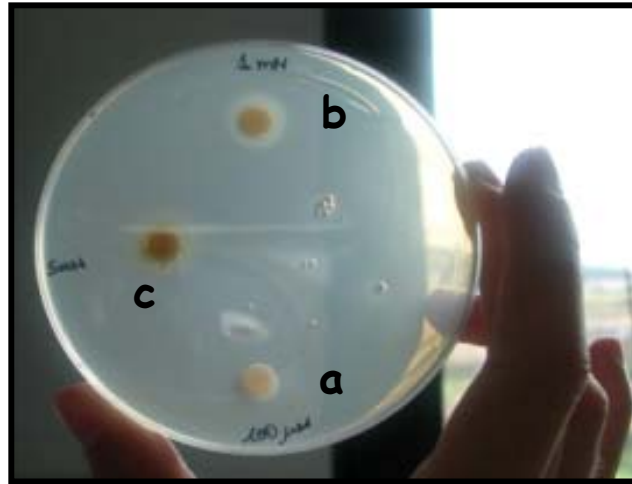


Figura IV.44.-Utilización de hemina como fuente de porfirinas por la cepa de *E. coli* EB53 complementada el plásmido pSJR29. El ensayo se realizó en placas de medio CM9 completado con 150 µM de 2,2'-dipyridyl. Los discos de la sobrecapa llevan hemina 100 µM (a), 1 mM (b) y 5 mM (c).

Tabla IV.4.-Utilización de hemina y hemoglobina como fuentes de porfirinas por *E. coli* EB53 complementada por diferentes combinaciones de los genes de captación de hemo de *P. damselae*. El ensayo se realizó en placas de medio CM9 complementado con 150 µM de 2,2'-dipyridyl. Los plásmidos contenidos en cada cepa se indican entre paréntesis.

CEPA	Genes	Características	Crecimiento con hemina 5 mM	Crecimiento con hemoglobina 1 µM
EB53	-		-	-
CS2 (pSJR24)	<i>tonBexbBexbD</i> <i>hutBCD-hutWXZ</i>		-	-
CS29 (pSJR24 y pSJR29)	<i>hutA</i> , <i>tonBexbBexbD</i> <i>hutBC- hutWXZ</i> ,		+	+
CS32 (pSJR29)	<i>hutA</i>		+	+

Este resultado indica pues, que el receptor HutA de *P. damselae* resulta necesario y suficiente para restaurar la función de la cepa mutante EB53 es decir, le aporta a la célula la capacidad de captar hemina del medio extracelular, lo cual nos indica a su vez que ha de poseer un mecanismo propio de transporte de hemina desde el periplasma hacia el citoplasma.

El crecimiento de la cepa EB53 se ensayó en medio líquido LB. Los resultados obtenidos se reflejan en la Figura IV.45.

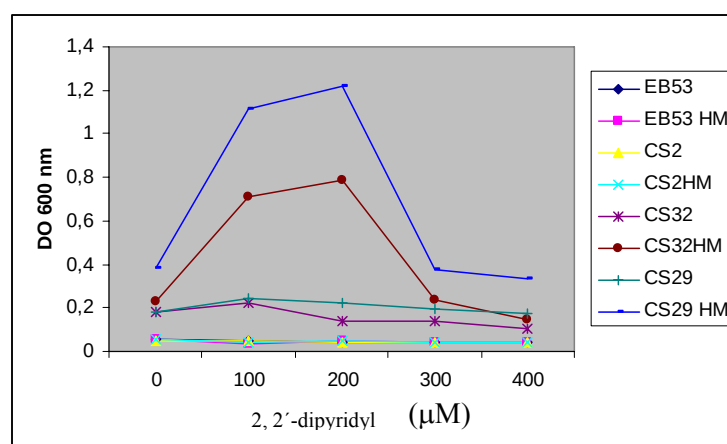


Figura IV.45.-Ensayo de crecimiento en medio LB líquido realizado con el fin de determinar el crecimiento de las distintas cepas en medio LB sin ALA, con y sin hemina (HM), y según diferentes concentraciones de 2, 2'-dipyridyl.

Los resultados de este ensayo, reafirman los que se habían obtenido en el experimento realizado en placa. Únicamente se observa crecimiento en el medio con el hierro quelado enriquecido con hemina en las cepas CS29 y CS32, es decir, si se les aporta el receptor de membrana externa HutA. Hemos observado asimismo, al medir el crecimiento de la cepa CS29, que además de con el receptor está complementada con el *cluster* génico (*hutZ-hutD*), que la eficacia en la adquisición de hemina en esta cepa se ve mejorada con respecto a la que lleva únicamente HutA (CS32), con lo que se vuelve a demostrar la implicación de este sistema en el proceso.

4.3.3.4. Comparación del sistema de *P. damsela* con el de otras especies bacterianas

La disposición espacial de los genes responsables del transporte de hemina en el cromosoma de *P. damsela* subsp. *piscicida* resultó ser exactamente la misma que la de la subsp. *damsela* y *P. profundum*, y muy similar a la descrita en otras especies del género *Vibrio*, como *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* (Figura IV.46).

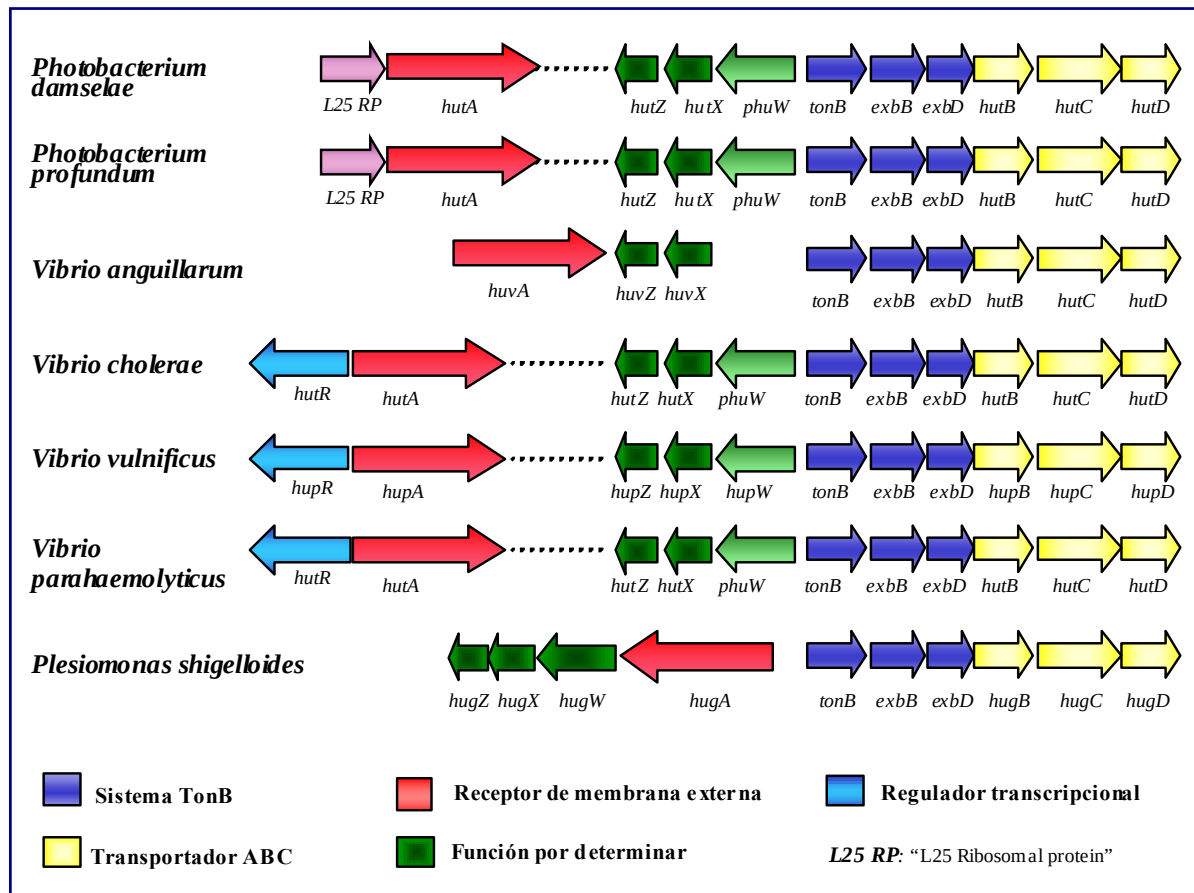


Figura IV.46.-Análisis comparativo de la organización de los genes de captación de hemina en *P. damsela*, distintas especies del género *Vibrio* y *Plesiomonas shigelloides*.

Este hecho sugiere que los genes implicados en el transporte de grupos hemo se han conservado en el transcurso de su transmisión vertical en la familia *Vibrionaceae*. Asimismo, el hecho inusual de que un sistema TonB esté ligado a un sistema de genes de transporte de hemo, puede sugerir que estos *clusters* de genes de captación de hemina se adquirieron por transferencia génica horizontal de modo simultáneo a los genes del sistema TonB. Esto debe representar una ventaja selectiva, permitiendo un transporte de hemo más eficiente en la cepa receptora. A pesar de todo, se han

Análisis comparativo de la homología de las proteínas Hut de *P. damselae*

Con el fin de conocer el grado de similitud existente entre las proteínas Hut de *P. damsela* con las descritas en otras especies de bacterias gram negativas, se llevaron a cabo alineamientos de estas proteínas utilizando el programa ClustalW, y los resultados se muestran en las Figuras IV.47-56.

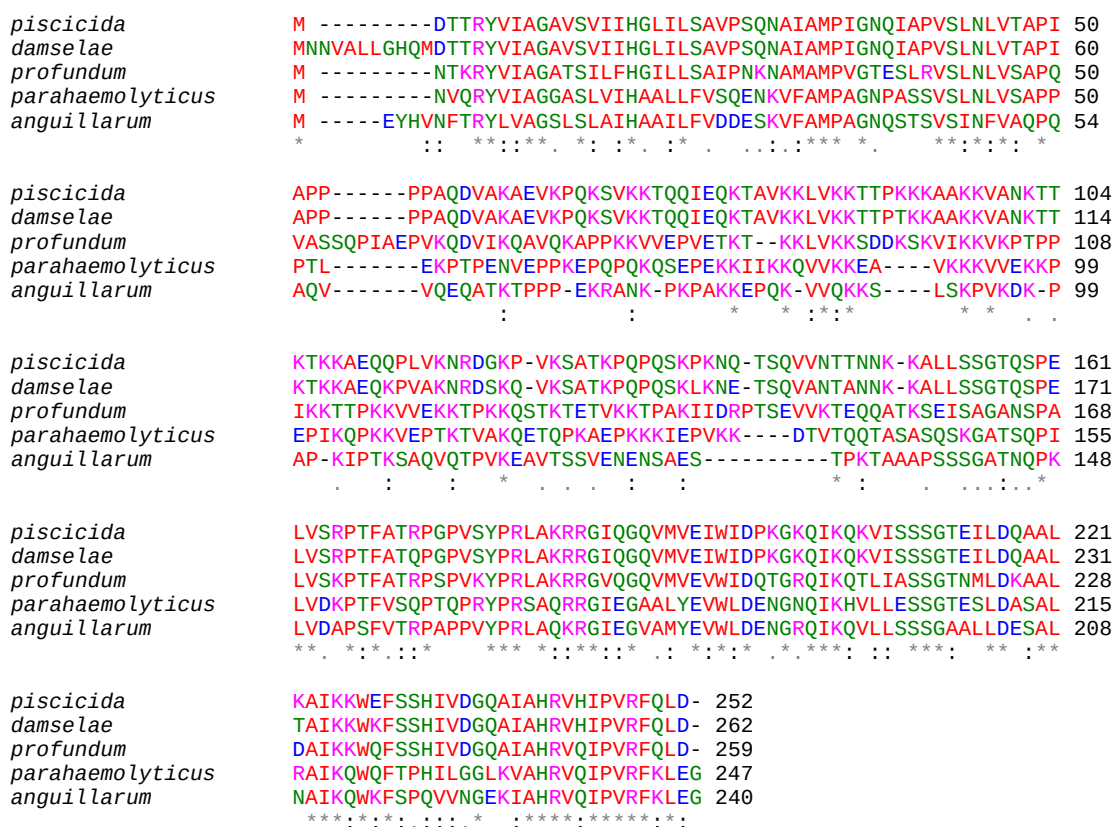


Figura IV.47.-Alineamiento de la proteína TonB en *P. damsela* subsp. *piscicida*, *P. damsela* subsp. *damselae*, *P. profundum*, *V. parahaemolyticus* y *V. anguillarum*.

```

piscicida      MEFINQYQEQFGLMAWPLFICSLTVMILLERFIQVLLCTGVGRTKINQILNNQNRHDEQ 60
damsela       MEFINQYQEQFGLMAWPLFICSLTVMILLERFIQVLLCTGVGRTKINQILNNQNRHDEQ 60
profundum     MDTINTLQNFGLMTWPLLICSAITMILLERCVQVLLCTGVGRTKINALLAKQYR-DDS 59
parahaemolyticus MEQLQELQTQFGLMTWPLIICSAITVMIIAERLFQVFISLGVGKSAIRQHSLDPTNSR 60
anguillarum   MELLTQLEQQGLMAWPLFVCSALATMIITERLFQVLLSLGVGKGAIGSALNQISPTNTA 60
               * : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
piscicida      ALDHLAQQQLQNQRPLLYKGIAMLIISHRHFAKALREDAAGMWLQQRKTQLRSGLKLLSLIG 120
damsela       ALDHLAQQQLQNQRPLLYKGIAMLIISHRHFAKALREDAAGMWLQQRKTQLRSGLKLLSLIG 120
profundum     GLDDLASELKQQRPLLYKGVAMLIISHRHFAKALREDAAGMWLQQRKTQLRSGLRLLSLIG 119
parahaemolyticus DIEALADELSGKRPLLYRGVAMLLAHHSFAKSLREDAAGMWLEKRLHSLRLLSLIG 120
anguillarum   QIEALASEFSSKRPLLYKGVAMLLAHHDFSKGLREDAAGMWLEKRLHSLRLLSLIG 120
               : : * : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
piscicida      VISPLLGLLGTVLGLIDMFKGIAMTTGSVTPNDLADGLGLAMQTTAAGLIIALPAITGAQ 180
damsela       VISPLLGLLGTVLGLIDMFKGIAMTTGSVTPNDLADGLGLAMRTTAAGLIIALPAITGAQ 180
profundum     VITPLLGLLGTVLGLIEMFKGIAATTTGSVTPNDLADGLGLAMRTTAAGLIIALPAITGAQ 179
parahaemolyticus VISPLIGLLGTVLGLIEMFKGIAMTTGSVTPNDLADGLGLAMRTTAAGLIIALPAISGAQ 180
anguillarum   VISPLLGLLGTVLGLIEMFKGVALSSGNIITPNDLADGLGLAMRTTAAGLIIALPAITGAQ 180
               * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
piscicida      LLGLWADSITSKLEHSLNRCNLWLEGISVT-----TTCDPVQGEALS- 223
damsela       LLGLWADSITSKLEHSLNRCNLWLEGISVT-----TNCDPKQGEVLS- 223
profundum     LLGLWADQVTAKLEHTLNHCNLWLEGLDLD-----TSAS-LSSAETTS- 221
parahaemolyticus IIGLWADRVLAKLEHTLNYNLWLEGISLQHVSPK-----TTASVTKTAEKAS 230
anguillarum   LLGVWADRVMAKLEHTLNYNLWLEGVSLQHDCTTKQERVAKYEDVSDNDVVNAS 235
               : : * : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

Figura IV.48.-Alineamiento de la proteína ExbB en *P. damsela* subsp. *piscicida*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *P. profundum*, *V. parahaemolyticus* y *V.anguillarum*.

```

piscicida      MISTGNSRWQDDELSPDLTPLLDIIFIVMVFLLLTASVKIKSLNVDLPQTETQILQTTS 60
damsela       MITTGNNRWQDDELSPDLTPLLDIIFIVMVFLLLTASVKIKSLNVDLPQTETQILQTTS 60
profundum     M-----LTASVKIKALDVELPKTETQILQTTEA 28
parahaemolyticus MIKVPQDNNR-NGLTPDLTPLLDIIFIVMVFLMLTAAVKLDSLDVALPSTDSQAVAEVDK 59
anguillarum   MIKTPHSHS--SALMPDLTPLLDIIFIVMVFLLLTAAVKFESLDVSLPTTDSPTVSEVNK 58
               * : * : * : * : * : * : * : * : * :
piscicida      DPITINLLASEPHWALDGNQKQSWFAFSTLLDEVKANPSKPVVIGAEKTASVEQMLKLL 120
damsela       DPITINLLASEPHWALDGNQKQSWFAFSTLLDEVKANPSKPVVIGAEKTASVEQMLKLL 120
profundum     DPITINLIAKEPYWALQGQSFKTWDSFTVALLKQVKDGPVQPVVIGADKASVEQMFKLL 88
parahaemolyticus QSITVNILKDEPYWAINQGTQYIDWENFTLALLEESKS-TDKPIVIGAEKTANIQSLVQLL 118
anguillarum   QSITVNLLAHEPYWAIDGKYIDWNNFTLALLEQSKA-SDRPVIGADKTAEVQQLVKLL 117
               : : * : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
piscicida      AFLQKNEIKATQLLMEEDNKA 141
damsela       AFLQKNDIKATQLLMEEDNKA 141
profundum     AFLQQHEIKATQLLMEDNA-- 107
parahaemolyticus GFLQENGIQATQLLTEESP-- 137
anguillarum   AFLQDNGIAATQLLTDHPQ-- 136
               . * : * : * : * : * : * :

```

Figura IV.49.-Alineamiento de la proteína ExbD en *P. damsela* subsp. *piscicida*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *P. profundum*, *V. parahaemolyticus* y *V.anguillarum*.

Figura IV.50.-Alineamiento de la proteína HutB en *P. damselae* subsp. *piscicida*, *P. damselae* subsp. *damselae*, *P. profundum*, *V. parahaemolyticus* y *V. anguillarum*.



Figura IV.51.-Alineamiento de la proteína HutC en *P. damsela* subsp. *piscicida*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *P. profundum*, *V. parahaemolyticus* y *V. anguillarum*.

Figura IV.52.-Alineamiento de la proteína HutD en *P. damsela* subsp. *piscicida*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *P. profundum*, *V. parahaemolyticus* y *V. anguillarum*.

<i>piscicida</i>	M-----SLAEQLKVTEGEV	14
<i>damsela</i>	M-----SLAEQLKVTEGEV	14
<i>profundum</i>	MFS-----TYSLETMKEKVAAVLADDPKLHAGAIAEKLEVTEGEV	40
<i>cholerae</i>	MYSGAYSFVQISTAAIRISITRLEKTMESLQQQVAQLLEQQPTLLPAAMAEQLNVTEFDI	60
<i>vulnificus</i>	M-----NSLQQQVAELLQQEPTLLPAAMAERLSVTELDI	34
	:::::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*	
<i>piscicida</i>	VLSFPESMVSHLPGLAQSIQLPQWGPVTTIVHSMGSIFEVKAPFPKGKEARGYYNLM	74
<i>damsela</i>	VLSFPESMVSHLPGLAQSIQLPQWGPVTTIVHSMGSIFEVKAPFPKGKEARGYYNLM	74
<i>profundum</i>	VFAFPDELVTLPGEFAKSILEDLPWGPVTTIVHSMGSIFEVKAPFPKGKEARGYYNLM	100
<i>cholerae</i>	VHALPEEMVAVDGSQAQITLESLEWGPVTTIMTIAGSIFEVKAPFPKGKVARGYNNLM	120
<i>vulnificus</i>	VQSLPQDMAVLVKGELAQSIENLVDFGPVTTIVHAFGSIFEVKAPFPKGKEARGYYNLM	94
	:::::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*	
<i>piscicida</i>	GRDGELHGHLLRLDLVSDIALVSKPFMGQESYFIGFFAAQGEVFKVYLRDQKRLFPFQ	134
<i>damsela</i>	GRDGELHGHLLRLDLVSDIALVSKPFMGQESYFIGFFAAQGEVFKVYLRDQKRLFPFQ	134
<i>profundum</i>	GKDGELHGHLLRLDLVAQIGLVSKITFMGQKSYFIGFFAKTEGVFKVYLRDQKRLFPFQ	160
<i>cholerae</i>	GRDGELHGHLLKLENISHVALVSKPFMGQESYFIGFFAAQGEVFKVYLRDQKRLFPFQ	180
<i>vulnificus</i>	GKQGEHGHLLKLDNVVAVALVSKPFMGQESYFIGFFAAQGEVFKVYLRDQKRLFPFQ	154
	:::::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*	
<i>piscicida</i>	IEMFKKLKQLGEDS	148
<i>damsela</i>	IEMFKKLKQLGEDS	148
<i>profundum</i>	IEKFQQLKTQYL--	172
<i>cholerae</i>	VARFKAMQQQHKQ-	193
<i>vulnificus</i>	VARFKSMQNEFAQ-	167
	:*:::*	

Figura IV.53.-Alineamiento de la proteína HutX de *P. damsela* subsp. *piscicida*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *P. profundum*, *V. cholerae* y *V. vulnificus*.

<i>piscicida</i>	MN-QVKQERLQSRLEPEIKFPRDSCLTQLLATVDNSGQPNVSYAPFVLLDGGYVVISQI	59
<i>damsela</i>	MN-QVKQERLQSRLEPEIKFPRDSCLTQLLATVDNSGQPNVSYAPFVLLDGGYVVISQI	59
<i>profundum</i>	MS-QVKQERLQNRGLPEIKFPRDSCLTQLLATVDANGPNVSYAPFVLLDGGYVVISQI	59
<i>fischeri</i>	MNSNVKQERLQNRGLPEIKFPRDSCLTQLLATVDCEGKPNVSYAPFVLLDGGYVVISQI	60
<i>vulnificus</i>	MDQVVKQERLQSRLEPEIKFPRDSCLTQLLATVDADGRPNVSYAPFVQNGEGYVVISQI	60
<i>anguillarum</i>	MDQVVKQERLQSRLEPEIKFPRDSCLTQLLATVDADGRPNVSYAPFVQNGEGYVVISQI	60
	:::::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*	
<i>piscicida</i>	AKHARNLLENPRVSLMMIEDEKTAQVLYARKRLTFEADVEKVERESAALLAIDGLTHRF	119
<i>damsela</i>	AKHARNLLENPRVSLMMIEDEKTAQVLYARKRLTFEADVEKVERESAALLAIDGLTHRF	119
<i>profundum</i>	AKHARNLLENPKVSLMMIEDEATSKTIYARKRLTFEADVIVERETGRWQEAEGKDRF	119
<i>fischeri</i>	ARHARNLLQNPVSLMLVEDESSKQLFARKRLTFDATAILLIDREEANWQLAVDEMQR	120
<i>vulnificus</i>	ARHARNLLENPVSLMMIEDEEAKQLFARKRLTFDAVASVIERDTQLWHQVITQMEERF	120
<i>anguillarum</i>	ARHARNLEVNPHVSLMMIADEGSSKQIFARQLTFDAVASVVPRETPLWQQVIGQMQR	120
	:::::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*	
<i>piscicida</i>	GEIVEGLSGLEDVFLFRLKPTHGLFVKGFQAFQVSGDDLIDFVHLTEGHRRIKDGSEIQ	179
<i>damsela</i>	GEIVEGLSGLEDVFLFRLKPTHGLFVKGFQAFQVSGDDLIDFVHLTEGHRRIKDGSEIQ	179
<i>profundum</i>	GEIVDGLSGLEDFKMFRLKPIQGLFVKGFQAFQVSGDDLVDVHLTEGHRRIKDGSEIQ	179
<i>fischeri</i>	GDIIDGLSSLEDFKMFRLKPIQGLFVKGFQAFQVSGDDLVDVHLTEGHRRIKDGSEIQ	175
<i>vulnificus</i>	GEIVSGLSLEDVFLFRLKPTHGLFVKGFQAFQVSGDDLVDVHLTEGHRRIKDGSEIQ	176
<i>anguillarum</i>	GEIIDGLSLEDVFLFRLKPTHGLFVKGFQAFQVSGDDLVDVHLTEGHRRIKDGSEIQ	176
	:::::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*:::*	
<i>piscicida</i>	EPSEKL	185
<i>damsela</i>	EPSEKL	185
<i>profundum</i>	APTEEL	185
<i>fischeri</i>	-----	
<i>vulnificus</i>	-----	
<i>anguillarum</i>	-----	

Figura IV.54.-Alineamiento de la proteína HutZ de *P. damsela* subsp. *piscicida*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *P. profundum*, *V. fischeri*, *V. vulnificus* y *V. anguillarum*.

<i>piscicida</i>	M-----NQEHQIDINKLDES-----ILGLHSPDSLRFASFRRKSAHAGGMNAVVPFAE	47
<i>damselae</i>	M-----NQEHQIDINKLDES-----VLGLHSPDPLRFASFRRKSAHAGGMNTMVPAE	47
<i>profundum</i>	MVKPAHKSMNKEQLRSIDKIHVESMSVDIVGENTPDPLRFARFKRSHAGGMSMVAES	60
<i>cholerae</i>	M-----IMLILDNFDES-----ILGANTPDPLRFARFQNKHSAHAGGIAMPVPSH	44
<i>vulnificus</i>	M-----NMTLTLDKYDQS-----IIGIDTPDPLRFARFAKQKSHAGGMSRPLNPS	45
<i>paraahaemolyticus</i>	M-----SVDIDKFDES-----VLGSDSPDPLRFARFVKKSHAHAGGASVPVPPP	43
	*::: .::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *	
<i>piscicida</i>	QQQSLGLSLLGEEKKGSLEPYSQVKRCLYVHIPFCRVRCCTYCNEFFQYASSQQLIDDYFA	107
<i>damselae</i>	QHQSLLGLSLLSEKKRSLPYSQVKRCLYVHIPFCRVRCCTYCNEFFQYASSQQLIDDYFA	107
<i>profundum</i>	DQQPIAQAILSTTP-----SQSGKRCLYVHIPFCRVRCCTYCNEFFQYASSQSLIDDYFA	113
<i>cholerae</i>	EQANVWQHITQVS-----QRQVRCCLYIHPFCRVRCCTFCNFFQNAASRQLVDYFA	97
<i>vulnificus</i>	QLVEQFNTLTQSNE-----FSRKKRCLYIHPFCRVRCCTFCNFFQNAASRQLVDGYFA	98
<i>paraahaemolyticus</i>	QQAGLLSSITSDQN-----VRNNKCLYIHPFCRVRCCTFCNFFQNAASRKLVDYFA	96
	: : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : *	
<i>piscicida</i>	ALMIELKLKAQQPWTQSAPFHAVYIGGGTPTDLTAQQVKQLGTMIRKHFPLTTDCELTLE	167
<i>damselae</i>	ALMIELKLKAQQPWTQSAPFHAVYIGGGTPTDLTAQQVKQLGTMIRKHFPLTTDCELTLE	167
<i>profundum</i>	ALMVELELKARQAWTQAAPFHAVYIGGGTPTDLTAQIKRLGQMIRQHFLTTDCELTLE	173
<i>cholerae</i>	ALLEEIKQKAALPWTQTGVFHAVYIGGGTPTELSPEQIRQLGTAIRESFPLTPDCEITLE	157
<i>vulnificus</i>	ALLKEIAIKSALPWTQSGVFHAVYVGGGTPTDLSPAQVRQLGEAIRSHFPLSADCEITLE	158
<i>paraahaemolyticus</i>	ALMQELKEKAALPWTQSGIFHAVYIGGGTPTDLSPEQVRVLGQAIHDYFPLASDCEITLE	156
	* : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
<i>piscicida</i>	GRINRFSDMFYSALEGGFNRFSGVQSFDTQVRRKAKRLDDREVVLDRVAALATDQAP	227
<i>damselae</i>	GRVNRFSDEMFDSEALEGGFNRFSGVQSFDTQVRRKAKRLDDREVVLDRVAALATDQAP	227
<i>profundum</i>	GRINRFTDMFDSALEGGFNRFSGVQSFDTQVRRKAKRLDDKDVLERIQALSSSESAP	233
<i>cholerae</i>	GRIRHFSDEMFEALEGGFNRFSGVQSFNTQVRRKAKRLDDREVVMERIASLAATQQAP	217
<i>vulnificus</i>	GRINRFSDMYDAMKGGFNRFSGVQSFDTLVRRSAKRLDDREKVLTRLSELASYDQAP	218
<i>paraahaemolyticus</i>	GRINRFSDELYQGALDGGFNRFSGVQSFNTQVRRSAKRLDDREDVLKRVSELAKEDKIP	216
	* : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
<i>piscicida</i>	IVIDLLYGLPYQTLVDWQQDLEDFMASGAHGVVDLYQLIEMGGTPMKNLIDKGKLPEPA	287
<i>damselae</i>	IVIDLLYGLPYQTLVDWQQDLEDFRASGAH--GVDLYQLIEMGGTPMKNLIDKGKLPEPA	285
<i>profundum</i>	IVIDLLYGLPYQTLVDWQQDLDNFDLDSGAH--GVDLYQLIEMGGTPMKQLVNGRLPEPA	291
<i>cholerae</i>	IVIDLLYGLPYQTAQVFQDLQDFMQTGAQ--GIDLQYLVVGGGAPMLNLVEKGKLPPPA	275
<i>vulnificus</i>	VIVIDLLYGLPHQTRDILLQDLNDFISTGAH--GLDLYQLVVGGSAPMLNLVEKGKLPPPA	276
<i>paraahaemolyticus</i>	VIIDLLYGLPYQTKIILEQDLNDFMSTGAH--GLDLYQLVVGGTAPMLNLVEKGKLPPPA	274
	: : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
<i>piscicida</i>	DTQTKATMFLMGHDYMSHHMRKLSVNHWARDNRERSLYNSLAKTTAEVLPLGAGAGGNI	347
<i>damselae</i>	DTQTKATMFLMGHDYMSHHMRKLSVNHWARDNRERSLYNSLAKTTAEVLPLGAGAGGNI	345
<i>profundum</i>	DTPTKATMFENGVMFMAKHMMRRKLSVNHWARDNRERSVYNSLAKTSAEVLPLGAGAGNV	351
<i>cholerae</i>	TPDKASLYQIGVEFMAKHHLRPLSVNHWARDNRERSLYNSLAKTYAEVLPIGCGAGGNM	335
<i>vulnificus</i>	TPDKASLYQIGVNFMRQHHLKQLSVNHWARDNRERSLYNSLAKTYAEVLPIGCGAGGSI	336
<i>paraahaemolyticus</i>	TPPEKAGMYELGVNFMFMAKHMMKQLSVNHWARDNRERSLYNSLAKTYAEVLPIGCGAGGNI	334
	* * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
<i>piscicida</i>	AGFGMMQHRTLDAYLAAIKRGELPIAMMTKANQASLHAEIKASFDRGVLRSLLDSIGG	407
<i>damselae</i>	AGFGMMQHRTLDAYLAAIKRGELPIAMMTKANQASLHAEIKASFDRGVLNRSSLDIGG	405
<i>profundum</i>	SGYGMQHRNLDTYMASVSKGEMPLMMMTKSAPLAALHAEIKASFDRGVLASLLRKALA	411
<i>cholerae</i>	GGYSLMQHRQLDLYLDAMKNGQLPLVAMMARQHEYDPLFAALKAGFDAGVIAKQLRPKFYH	395
<i>vulnificus</i>	GGYGMQHRSLDAYMAAINYGQLPLMMMTQQHPLAIFAALKSGFDRGVVMDKLPFEMG	396
<i>paraahaemolyticus</i>	GGYGMMLHRTLDTYIKAVNEGQSTIAMMMKHSPLPLFAALKSGFDRGIVQASKLPVFMG	394
	. * : : * * * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
<i>piscicida</i>	K-----GLYSSCLPLFKAWRENGLEVNSHYVTLTLAGQFWAVTLAQALIE	453
<i>damselae</i>	K-----GLYSSCLPLFKAWRENGLEVNSHYVTLTLAGQFWAVTLAQALIE	451
<i>profundum</i>	QQVMVNQIPVYMSIDVYDCLPLFQKWESHGLVDVNEYSLSLTLAQFWSVSLAQAMIE	471
<i>cholerae</i>	H-----QTFDWLMPFLRWQQIGLVEVEQDYLTTLTAGRFWSVSLAQACIQ	441
<i>vulnificus</i>	D-----NVDFLQPLFRLWQERGLVELNERSATLTLAGSFWAVSLAQACIQ	442
<i>paraahaemolyticus</i>	S-----DTFDLMPFMKVVQDKGLVELQERSLVLTLAGSFWAVSLAQACIQ	440
	: . * : * * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
<i>piscicida</i>	AITQQLNQSLAA-----	465
<i>damselae</i>	AITQQLNQSLAA-----	463
<i>profundum</i>	VLQQFLPAQAAA-----	483
<i>cholerae</i>	VLIHSYKYQQQRIIA---	455
<i>vulnificus</i>	ILSSEYQSAHQTAIAQ	459
<i>paraahaemolyticus</i>	VLTSSEMNESVPKVSNN-	456

Figura IV.55.-Alineamiento de la proteína HutW de *P. damsela* subsp. *piscicida*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *P. profundum*, *V. fischeri*, *V. vulnificus* y *V. anguillarum*.

<i>P. piscicida</i>	MNIKLSFIASSVLLAVSTPSLANSNN	EASIFDEVVSGTRSEQSVKNIPSTVSKVTAEQMEKNLATDVKQALKYEPGVTVNGRGRFCMQD
<i>P. damsela</i>	MNIKLSFIASSVLLAVSTPSLANSNN	EASIFDEVVSGTRSEQSVKNIPSTVSKVTAEQMEKNLATDVKQALKYEPGVTVNGRGRFCMQD
<i>P. profundum</i>	MNKKLTFIASSVFIASF--VLHAEAVS	FDEITVVSQTRSEQRKKNIPSSVAKITSEDMNLSNDVKDALKYEPGVTVNGRGRFCMED
<i>V. mimicus</i>	-MYKKSLLASAIVVALMP--SAYAEQSS	CNEVVVTARTSTONKQDVAASIDTSAQDIDNTLATDVKDALKYTPGVVEVKSGRSFCISG
<i>V. cholerae</i>	-MYKKSLSSAIIIALVLP--SAYADDYA	SFDEVVSTTRLNTQTITDASAASVAVINASDIQQMAEDIEGLFKYTPGVTLTNSRQGVQS
<i>V. parahaemolytic</i>	-MYNKSILSAILIALSQ--GAYAEHST	FNDEVVVTARTNSQIEDTAAASVAVTDKNIESMVTGLDDLFETTPGVTVKNSRQGVQS
<i>V. vulnificus</i>	-MYNRTLSAAILFALAT--PVQAQDAGL	FDEVVVSATRTNQTMDAVAASVTVISDKLISKMAKDLNDVFETTPGVTVINSTQRQGVQS
<i>P. piscicida</i>	FTIRGMSGNRVKMLIDGVEQPVSYNPG	-ADVMRKNSNTIEVDTLTAIEINKGPSSSLYGSDALGGTVFLRRTKNPEDMLGAGDDSH-VGVT
<i>P. damsela</i>	FTIRGMSGNRVKMLIDGVEQPVSYNPG	-ADVMRKNSNTIEVDTLTAIEINKGPSSSLYGSDALGGTVFLRRTKNPEDMLGAGDDSH-VGVT
<i>P. profundum</i>	FTIRGMSGSRVKVMVDGVEQPSSYNPG	-ADVMRKNANTFEVDTLTAIEVNKGPSLLYGSDALNLLGGTVLLRRTKNPEDLLEAGDDSH-VSLK
<i>V. mimicus</i>	FNIRGMEDSRILTVDGVOQPVGYNPD	-ASEQRKYSNAIEVDTLQATIEVNKGPSLLYGSDALGGTVLQFRRTKNPSVLLINDEGHRFGIK
<i>V. cholerae</i>	INIRGITEGRIKIVVDGVAQPNQFDSG	-NSFLNSRVDITDMMKSVETVKGAASSLQGSADIGGTVAFETKDPADFLK-CRNMG-GYAK
<i>V. parahaemolytic</i>	INIRGITEGRIKIVVDGVSQGNQFESG	-NTFINSARVNVDTDLIKAVEIKGAASSLHGSDAIGGTVAFETKDPADFLK-SRNFG-GHAK
<i>V. vulnificus</i>	INIRGMEGRVKILVDGASQPGVFDGGPYSF	INSASVSDPDMKSVETVKGAAASSLHGSDAIGGTVAFETKDPADFLKNGKVFG-GQAK
<i>P. piscicida</i>	SGYSSADEQYKLGFEVANRTGDLE	SMLIITYRNGHETDTYKDSNEIGDARKAANPFDIASHNVLAKIFYOINGANRVGFTAEYYTRSDA
<i>P. damsela</i>	SGYSSADEQYKLGFEVANRTGDLE	SMLIITYRNGHETDTYKDSNEIGDARKAANPFDIASHNVLAKIFYOINGANRVGFTAEYYTRSDA
<i>P. profundum</i>	TGYRSVSDGVKATIEVANRTGDLE	SMLIITYRNGHETDTYKDSNEIGDARKAANPFNITSHNVLAKIFYOINGANRVGFTAEYYTRSDA
<i>V. mimicus</i>	STYTSVDEQFKNTLTWAMRQGGKLE	TLLMATYAAQGHETKSHDGSADIEGPGRLTNPADTELGNLLAKAQYQANEDHRFGLTVEHYTKNYD
<i>V. cholerae</i>	LNYSDDKTFSESIALANKSGDLE	SLVAYTRRDGQEIQNGFSP-----DQDNNANLLVKLQYQVLPKHLRLESGNYIRKNKD
<i>V. parahaemolytic</i>	FNYSSEDNTFSESVALANKTGDLE	SLVAYTRRDGQELDNFGDL-----ADASTEANLLVKLQYQVNDARHVEFNGNYIRKNKD
<i>V. vulnificus</i>	LSYSSDEKSFSEHVAVAKRFDNVE	ALVAYTRRDGQELQNFESKAPYDDYP---VESQDYVKNDLLKQLSQLSDDHRLLEFLGEVIYNQND
<i>P. piscicida</i>	GRISSDGKTISMPPMPPIIMYS	NNRADDHRLRLGLEHEWLAEIAAFDSLEWKLNWTESESKHNSYDKTNY-----YGNRN
<i>P. damsela</i>	GRISSDGKTISMPPMPPIIMYS	NNRADDHRLRLGLEHEWLAEIAAFDSLEWKLNWTESESKHNSYDKTNY-----YGNRN
<i>P. profundum</i>	GQIISRNQVGGGG-FMPGFVYT	NNSADKDERVRLGFEHEWLADNVAFDSLEWKLNWTESESKHNSYDKTNG-----YGNRD
<i>V. mimicus</i>	EDELNYNGYA-----IMPGFVYS	NNYNEDVNKRTRISLSDHQLMDTLTLLVQSLVTLQYQDSSLTNNKYDTTPS-----SGARM
<i>V. cholerae</i>	LENLEFSGYK-----NASGTDETT	QYQLGKIHWDIAEFSLADRTITWQFDVVGKEETGITDRTSKS-----NGNIQK
<i>V. parahaemolytic</i>	GK-QSYNGYT-----NATSEVDTE	QYQVGIHWAMQTLADSLTWQLDWLSKEENGITDRVK-----GQNIQR
<i>V. vulnificus</i>	SD-IASSYK-----NFNSED	TTKQNRGLKHIWLVDTTITDSITSLTLTWDKEENGLTNRKFESAGVPPRPVPPNGDNQKQ
<i>P. piscicida</i>	RYRDGTDDTITQDLMKKELELANNR	HEITYGVSGTNTFDITYTDYNLDKGTSLKLGPEEVPKSKSEKRAVFDQMFMLDEKLVTITAGL
<i>P. damsela</i>	RYRDGTDDTITQDLMKKELELANNR	HEITYGVSGTNTFDITYTDYNLDKGTSLKLGPEEVPKSKSEKRAVFDQMFMLDEKLVTITAGL
<i>P. profundum</i>	RARSGETDSTQDQFQKEITQFTN	NRHEITYGLSADATFDLDYDLYDSGTSPKSGTEVPKSESEKRGIFVQDQYLLDEALVVTITAGL
<i>V. mimicus</i>	RERDSADKAVQFDVQLNKLITD	TGLSHDVTYGGSYLNNAFSLQNTDHYLYKTGTSTRNGSTGVPDADIIKWGLFAQDQMYFLDEQLILITAGL
<i>V. cholerae</i>	KDYLYSDKGSFDSQDKSFMVSN	TEHYIVYGFSLSDKDIENTNQEFMS--IGKNNVIFYIPNASEKRYGFFIQDEIAFDN--LIVTPGI
<i>V. parahaemolytic</i>	KDYIYEDEGYQFDSQFDKYLSL	GSTEHYFVYGASFSDKDKIKNVNKEYNS--ASANKEIFYIPASERRYLGLQDEITVGN--FTITPGV
<i>V. vulnificus</i>	KDYQYAEINKIELETFQDKLE	ET---HYLVYGLSYKTSRISNTNREFNSDPNTPDKIYVYTPDAKEMSFLFFQDEISVLNDKLVITPGV
<i>P. piscicida</i>	RYDDYQAEFD-----SDTL	LDHKSDAFTGRLGAVYHFTDNFSTYGGFTQGFRAPTIHELHYDKNELAHGYKVISNPNLKPESDA
<i>P. damsela</i>	RYDDYQAEFD-----SDTL	LDHKSDAFTGRLGAVYHFTDNFSTYGGFTQGFRAPTIHELHYDKNELAHGYKVISNPNLKPESDA
<i>P. profundum</i>	RYDDYQAEFD-----SSGLE	EDHNSDAFTSRLGAVYHWNQHFSTYAGYEGFRAPSIYELDYKDNTHAGYKVISNPNLKPESQS
<i>V. mimicus</i>	RYDSFEATPKTD-----SAFTTE	YKPNKNDATFGLGAVYHLQDNLAVFGQISQGFKAFTVYDLYFFYN---QGAIEANPLKAERSIA
<i>V. cholerae</i>	RFDSFETKPGDTSANPSLNDASEY	KYSDSALTARLGTIVYKLQENRFLAQISQGFRAPDFQELYYSFGNPAHGYVFKPNPNLEAEDSVS
<i>V. parahaemolytic</i>	RWDAFETDPGDTSNPSGNAASDY	KFSDSAFTGRLGSVYKLNEQHRLFAQISQGFRAPDFQELYYSFGNPMHGYIFKPNPLKAEDSIS
<i>V. vulnificus</i>	RYDYFSTDPSTVDDES-----	FIKFSDAFTGRLGATYKVAQEGTLFTQISQGFRAPSFNELYTYDNPNGHYTNRPNPLESEKSLS
<i>P. piscicida</i>	VELGLRLNGLHGSVATSVFYNNY	KNFIKDVTITYDSNNI---QITTNENVDKAKTYGAELKTSIWLDEALNAPMGTYANFSVAYTRGEDK
<i>P. damsela</i>	VELGLRLNGLHGSVATSVFYNNY	KNFIKDVTITYDSNNI---QITTNENVDKAKTYGAELKTSIWLDEALNAPMGTYANFSVAYTRGEDK
<i>P. profundum</i>	YEIGLRANNNVGALELSAFYNDY	TNFIKSTVN-TGGI---DITTNENVDEAEIYGAELKSLWLDEAVGAPMGSYARLSLAYLDGEDK
<i>V. mimicus</i>	YEIGTRGNAYGNMEFALFYNDY	KDFITQTKTGQSGGK---DVTSKYNNDEVQTYGAELFSLDLTISPLPQGSYARLSIAYAHGEDK
<i>V. cholerae</i>	YELGWRYNADSVSNELSIIFYSDY	NFIDSQIVSGSFK--TRDAVHQSNINDKATIKGIELSNQFFWDRFMPI-VGFSRIAAYTECKD-
<i>V. parahaemolytic</i>	YEFGRWRHNNDISSESVFYSDY	NFIKSTVSGTWPVTDPAIQQYVNIKGATIKGIEFSNQLSWNKFMPI-EGFSRIAAYTEGED-
<i>V. vulnificus</i>	YELGYRHNTIASTSEIALYSDY	TDIEQTSRGGGL----TEYTVNISEATIKGIEVSNLTDLNRIANLPLGMMTRFVAAYTVGED-
<i>P. piscicida</i>	KTGRELDTVAPLTAVLGLGYD	SPDEMGGVVDVTMVATKDKWQEEH-----FNTPGYTVVDMTITYRPSKDLTVRAGLFNAFDKK
<i>P. damsela</i>	KTGRELDTVAPLTAVLGLGYD	SPDEMGGVVDVTMVATKDKWQEEH-----FNTPGYTVVDMTITYRPSKDLTVRAGLFNAFDKK
<i>P. profundum</i>	NTGKTLDTIAPFTSVVGLGYD	APSEQWGSANVTMVASKTDWEQDDN-----LDASSYTVVDTLTAAYRPMKDLTVRAGLFNALDEK
<i>V. mimicus</i>	ATGKEIDTIVAPLTSVLGLGYE	QAD--FGSALNVKMWASKNWEQVENN-----LDVAGYAVVDLAAYYVPVKDLTVRAGLFNLFDEK
<i>V. cholerae</i>	GNGKPLNSVSPWNAVGTGINYD	SENN-WGTAVNLTYYAKKKASEINGD-----YQPISSATVLDVTAAYKPIKDLTVRAGLFNLTDEE
<i>V. parahaemolytic</i>	GNNNPLNSVNPWNLVAGFN	YDSEQN-WGTTLTINYTASKDKSDINDDK-----VLPISATVVDITAYYKPIKDLTVRAGLFNLTDEE
<i>V. vulnificus</i>	GEGNPLNSVNPWNVAGVNYD	APNTLWGTSTIKVNYTAKKSNSDINLDGNNGGTANQVELPSATVLDITAYFKPTQDVTVRAGIMNLTNEK
<i>P. piscicida</i>	YWQYQNVDSIIVGKENFNCKT	EPGRNWGVNVKYDF
<i>P. damsela</i>	YWQYQNVDSIIVGKENFNCKT	EPGRNWGVNVKYDF
<i>P. profundum</i>	YWEYQDLEKGTASTQGIDRR	TQPGRNWGVNLYNDF
<i>V. mimicus</i>	YWNYSIDISGKTGTERFN	DYDTQPGRNWGVISLDYQF
<i>V. cholerae</i>	YYNWNDRGLPSEDKDK---	TQAKRNFGITAKYEF
<i>V. parahaemolytic</i>	YYNWNDRGLQDENKDL---	TQAGRNWSITAKYEF
<i>V. vulnificus</i>	YYLWNDIRGEKELSRDL---	TQAEARNYISVKYEF

Figura IV.56.-Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas HutA de *P. damsela* subsp. *piscicida* y subsp. *damsela* con la de siete proteínas que actúan como receptores de grupos hemo en especies de *Vibrio* y *Photobacterium*. Las zonas sombreadas oscuras muestran un 100% de residuos idénticos entre las siete secuencias. Las zonas sombreadas más claras muestran identidad en al menos un 60% de las secuencias. El cuadro amarillo delimita la caja TonB.

4.3.4. Análisis transcripcional del sistema de captación de grupos hemo

4.3.4.1. Organización transcripcional de los 9 genes del sistema

Seis de los genes del sistema de captación de grupos hemo se transcriben en la misma hebra de DNA, mientras que los tres restantes se transcriben en la hebra complementaria. La organización génica sugiere la existencia de dos operones en el *cluster* de genes del sistema de captación de hemina, que podrían estar regidos por dos secuencias promotoras localizadas antes de los genes *tonB* y *hutW* respectivamente. Para confirmar esta hipótesis, la posible cotranscripción de los genes *tonB**exbBD**hutBCD* se ensayó en una reacción de RT-PCR con un cebador (**RT-1**) localizado en el extremo 3' del gen *hutD* (*hutD* 3'1), y se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando este cDNA como molde y utilizando cebadores que amplificaban los genes *tonB* (**A**) (*phuseqA/deltonB2*), *exbB* (*prom-exbDXba-5'/exbDepxpr3'*) (**B**) y *hutB* (*hutB5'1/hutB5'4*) (**C**) respectivamente (Figura IV.48). Así, se detectaría la existencia de un transcrito desde el extremo 3' del gen *hutD* hasta el del gen *tonB* (PCRs **A**, **B** y **C** positivas), o varios más pequeños (PCR **A** negativa) en el caso de que todos estos genes no constituyan una unidad transcripcional. La PCR realizada con estas combinaciones de cebadores debería rendir fragmentos de amplificación de 260 pb (**A**), 650 pb (**B**), y 137 pb (**C**).

Para comprobar la posible cotranscripción de los genes *hutWXZ*, la RT-PCR se llevó a cabo con un cebador del extremo 3' del gen *hutZ* (*hutA DI21-5'2*) (**RT-2**). A continuación se realizó una PCR con los cebadores *phudams3'-delhutX.1* (**D**), que debían amplificar una zona de 176 pb. El diseño de la estrategia de RT-PCR realizada se refleja en la Figura IV.57, y los productos resultantes de ambas PCRs se reflejan en la Figura IV.58.

Como se observa en la Figura IV.58, cada una de las reacciones de RT-PCR rindió un producto del tamaño esperado. Los controles positivo y negativo que se llevaron a cabo, garantizaron la fiabilidad de los resultados obtenidos (datos no mostrados).

Este resultado demuestra que los nueve genes del sistema de captación de hemina, se organizan en dos operones génicos. El primero de ellos formado por los genes *tonB-exbB-exbD-hutB-hutC-hutD* y el segundo formado por *hutW-hutX-hutZ*.

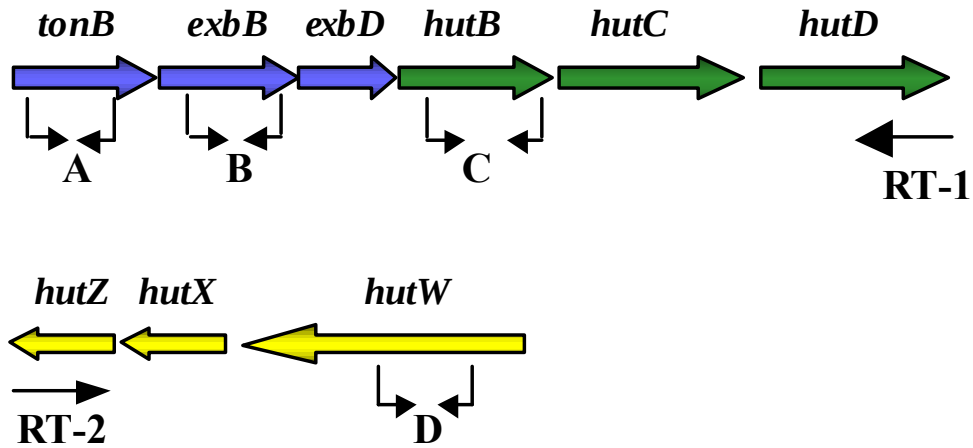


Figura IV.57.-Diseño de la estrategia de RT-PCR realizada para determinar la organización transcripcional de los genes de captación de grupos hemo de *P. damsela*.

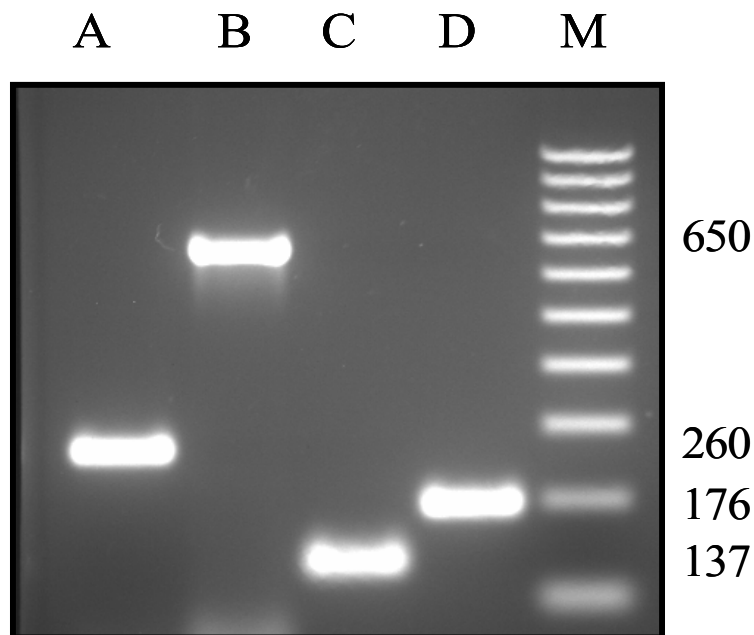


Figura IV.58.-Resultado de la PCR realizada utilizando como molde los cDNAs resultantes de las RT-PCRs diseñadas en la figura IV.57. Las letras de cada carril señalan cada una de las PCRs indicadas en la figura IV.57. M se corresponde con el marcador de peso molecular con incremento de 100 pb.

4.3.4.2. Regulación por hierro de la transcripción

4.3.4.2.1. RT-PCR

Una vez conocida la organización transcripcional de los genes implicados en la captación de hemina, se trató de estudiar el nivel de transcripción de éstos en función de las condiciones de hierro del medio. Para ello, tras extraer los productos resultantes de la transcripción (RNA) a partir de cada una de las cuatro condiciones de cultivo preparadas, como se explicó en materiales y métodos, se llevaron a cabo tres RT-PCRs. La primera de ellas (RT-1) desde el extremo 3' del gen *hutA*, la segunda (RT-2) desde el extremo 3' del gen *hutZ* y la tercera desde el extremo 3' del gen *hutD*. Posteriormente se llevaron a cabo las reacciones de PCR con las combinaciones de cebadores 1, 2 y 3 (Figura IV.59).

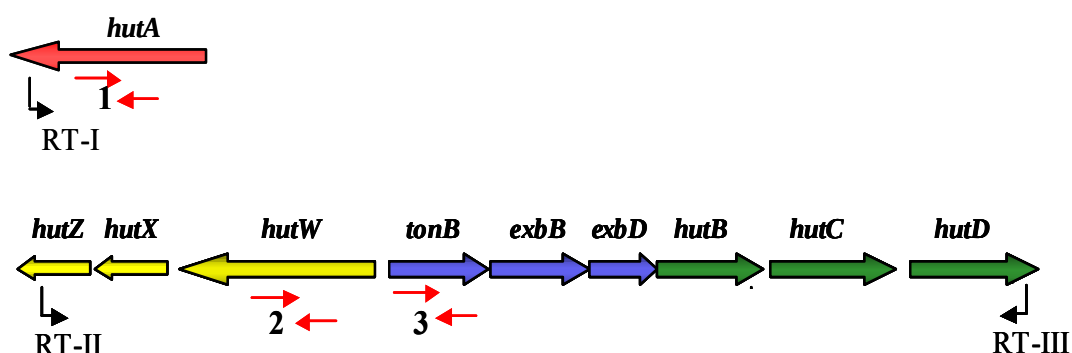


Figura IV.59.-Localización de los cebadores utilizados en el análisis de la regulación por hierro de los promotores de los genes *hutA*, *tonB* y *hutW* de *P. damsela*.

Estos promotores podrían en principio estar regulados o no por el hierro presente en el medio. En el caso de estar regulados por hierro, la regulación se puede llevar a cabo negativamente, es decir, que la presencia de éste implique que se reduzca el nivel de transcripción del gen, o positivamente, y que por lo tanto suceda todo lo contrario. La transcripción del gen del RNA 16S no está regulada por hierro, por lo cual se utilizó como control.

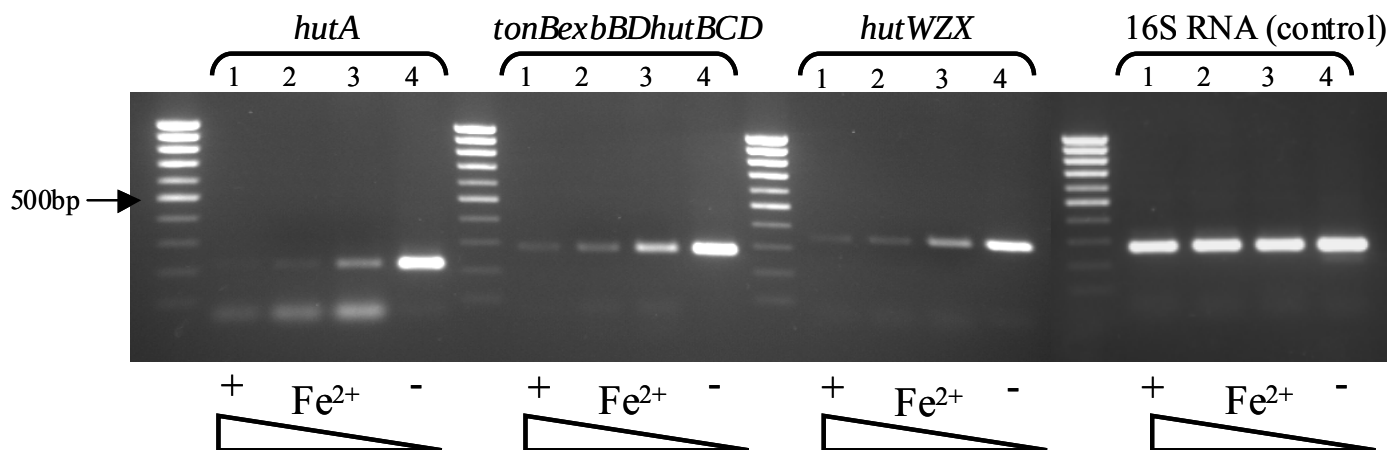


Figura IV.60.-Regulación dependiente de hierro de los niveles de transcripción de los operones *hutA*, *tonB-hutD* y *hutW-hutZ*. De las filas 1 a las 4, los niveles de hierro van disminuyendo progresivamente: (1) TSC-1 + $FeSO_4$, (2) TSC-1, (3) TSC-1 + 100 μM de 2,2' dipiridyl, (4) TSC-1 + 300 μM de 2,2' dipiridyl.

Como se aprecia en la Figura IV.60, a medida que la cantidad de hierro del medio disminuye, los niveles de transcripción van aumentando significativamente en los tres operones génicos *hutA*, *tonB-hutD* y *hutW-hutZ*. Esto indica que el hierro ejerce una regulación negativa sobre los promotores de cada uno de estos tres operones. Así, cuando la bacteria cuenta con abundancia de hierro en su entorno, los genes implicados tanto en el transporte como en la adquisición de grupos hemo del exterior celular se hallan reprimidos, mientras que si se ve limitada la cantidad de este elemento, se producirá una activación de la transcripción de los mismos.

Este experimento apoya el resultado del análisis realizado “*in silico*” de la región promotora de los tres operones génicos *hutA*, *tonB-hutD* y *hutW-hutZ*, donde se localizaron secuencias altamente similares a la “caja Fur” consenso (Figuras IV.37 y IV.61).

El resultado obtenido con el gen del RNA ribosómico 16S, donde tal y como se esperaba los valores de expresión no varían en ninguna de las cuatro condiciones, confirma la validez del experimento.

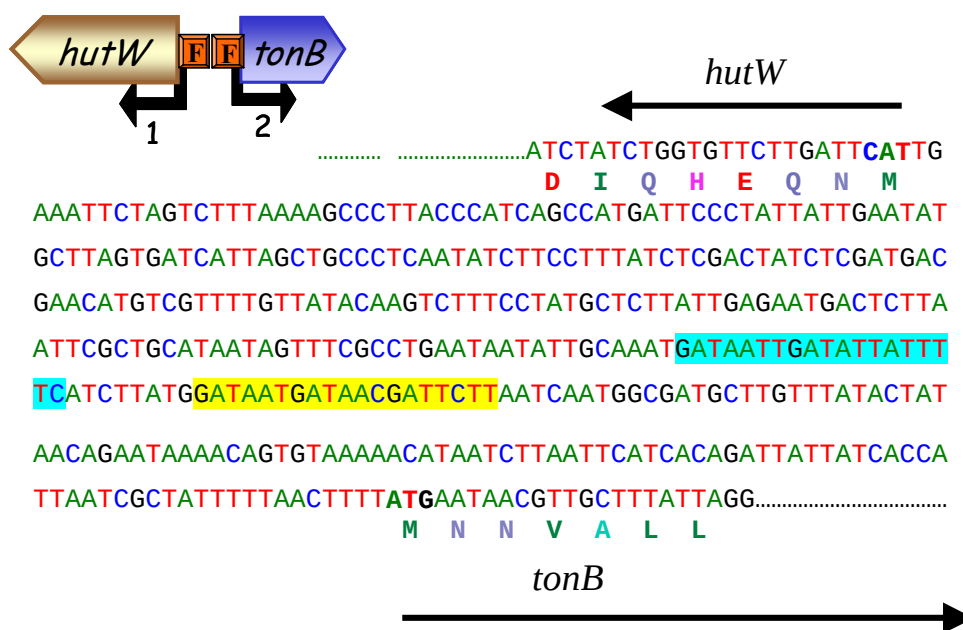


Figura IV.61.Regiones promotoras de los genes *hutW* (1) y *tonB* (2) de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Las "cajas Fur" de cada uno de ellos se señalan en azul (*hutW*) y amarillo (*tonB*).

4.3.4.2.2. Ensayo FURTA

En un apartado anterior se describió la caracterización de una secuencia en el promotor del gen *hutA*, que mostró una elevada similitud con la secuencia consenso de la caja Fur de *E. coli*, y por tanto podría tratarse de un lugar de unión del represor Fur. Con el objetivo de determinar si la regulación de la expresión de *hutA* en función de las condiciones de hierro del medio puede estar mediada por la unión de la proteína Fur (*Ferric Uptake Regulator*) al promotor de *hutA*, se llevó a cabo un ensayo FURTA. La cepa de *E. coli* H1717 complementada con el plásmido pSJR29 (gen *hutA* completo), creció formando colonias rojas en las placas de agar MacConkey, es decir con fenotipo lac^+ (Figura IV.62). Este resultado confirma la funcionalidad de la "Fur-box" localizada en la región promotora del gen *hutA* de *P. damsela*.

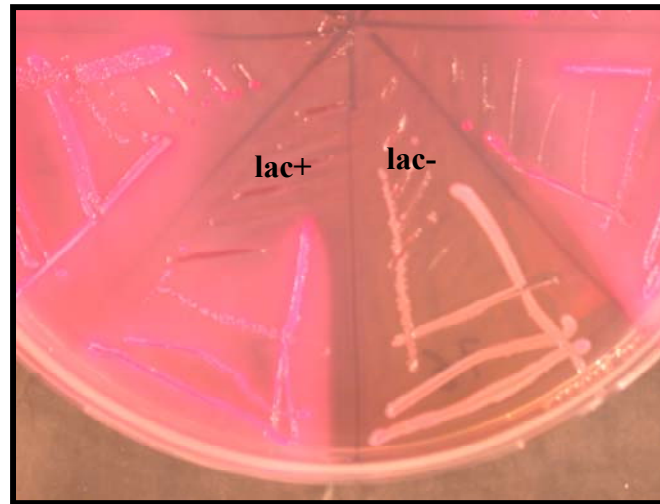


Figura IV.62.-Fenotipo lac^+ (colonias rojas) de la cepa de *E. coli* H1717 complementada con el plásmido pSJR29 en placas de agar MacConkey.

4.3.4.2.3. Fusiones LacZ

Para medir la actividad de la expresión del promotor del gen *hutA*, y su relación con la presencia o no de hierro en el medio, se llevó a cabo una construcción génica entre el promotor del gen y el plásmido pHRP309 que dio lugar a la cepa CS30. Se realizaron dos tipos de cultivo, uno con exceso y el otro con defecto de hierro tal y como ya se describió. Las cepas testadas fueron la DH5 α con el pHRP309 pero sin ningún promotor clonado (que hace la función de control negativo), y la CS30. El crecimiento de las bacterias se paró a las siguientes DO:

Cepa	FeSO ₄ 10 μ M	2,2'-dipyridyl 100 μ M
DH5 α	0,300	0,304
CS30	0,324	0,327

Las absorbancias medidas a 420nm para determinar la actividad β -galactosidasa fueron:

Cepa	FeSO ₄ 10 μ M	2,2'-dipyridyl 100 μ M
DH5 α	0,321	0,318
t (min)	40	40
CS30	0,862	1,7
t (min)	16	4

Tras aplicar la fórmula para hallar las unidades Miller de β -galactosidasa, se obtuvieron los datos que se reflejan en la Figura IV.63.

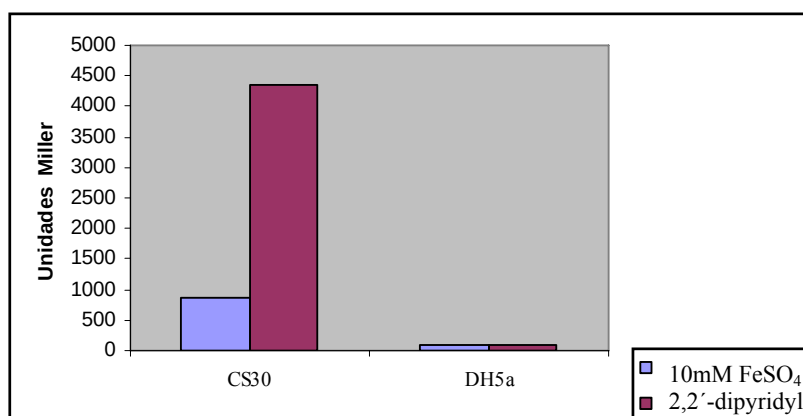


Figura IV.63.-Análisis transcripcional del promotor del gen *hutA* utilizando fusiones *lacZ*. Las barras indican la actividad β -galactosidasa en unidades Miller de los cultivos crecidos bajo diferentes condiciones.

La cepa utilizada como control (DH5 α) exhibió bajo cualquiera de las dos condiciones de cultivo, y tal y como era de esperar, una actividad β -galactosidasa prácticamente indetectable.

En el caso de la cepa CS30, se observaron niveles muy altos de actividad β -galactosidasa cuando ésta se cultivó en un medio pobre en hierro, pero cuando se añadió un exceso de hierro al medio la actividad decreció de forma sustancial, indicando por tanto la represión del promotor. Este resultado se correlaciona con los obtenidos tanto en el experimento de RT-PCR, como en el FURTA, demostrando que la transcripción del gen *hutA* está reprimida en presencia de hierro.

4.3.4.2.4. Expresión del operón *tonBexbBDhutBCD* *in vivo*

Se analizó la expresión del sistema de captación de hemina en muestras procedentes de siete peces inoculados de modo individual con *P. damsela* subsp. *piscicida*. Los peces comenzaron a morir 72 horas después de la infección experimental y el quinto día habían muerto todos. La bacteria pudo recuperarse en cultivo en todos los casos a partir de muestras tanto del bazo como del hígado. El RNA extraído de estos tejidos se sometió a análisis por RT-PCR utilizando el cebador delhutD3'1.

Como control positivo se confirmó la expresión constitutiva del gen del rRNA 16S de *P. damsela* subsp. *piscicida* en todas las muestras de tejido estudiadas, ya que la PCR realizada utilizando como molde el cDNA obtenido tras la RT-PCR, rindió el producto de amplificación esperado de 267-bp en todas las muestras.

La PCR realizada con los cebadores internos lacZhutB5'1 y exbD-expr-3' rindió también el producto esperado de 230-bp (Figura IV.64) con lo cual se puede afirmar que en todos los ejemplares se expresaban los genes *tonBexbBDhutBCD*. Como control negativo, se realizaron dos PCRs, la primera utilizando como molde el RNA extraído de los peces inoculados y tratado con DNasa y la segunda utilizando el RNA extraído del bazo de peces no infectados. En ambos casos se utilizaron los mismos cebadores internos y no se obtuvo producto de amplificación. Así, se puede afirmar por un lado que ninguno de los RNAs extraídos a partir de los peces enfermos se encontraba contaminado con DNA de *P. damsela*, y por otro que no se ha producido ninguna amplificación inespecífica por interferencia del RNA de los tejidos de rodaballo utilizados como muestra.

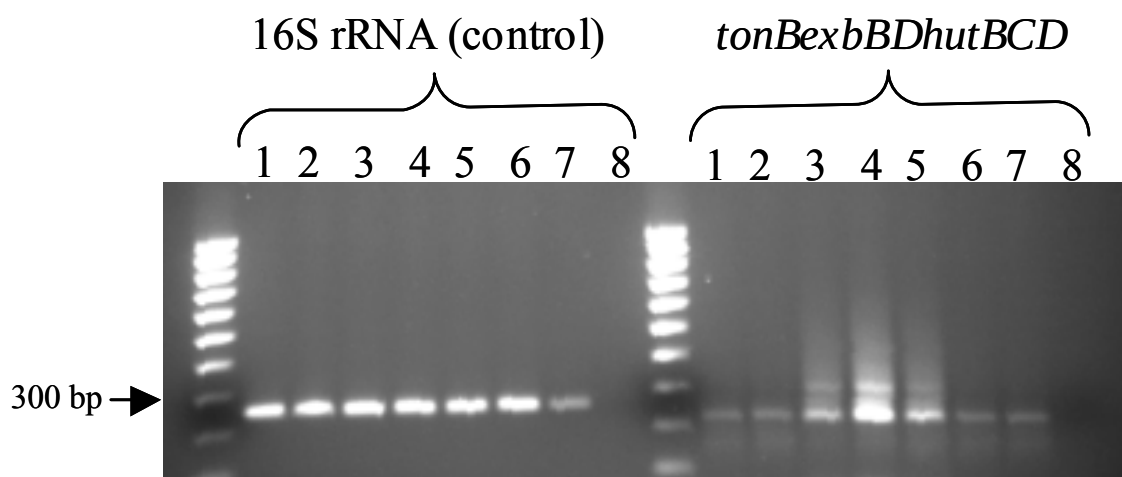


Figura IV.64.-Detección de la expresión del operón génico *tonBexbBDhutBCD* por RT-PCR en siete peces inoculados experimentalmente con la cepa DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Los fragmentos amplificados en cada unidad transcripcional son los siguientes: transcrito del rRNA 16S, un fragmento interno del gen del rRNA 16S de 267 pb; transcrito de *tonBexbBDhutBCD*, un fragmento interno del gen *hutB* de 230 pb. Las líneas 1-7 denotan los siete especímenes. La línea 8 es el control negativo realizado con el pez no inoculado.

4.4. Discusión

La virulencia de los microorganismos patógenos es un proceso complejo en el que generalmente se requiere la acción coordinada de muchos genes.

Uno de los principales factores de virulencia reconocidos lo constituyen los sistemas de captación de hierro mediante sideróforos (Crosa y Walsh, 2002). Por otro lado, en muchos microorganismos coexisten otras formas de obtención de este elemento cuando aparece asociado por ejemplo a proteínas como la hemoglobina, la lactoferrina, al citrato etc. Dada la inexistencia de información acerca de la base genética de los mecanismos de captación de hierro en *P. damsela*, nos hemos planteado llevar a cabo un estudio del mecanismo de adquisición del grupo hemo como fuente de hierro.

Estudios previos ya habían demostrado la importancia de la capacidad de *P. damsela* subsp. *piscicida* para utilizar el hierro a partir de hemina y hemoglobina del hospedador como factor de virulencia, pero sin aclarar las bases genéticas de este proceso (Magariños *et al.*, 1994c). En el presente trabajo hemos llevado a cabo la caracterización genética del sistema responsable del transporte y la utilización de grupos hemo en *P. damsela*.

4.4.1. Organización genética del sistema de transporte de hemo en *P. damsela*

La organización genética observada en el cromosoma de *P. damsela* es muy similar a la descrita para especies del género *Vibrio*. La disposición de los genes *tonB*, *exbB*, *exbD*, *hutB*, *hutC* y *hutD* en este género aparece documentada sólo en algunas especies, pero todas ellas tienen en común que todos estos genes aparecen agrupados. Esta misma distribución se describió también en otras bacterias como *Plesiomonas shigelloides* (Henderson *et al.*, 2001). Esta disposición, sin embargo, no aparece conservada en otras especies bacterianas. Por ejemplo, en *E. coli*, los genes *exbB* y *exbD* están juntos, pero separados de *tonB* (Bachmann, 1990).

En *V. cholerae* se han descrito dos sistemas TonB físicamente separados el uno del otro, en cada uno de los cromosomas de la bacteria (Occhino *et al.*, 1998). El primer grupo de genes (*tonB1*, *exbB1*, *exbD1*) forma parte de un operón que incluye otros tres genes implicados en el transporte de grupos hemo (*hutBCD*) y cuyo promotor,

localizado “corriente arriba” de *tonB1*, se encuentra regulado por la acción de la proteína represora Fur. El segundo grupo de genes es requerido para la utilización de enterobactina (*exbD2*, *exbB2*, *tonB2*). Estos dos sistemas muestran la importancia de los sistemas de adquisición de hierro en la supervivencia de los patógenos. Se ha localizado también un segundo sistema TonB en *P. damsela* subsp. *piscicida* (Osorio *et al.*, 2004b) utilizando la técnica FURTA. En *V. anguillarum* existen dos sistemas TonB (Stork *et al.*, 2004); ambos intervienen en el transporte de hemo pero sólo el sistema TonB2 es esencial para el transporte de anguibactina y la virulencia de la bacteria. Se ha demostrado también la existencia de dos sistemas TonB en *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* (O'Malley *et al.*, 1999), y en las no vibrionáceas *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa* y *Pasteurella haemolytica*.

Esta organización genética tan similar puede ser reflejo de una transferencia horizontal de genes. Una consecuencia de la frecuente transferencia horizontal que tiene lugar entre los sistemas implicados en la adquisición de hierro, es el hecho de que a menudo se unen formando grandes loci, en ocasiones con diversos sitios de unión de Fur entre ellos. De todos modos, el alineamiento es a menudo muy diferente entre especies, algunos genes desaparecen, o bien aparecen otros nuevos. Incluso en ocasiones se modifica el sitio de unión de Fur ligeramente (Panina *et al.*, 2001).

El sistema TonB

En este estudio se partió de los genes que integran el sistema TonB1, ya que se consideró un buen comienzo para la posterior caracterización de los genes que probablemente estarían adyacentes en el cromosoma bacteriano. Así, en primer lugar se llevó a cabo la identificación y caracterización estructural del grupo de genes *tonB-exbB-exbD* de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Las tres proteínas que componen el sistema TonB están localizadas en la membrana citoplasmática. La proteína ExbB presenta tres dominios transmembrana. Su extremo N-terminal se sitúa en el periplasma, pero la mayor parte de la proteína se localiza en el citoplasma. TonB y ExbD se ubican en el periplasma, y sus extremos N-terminal, se anclan en la membrana citoplasmática (Braun y Killmann, 1999). Así, la proteína TonB interacciona con el complejo ExbB-ExbD por su extremo N-terminal y con los receptores de membrana externa por el extremo C-terminal (Moecky Coulton, 1998) (Figura IV.65).

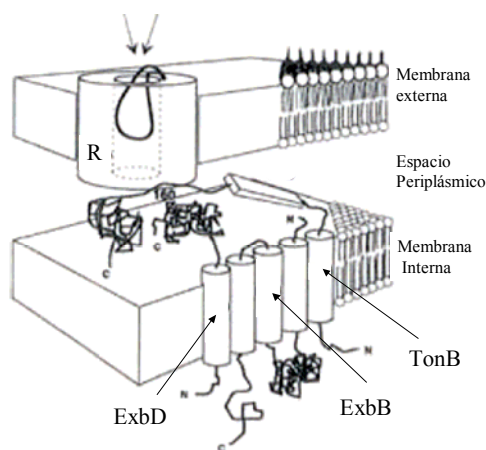


Figura IV.65.-Representación esquemática de las proteínas TonB, ExbB y ExbD y su relación con los receptores (R) de membrana externa.

Al realizar una comparación entre las secuencias obtenidas en este estudio con las depositadas en las bases de datos, se comprobó la existencia de una homología significativa entre las proteínas ExbB y ExbD de *P. damsela* subsp. *piscicida* y sus equivalentes en otras especies de bacterias gram negativas. En lo que se refiere a la proteína TonB, ésta resultó ser muy semejante a la proteína TonB de la subespecie *damsela*, aunque se detectó sin embargo, una similitud mucho menor con respecto a la mayoría de las especies analizadas.

Se analizó *in silico* la región operadora del gen *tonB* para tratar de identificar alguna secuencia que pudiera estar relacionada con el control de su expresión génica. De este modo, entre las posiciones 110-140 anteriores al codón de inicio del gen *tonB*, se identificó la secuencia GATAATGATAACGATTATC que se asemeja a la caja Fur de *E. coli* (Escolar *et al.*, 1999).

Existe también una abundancia de residuos de prolina y de lisina. En la proteína TonB de *E. coli* se han encontrado regiones ricas en prolina que consisten en secuencias repetitivas de (Glu-Pro)_n y (Lys-Pro)_m (Larsen *et al.*, 1993). Parece ser que estas regiones son necesarias para la ubicación de TonB en el periplasma. Se han localizado regiones ricas en residuos de prolina en *Pseudomonas aeruginosa* (Poole *et al.*, 1996), *P. putida* (Bitter *et al.*, 1993) y *Xanthomonas campestris* (Wiggerich *et al.*, 1997). En la proteína TonB de *P. damsela* subsp. *piscicida* descrita en este estudio, se han evidenciado regiones ricas en prolina y regiones ricas en lisina, pero no se han encontrado las secuencias repetitivas descritas en *E. coli*.

Es destacable la corta distancia intergénica (solamente 2 pb) entre el gen *tonB* y el gen *exbB*, así como la existencia de un solapamiento del inicio de traducción del gen *exbD* y el codón de final de lectura del gen *exbB*. Una situación similar se ha descrito en especies relacionadas como *V. cholerae*, en la que los codones de inicio y parada entre *tonB-exbB* y *exbB-exbD*, se solapan (Occhino *et al.*, 1998). Todo esto es indicativo de que estos tres genes deben formar una única unidad transcripcional. Aun así, la pertenencia de estos tres genes a un único operón no puede deducirse tan sólo a partir de la secuencia sino que serían necesarios experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis.

El sistema TonB está ampliamente distribuido en las bacterias gram-negativas, y su organización genética coincide con la de *P. damsela* en *Neisseria meningitidis* (Stojiljkovic y Srinivasan, 1997), *Bordetella pertusis* (Pradel *et al.*, 2000), *Xantomonas campestris* (Wiggerich *et al.*, 1997), uno de los dos sistemas de *V. cholerae* (Occhino *et al.*, 1998), *Plesiomonas shigelloides*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, y *V. parahaemolyticus* (Mouriño *et al.*, 2004). En *Haemophilus influenzae* (Jarosik *et al.*, 1994) y *H. ducreyi* (Elkins *et al.*, 1998), *Pseudomonas putida* (Bitter *et al.*, 1993), *Pasteurella haemolytica* (Graham y Lo, 1997), *Helicobacter pylori* (Worst *et al.*, 1999) y el segundo sistema de *V. cholerae* el orden de estos tres genes es *exbB-exbD-tonB*. En *P. damsela* (Osorio *et al.*, 2004b), así como en *V. cholerae*, se ha descrito la presencia de dos sistemas TonB denominados TonB1 y TonB2. En el caso de *V. cholerae*, se ha demostrado que ambos son funcionales y participan en la captación de hierro. Mutaciones en uno de los dos no impiden la asimilación de hierro en *V. cholerae*, siendo necesarias mutaciones en ambos para lograr un fenotipo TonB⁻. Es posible que estos dos sistemas tengan mecanismos redundantes y que su duplicación se deba a un mecanismo de seguridad. Sin embargo, se han descrito dos tipos de cajas TonB en diferentes receptores de hemina de *V. cholerae*, que podrían ser reconocidas preferentemente por TonB1 o TonB2, por lo que tal vez uno de ellos esté especializado en la captación de hierro a partir de una fuente determinada o en un momento concreto del ciclo infeccioso (Mey y Payne, 2001).

Se han encontrado proteínas homólogas a la proteína TonB de *E. coli* en una gran variedad de bacterias gram negativas, hecho que sugiere que este sistema está ampliamente distribuido y conservado a lo largo de su proceso evolutivo (Higgs *et al.*, 1998). De todos modos, la proteína TonB de *P. damsela*, resultó ser la menos conservada de las tres descritas en este sistema TonB1. Las bacterias gram positivas, al

carecer de membrana externa, no necesitan este sistema de transducción de energía y tienen los receptores anclados directamente en la membrana citoplasmática mediante uniones covalentes (Braun y Killmann, 1999).

La proteína HutB y el sistema de transporte ABC

La proteína HutB de *P. damsela* comparte una gran similitud con proteínas periplásmicas de otras especies bacterianas responsables de la unión del hemo, previamente introducido por el receptor de membrana externa. La mayoría de estas proteínas están formadas por dos dominios globulares conectados por una pequeña cadena polipeptídica, de tal manera que se facilita el movimiento de ambos dominios por un “mecanismo de bisagra” (Clarke *et al.*, 2001). De este modo, el grupo hemo una vez captado del medio, sería cedido por el receptor de membrana externa a la proteína HutB de *P. damsela* que a su vez se lo cedería a un sistema de transporte ABC situado en la región citoplasmática de la membrana celular interna (Earhart, 1996). Este sistema está constituido por una permeasa de transmembrana (HutC) y una ATPasa (HutD), ya que la translocación del grupo hemo a través de la membrana citoplasmática, tiene lugar mediante el gasto de ATP.

La implicación en el transporte de hemo de los homólogos del sistema de transporte ABC ha sido demostrada en *V. anguillarum* (Mouriño *et al.*, 2004), donde cada uno de estos genes demostró ser esencial para la utilización de hemina como única fuente de hierro en este patógeno de peces.

La proteína HutW

El gen que se ha denominado *hutW* en *P. damsela*, en especies de *Vibrio* codifica una proteína con un porcentaje de similitud bastante elevado con coproporfirinógeno-III oxidasas oxígeno-independientes de diversas especies bacterianas. Esta familia de enzimas bacterianas cataliza la transformación anaeróbica de coproporfirinógeno III a protoporfirinógeno IX, requerido para la biosíntesis de porfirina (Panek y O'Brian, 2002). Se localiza al lado de los genes *tonB* en *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, en *Plesiomonas shigelloides*, el gen *hugW* (homólogo de *hutW*), no está ligado directamente a *tonB*, ya que el receptor de hemo *hugA* se localiza entre ellos (Henderson *et al.*, 2001). La trascendencia de este gen en el mecanismo de captación de hemo todavía está por estudiar (O'Malley *et al.*, 1999).

También sigue sin explicarse por qué un gen que codifica una proteína que, en teoría tiene una función enzimática en un paso intermedio de síntesis de porfirinas, se encuentra localizado en el cromosoma interrumpiendo una serie de genes que codifican proteínas con función de transporte de hemo.

Unas 200 posiciones antes del codón de inicio del gen *hutW*, se identificó otra “caja Fur”, con la secuencia GAAAATAATATCAATTATC. Estos datos, se confirmaron con el resultado del ensayo FURTA y coinciden con los obtenidos en estudios previos (Osorio *et al.*, 2004b). La presencia de esta caja Fur, y la localizada antes del gen *tonB*, sugerían la regulación mediada por hierro del gen o genes situados a continuación de éstas, y para ello se llevaron a cabo otro grupo de experimentos, que se discutirán más adelante.

Las proteínas HutX y HutZ

La siguiente ORF en el *cluster* a continuación de *hutW*, corresponde al gen *hutX*. Las mayores similitudes de la proteína HutX se asociaron con proteínas ligadas al transporte de hemo en otras especies del género *Vibrio*. Ninguno de los homólogos de esta proteína tiene una función conocida, y la delección de su homólogo en *V. anguillarum* no representó un efecto significativo en la utilización de hemina como fuente de hierro (Mouriño *et al.*, 2004). A continuación de *hutX*, se encuentra el gen *hutZ*, denominado así en base a la nomenclatura utilizada con los homólogos más cercanos. En *V. anguillarum*, la mutación del gen *huvZ* reduce de forma drástica la capacidad de la bacteria para crecer con hemina como única fuente de hierro (Mouriño *et al.*, 2004). En *V. cholerae*, se ha descrito recientemente que la proteína HutZ es requerida para la utilización de hemina como fuente de hierro. Los autores sugieren que esta proteína actúa como un almacén de hemo, ya que se ha demostrado que lo une con una eficiencia muy alta (Wyckoff *et al.*, 2004).

4.4.2. El Receptor de Membrana Externa HutA

En bacterias gram negativas, incluida *P. damsela*, el grupo hemo es transportado activamente hacia el interior celular mediante receptores de membrana externa ligando-específicos (van der Helm, 1998). A la vista de los resultados obtenidos con el sistema híbrido, la clonación del gen que codifica para el receptor de hemo en *P.*

damselae se realizó en base a su habilidad de conferir a la cepa 101 ESD la capacidad de utilizar el hemo como fuente de hierro. Las proteínas TonB, ExbB y ExbD intervienen en este proceso transduciendo la energía producida por la membrana interna hacia los receptores de membrana externa, para que el proceso de translocación de sustrato pueda tener lugar. El dominio amino terminal caja TonB (*TonB-box*) se corresponde con la parte del receptor que interactúa físicamente con la proteína TonB (Heller *et al.*, 1988). Se detectó una caja TonB bien conservada en el extremo amino terminal de la proteína codificada por *hutA* (aminoácidos 31-37). La caja TonB de *HutA* es idéntica a la del receptor de hemo de *P. profundum*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. anguillarum*.

El receptor *HutA* presenta una elevada similitud a nivel de estructura primaria con varios receptores TonB-dependientes de diferentes bacterias gram negativas (Stojiljkovic y Hantke, 1992), hecho que viene a sustentar su dependencia de la proteína TonB. Esta gran semejanza, unida a la presencia en todos ellos de las regiones altamente conservadas en los receptores de hemo como la caja TonB, la caja FRAP (Phe-Arg-Ala-Pro) y la caja NPNL (Asn-Pro-Asn-Leu) y al hecho de que el peso molecular de estas proteínas oscila siempre entre 72,2 y 79,2 kDa, que indica que su tamaño está también conservado, sugiere que todos estos receptores han evolucionado a partir de un ancestro común (Nau y Konisky, 1989).

La inactivación de los homólogos del gen *hutA* ha sido llevada a cabo en bacterias como *V. vulnificus* (Litwin y Byrne, 1998), *V. cholerae* (Mey y Payne, 2001) o *V. anguillarum* (Mazoy *et al.*, 2003) entre otras, y siempre tuvo como consecuencia una disminución total o parcial de la capacidad de utilización de hemo y hemoglobina como fuente de hierro, demostrando así su papel crucial en este proceso. En el caso del patógeno de peces *V. anguillarum* esta mutación implicó también un descenso en la virulencia de la bacteria respecto a la cepa salvaje, cuando a los peces se les inoculaba previamente hemina (Mazoy *et al.*, 2003).

Diversos estudios sugieren que las proteínas de membrana externa reguladas por hierro ofrecen inmunoprotección profiláctica, sugiriendo que son inmunogénicas y que ofrecen protección heteróloga (Ruffolo *et al.*, 1998; Bosch *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2005; Whalan *et al.*, 2005). Por tanto, las proteínas más ampliamente distribuidas entre las diferentes cepas de *P. damsela* serán las mejores candidatas para ensayar una vacuna, puesto que podrían conferir protección frente a un amplio rango de cepas. Con

este fin se estudió mediante PCR la presencia en diferentes cepas de *P. damsela* del gen que codifica la proteína HutA, tal como se describió anteriormente.

El gen *hutA* se detectó en todos los aislados analizados de *P. damsela* subsp. *damsela*. En el caso de la subespecie *piscicida*, mientras que las cepas de origen japonés presentaban el gen *hutA* completo, el resto de aislados de otros orígenes geográficos presentaba una interrupción repentina de éste. Se manifestó así una doble situación en función de la procedencia de la cepa, resultado que sostiene el obtenido por Magariños *et al.* (2000), en el cual se postuló la existencia de dos linajes clonales, el japonés y el europeo, y que, sin embargo, contradice lo descrito por Bakopoulos *et al.* (1995), quienes referían la existencia de homogeneidad entre aislados de *P. damsela* subsp. *piscicida* procedentes de diferentes orígenes.

La mayor parte de los genes que codifican proteínas con función receptora del grupo hemo forman parte de un locus multigénico unidos a otros genes implicados en el transporte de aquel (Genco y Dixon, 2001). Como ya se ha relatado, la organización génica es muy similar dentro de las distintas especies del género *Vibrio* pero, aun así, no existe una uniformidad absoluta en el caso del gen que codifica el receptor de membrana externa. Mientras que, al igual que en la mayoría de los casos dentro de la familia *Vibrionaceae*, este gen aparece en *P. damsela* separado del resto del *cluster*, en *V. anguillarum* se localiza a continuación del gen *huvZ* (Mouriño *et al.*, 2004).

También se han encontrado diferencias con respecto a los genes vecinos a *hutA*. Las dos subespecies de *P. damsela*, así como *P. profundum*, presentan un gen en el extremo 5' de *hutA* que codifica una proteína ribosómica L25, y que en *P. multocida* ha demostrado estar fuertemente regulada por hierro (Paustian *et al.*, 2001). Sin embargo, no existe un patrón común, en cuanto a las secuencias que se localizan después del extremo 3' de *hutA*, con respecto a otras especies bacterianas.

Identificación de pseudogenes e implicaciones evolutivas

Los experimentos descritos anteriormente, sirvieron para evidenciar la presencia de un pseudogen *ψhutA* en la mayoría de las cepas estudiadas de *P. damsela* subsp. *piscicida*, todas ellas procedentes de puntos geográficos distintos a Japón. Los pseudogenes son genes no funcionales debido generalmente a la rotura de sus pautas de lectura, bien por inserción de una secuencia foránea, bien por la aparición de un codón de parada prematuro. Se ha demostrado que los pseudogenes son elementos habituales

en los genomas de las bacterias, a pesar de que hace poco tiempo se pensaba que eran escasos en éstas debido al pequeño tamaño de sus genomas (Lerat y Ochman, 2005).

Como ya se comentó anteriormente, la cepa DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida* se ha descrito como una cepa muy virulenta afectando a diversas especies de interés en acuicultura. Los pseudogenes se localizan con mayor frecuencia en los genomas de microorganismos patógenos más que en los de sus formas benignas o aislados ambientales. Algunos autores opinan que la disponibilidad de nutrientes en el interior del hospedador hace que genes que antes eran útiles se vuelvan superfluos (por disminución de la presión selectiva). Otros, sugieren que la reducción de la población efectiva necesaria para causar infección en el hospedador, implica la relajación de la solidez de la selección y la acumulación de mutaciones deletéreas (Lerat y Ochman, 2005).

Dentro del género *Vibrio* se han localizado diversos pseudogenes en especies como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* o *V. vulnificus*. Se conoce la relación filogenética entre éstas (Thompson *et al.*, 2004), lo cual puede ayudar a conocer en qué momento durante la evolución de este grupo aparecieron la mayoría de los pseudogenes (Figura IV.66).

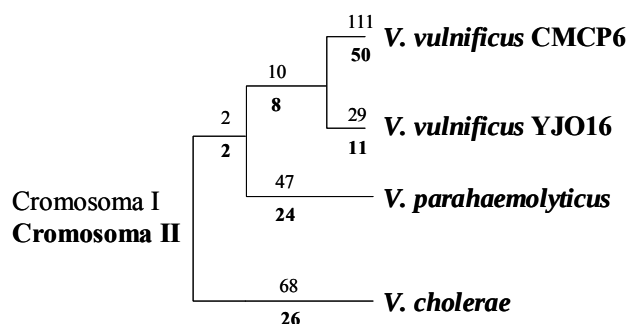


Figura IV.66-Filogenia de varios genomas del género *Vibrio* donde se muestran el número de pseudogenes descritos en el cromosoma I (sobre las ramas y en gris) ó II (bajo las ramas y en negro) y el momento en que aparecieron. Tomado de Thompson *et al.*, (2004).

Se encontró así que la mayoría de pseudogenes eran generalmente de un origen muy reciente siendo escasos los pseudogenes ancestrales. Esto se puede explicar suponiendo que en la mayor parte de los casos son eliminados muy rápidamente del genoma de la bacteria, impidiendo su detección.

El hecho de que *hutA* aparezca completo en algunas cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* y en otras no, indica que la aparición de este pseudogen es relativamente reciente, de lo contrario se detectaría una situación mucho más uniforme. De hecho, la tendencia evolutiva se dirigirá probablemente en primer lugar hacia la homogeneización de la subespecie en lo relativo a este gen, y en segundo lugar a su desaparición del genoma. También se puede deducir que la presión selectiva ha actuado de modo intermitente y no uniforme sobre las diferentes poblaciones de *P. damsela* (Yeoman *et al.*, 2000).

En *P. damsela* subsp. *damsela* no se localizó este pseudogen en ninguna de las cepas ensayadas. La aparición de los pseudogenes es un evento muy posterior a la especiación, por lo que el evento de aparición de *ψhutA* tuvo que producirse de modo independiente en la rama evolutiva que condujo a la subespecie *piscicida*, mucho tiempo después de que ambas subespecies hubiesen divergido de su ancestro común. Lo que sí resulta obvio a la vista de la gran similitud existente entre *hutA* y *ψhutA*, es que la adquisición del gen *hutA* tuvo lugar antes de que las dos subespecies se separaran en la evolución, y que no pudo ser adquirido independientemente en los dos casos por transferencia horizontal. La acumulación de pseudogenes constituye además en sí, al igual que se ha descrito en otras bacterias (Tong *et al.*, 2005), un mecanismo de especiación que hace que *P. damsela* subsp. *piscicida* y *P. damsela* subsp. *damsela* avancen en su proceso de separación.

La aparición de pseudogenes pertenecientes a los sistemas involucrados en la utilización de hierro por las bacterias se ha descrito en otros casos. Así por ejemplo en *Rhizobium leguminosarum* (Yeoman *et al.*, 2000) se identificó un pseudogen del gen *fhuA* que codifica el receptor de sideróforos FhuA, y que en este caso coexistía en cepas distintas de la misma especie con otro gen funcional *fhuA*.

4.4.3. Análisis funcional del sistema de captación de grupos hemo

Complementación de cepas mutantes de *E. coli*

Los experimentos realizados demostraron que el gen *hutA* de *P. damsela* no es suficiente por sí solo para otorgar la capacidad de crecimiento en condiciones de limitación de hierro, y con hemina como única fuente del mismo, a la cepa mutante de

E. coli 101ESD. Para conseguir dotar a esta bacteria de la capacidad de captar hemina del medio extracelular, es necesario aportarle un mecanismo de transporte de hemina desde el periplasma hacia el citoplasma. Esto se logró cuando además de con *hutA*, se complementó esta cepa con los genes *tonBexbBDhutBCD*. Esta complementación permitió obtener una primera evidencia de la funcionalidad del grupo de genes *tonBexbBDhutBCD* en el transporte de hemo al interior bacteriano. Se vuelve así a confirmar como ya se había observado en el sistema híbrido construido anteriormente, que los productos resultantes de estos genes pueden mediar la internalización del grupo hemo. La presencia de los genes *hutWXZ* no resultó ser sin embargo necesaria. Esto se corresponde con lo obtenido años atrás por Occhino *et al.* (1998), que describieron cómo la capacidad de utilizar hemina como fuente de hierro era restituida en la cepa 1017 de *E. coli* con los genes *tonB*, *exbBD* y *hutBCD*. Mouriño *et al.*, (2004) obtuvieron los mismos resultados, pero, además, construyeron un mutante del gen *huvZ* de *V. anguillarum* que fue incapaz de utilizar hemina para crecer en un medio con el hierro quelado. Se ha propuesto que la liberación oxidativa del hierro del grupo hemo es un mecanismo de adquisición de hierro en algunas bacterias y recientemente se han descrito genes que codifican hemo-oxigenasas en *Neisseria meningitidis* (Zhu *et al.*, 2000) y *Corynebacterium diphtheriae* (Wilks y Schmitt, 1998). Si bien se podría pensar que HutZ podría funcionar como una hemo-oxigenasa liberando el hierro del grupo hemo, no se detecta una homología significativa entre estas dos hemo-oxigenasas descritas y HutZ.

Henderson *et al.* (2001) observaron que era necesaria la introducción de un plásmido con los genes *hugWXZ* de *Plesiomonas shigelloides*, aparte de todos los mencionados antes, para reconstituir la función de utilización de hemina como fuente de hierro en la cepa mutante 1017 de *E. coli*. Recientemente, Wyckoff *et al.* (2004) corroboraron este resultado demostrando que *hutZ* sí era esencial para la utilización de hemina como fuente de hierro. Estos autores no fueron capaces de demostrar que HutZ tuviese una actividad hemo-oxigenasa, y sugirieron que esta proteína podría ser necesaria para el transporte o el almacenamiento del hemo como fuente de hierro, protegiendo así a la célula de su toxicidad.

Los estudios coinciden en la necesidad de la disociación del hemo de las hemoproteínas a nivel de superficie celular para que éste sea utilizado como fuente de hierro y/o como fuente de porfirina; lo que no parece muy claro es lo que sucede a continuación (Stojiljkovic y Perkins-Balding, 2002). El grupo hemo podría entrar en la

célula o podría producirse en primer lugar la extracción del hierro en la superficie celular y el posterior transporte del hierro liberado, sin el anillo porfirínico.

La cepa mutante de *E. coli hemA aroB* fue capaz de utilizar la hemoglobina y el hemo suplementados exógenamente cuando se complementó con los genes de *P. damsela* mediante el plásmido pSJR29 (*hutA*) solo o en combinación con el plásmido pSJR24 (*hutZXWtonBexbBexbDhutBCD*). Este resultado demuestra que el grupo hemo es introducido completo en la bacteria, ya que ésta está utilizándolo para suplir su carencia de porfirinas. Además, *P. damsela* ha de contar con un sistema de extracción del hierro del grupo hemo, ya que en un medio con ausencia de este elemento ha sido capaz de crecer utilizando hemina y/o hemoglobina.

Mutación del sistema de transporte ABC

Con el objetivo de ratificar el papel del sistema de transporte ABC se realizó un mutante de éste (genes *hutC* y *hutD*) en la cepa DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida*. La mutación de este sistema afectó drásticamente a la capacidad de crecimiento de la bacteria cuando se la hacía crecer con hemina como fuente de hierro. Esto concuerda con lo descrito en *V. anguillarum* (Mouriño *et al.*, 2004) donde ambos genes resultaron ser esenciales para la captación de hemina como única fuente de hierro. En cambio, en *V. cholerae* se ha descrito que, si bien el sistema de transporte ABC y HutB favorecen la captación de hemina del medio, no son esenciales para el proceso (Occhino *et al.*, 1998). Ello implicaría que en *V. cholerae* deben existir sistemas redundantes para realizar esta misma función.

4.4.4. Regulación transcripcional del sistema

En un estudio previo, se había demostrado la presencia de al menos un sitio de unión para la proteína represora Fur (caja Fur), en la secuencia de DNA situada entre los genes *tonB* y *hutW* de la cepa DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Osorio *et al.*, 2004b). A pesar de que la secuencia de nucleótidos sugería que los seis genes *tonBexbBDhutBCD* se cotranscribían formando un operón, resulta inusual que los genes pertenecientes al sistema TonB se localicen en el mismo operón con genes implicados en el transporte de un ligando específico (Occhino *et al.*, 1998). Por ello, para determinar si existía o no un promotor adicional antes de los genes *hutBCD*, o bien si

los seis genes se cotranscribían desde un promotor anterior al gen *tonB*, se realizó una RT-PCR. También se realizó una RT-PCR para confirmar que la transcripción de los tres genes restantes *hutW**XZ* se regía desde un segundo promotor.

Los resultados obtenidos indicaron que los genes *tonB**exbBD* y *hutBCD* se cotranscriben desde un promotor previo al codón de inicio del gen *tonB*, y la existencia de un segundo promotor antes del gen *hutW* que dirige la transcripción de *hutW**XZ* constituyendo el segundo operón. Dentro de la familia *Vibrionaceae* el caso más estudiado es el del sistema de *V. cholerae*, demostrándose que realmente los genes *tonB*, *exbB*, *exbD*, *hutB*, *hutC* y *hutD* se cotranscriben desde un único promotor localizado “corriente arriba” del gen *tonB*. Este dato no se había observado anteriormente en ninguno de los microorganismos estudiados (Occhino *et al.*, 1998).

El ligamiento genético del sistema TonB1 a los genes implicados en el transporte de hemo, podría indicar que estos genes fueron adquiridos de modo simultáneo para permitir una utilización más eficiente de éste por *P. damsela*. Esto podría proporcionar a esta bacteria una ventaja selectiva en el interior del hospedador, a la hora de utilizar la hemina como fuente de hierro.

En otras especies de bacterias, la unión física de los genes no significa que sean cotranscritos. Así, en *Pasteurella multocida*, se demostró que la transcripción de *tonB*, *exbB* y *exbD* ocurre de forma independiente, incluso estando ligados físicamente (Bosch *et al.*, 2002). En *Pseudomonas putida* estos mismos genes se encuentran organizados como un operón (Bitter *et al.*, 1993), y los tres genes son esenciales, mientras que en *E. coli* el operón sólo lo forman *exbB* y *exbD*. El gen *tonB* forma una única unidad transcripcional localizada en otra parte del mapa cromosómico (Bachmann, 1990) y es el único que parece ser indispensable.

Regulación mediada por hierro

Para estudiar si los dos operones y el gen que codifica el receptor de membrana externa *hutA* estaban sujetos a una regulación mediada por hierro, se estudió el efecto de la privación de este elemento sobre la transcripción de estos genes, cuantificándose su expresión en un medio con y sin hierro. Los resultados demostraron que la expresión de los tres operones está inhibida por la presencia de hierro, ya que en presencia del agente quelante 2,2'-dipyridyl la expresión en todos los casos es claramente muy superior a la obtenida cuando las células crecen en presencia de hierro. Esta afirmación se vio

corroborada con el estudio de la actividad β -galactosidasa de una fusión transcripcional entre el promotor de *hutA* y el gen indicador *lacZ*. Asimismo, todos estos resultados están en concordancia con la existencia de una caja Fur en el promotor de *hutA*, con elevado porcentaje de identidad nucleotídica con respecto a la secuencia consenso de *E. coli* y cuya capacidad de unirse al represor Fur se demostró en un experimento de titulación de Fur (FURTA).

Uniendo todos los resultados obtenidos en estos experimentos de regulación, se puede concluir que los tres operones son también tres regulones Fur de *P. damsela* sujetos al mismo tipo de regulación, lo cual es esperable ya que parece lógico que genes que están implicados en la misma función tengan también un mismo control. La existencia de promotores con este tipo de localización se puede deber a un sistema de seguridad que garantice la expresión de todos los genes y prevenga los posibles inconvenientes generados por el solapamiento de sus regiones codificantes. Por otro lado, su existencia puede evitar también los efectos polares de mutaciones en los primeros genes del operón, que impiden la transcripción o traducción de los genes que están por detrás en la organización génica (Bosch *et al.*, 2002).

Este tipo de regulación mediada por hierro en los *clusters* de captación de hemo ha sido también descrita en bacterias como *V. vulnificus* (Litwin y Byrne, 1998), *V. cholerae* (Henderson y Payne, 1993), *Y. enterocolitica* (Stojiljkovic y Hantke, 1992), o *Bordetella avium* (King *et al.*, 2005) y es coherente con el papel del sistema de captación de hemo como mecanismo de obtención de hierro del medio extracelular.

Expresión *in vivo*

El último paso de este análisis transcripcional pasaba necesariamente por tratar de demostrar que los genes implicados en la captación de hemo del medio extracelular estaban involucrados en el proceso infeccioso, es decir, que se expresaban en algún momento durante éste. Así, se confirmó mediante RT-PCR que el operón génico formado por *tonBexbBDhutBCD* se expresaba *in vivo* en los especímenes infectados experimentalmente.

Previamente, se había demostrado que este operón estaba fuertemente sujeto a la regulación dependiente de la disponibilidad de hierro del medio, al comprobar que únicamente se detectaba por RT-PCR el transcrito *tonBexbBDhutBCD* cuando las concentraciones de hierro del medio eran muy bajas. Esta regulación estaba mediada

además por la proteína represora Fur. Así, la detección de los transcritos de *tonBexbBDhutBCD* *in vivo* ha tenido que producirse porque las condiciones de hierro del medio son bajas. Por lo tanto, este estudio refuerza la idea de que los patógenos encuentran durante el proceso infeccioso un medio con condiciones demasiado escasas del precioso metal en el hospedador.

Además, la expresión de los genes responsables de la captación de hemo del medio durante la infección sugiere que este sistema permite la utilización de grupos de hemo del hospedador con el propósito de extraerles después el hierro y que éste quede disponible así para el microorganismo. De modo similar, estudios recientes en *Neisseria gonorrhoeae* (Agarwal *et al.*, 2005) demostraron que los genes responsables del transporte de hemo se expresaban *in vivo* durante las infecciones naturales. Si bien en *P. damsela* subsp. *piscicida* ya se han descrito otros mecanismos responsables de secuestrar hierro del medio externo basados en la síntesis y la utilización de sideróforos (Magariños *et al.*, 1994c), nuestros resultados indican que la utilización de hemo debe ser uno de los sistemas de los que dispone esta bacteria para multiplicarse en el hospedador, y de hecho ya se conocía por estudios previos que la inyección intraperitoneal de hemina o hemoglobina al pez, pocas horas antes de la infección experimental, hace que se incremente la letalidad de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Magariños *et al.*, 1994c).

Se ha descrito también en las dos subespecies de *P. damsela*, la existencia de enzimas extracelulares que podrían jugar un papel como hemolisinas (Magariños *et al.*, 1992; Osorio *et al.*, 2000a). La producción de estas hemolisinas podría contribuir a la liberación del hemo de los tejidos del hospedador y hacerlo así disponible para su utilización como fuente de hierro. En este escenario, la expresión de los genes del sistema de captación de hemo podría representar una ventaja para la multiplicación bacteriana y para el establecimiento del proceso infeccioso en el pez.

4.5. Anexos

Tabla IV.5.-Cepas utilizadas y construidas a lo largo del capítulo IV.

Cepa	Cepa de origen	Plásmido	Genes
CS2	<i>E. coli</i> EB53	pSJR24 (Amp ^R)	<i>hutZ, hutX, hutW, tonB, exbB exbD, hutB, hutC y hutD</i>
CS6	<i>E. coli</i> 101 ESD	pCAR121 (Kan ^R)	<i>huvA (V. anguillarum)</i>
CS7	<i>E. coli</i> 101 ESD	pSJR24 (Amp ^R)	<i>hutZ, hutX, hutW, tonB, exbB exbD, hutB, hutC y hutD</i>
CS9	<i>E. coli</i> 101 ESD	pSJR24 + pCAR121 (Amp ^R /Kan ^R)	<i>hutZ, hutX, hutW, tonB, exbB exbD, hutB, hutC, hutD + huvA</i>
CS18	<i>E. coli</i> 101 ESD	pSJR29 (Kan ^R)	<i>hutA</i>
CS21	<i>E. coli</i> 101 ESD	pSJR29 + pSJR30 (Amp ^R /Kan ^R)	<i>hutZ, hutX, hutW, tonB, exbB exbD, hutB, hutC, hutD + hutA</i>
CS22	<i>E. coli</i> 101 ESD	pSJR29 + pSJR27 (Amp ^R /Kan ^R)	<i>hutZ, hutX, hutW, tonB, exbB exbD, y hutA</i>
CS23	<i>E. coli</i> 101 ESD	pSJR29 + pSJR33 (Amp ^R /Kan ^R)	<i>tonB, exbB exbD, hutB, hutC, hutD y hutA</i>
CS24	H1717	pSJR29	<i>hutA</i>
CS28	<i>E. coli</i> 101 ESD	pSJR24 + pSJR29 (Amp ^R /Kan ^R)	<i>hutZ, hutX, hutW, tonB, exbB exbD, hutB, hutC, hutD y hutA</i>
CS29	<i>E. coli</i> EB53	pSJR24 + pSJR29 (Amp ^R /Kan ^R)	<i>hutZ, hutX, hutW, tonB, exbB exbD, hutB, hutC, hutD + hutA</i>
CS32	<i>E. coli</i> EB53	pSJR29 (Kan ^R)	<i>hutA</i>

Tabla IV.6.-Plásmidos contruidos a lo largo del capítulo IV.

Plásmido	Plásmido original	Construcción
pSJR19	pNid-Kan (Km ^R)	<i>hutB</i>
pSJR24	pWKS30 (Ap ^R)	Genes <i>hutZXWtonBexbBDhutBCD</i> de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> DI21
pSJR27	pWKS30 (Ap ^R)	Genes <i>hutZXWtonBexbBD</i> de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> DI21
pSJR28	pGEMT-Easy (Ap ^R)	Gen <i>hutA</i> de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> CDC 2227-81
pSJR29	pACYC177 (Ap ^R ; Km ^R)	Fragmento <i>Sau3AI</i> con el gen <i>hutA</i> de la cepa CDC 2227-81 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
pSJR30	pWKS30 (Ap ^R)	Genes <i>hutZXWtonBexbBDhutBCD</i> de la cepa CDC 2227-81 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
pSJR33	pCR 2.1 TOPO	Genes <i>tonBexbBDhutBCD</i> de de la cepa DI21 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
pSJR35	pGEMT-Easy (Ap ^R)	Fragmento de PCR con un fragmento del gen <i>hutA</i> de la cepa DI21 y otro de una proteína de multirresistencia obtenido con el cebador universal pT7-7 uni y el del <i>hutADI21</i> 5'1
pSJR37	pGEMT-Easy (Ap ^R)	Gen <i>hutA</i> de la cepa MP7801 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
pSJR51	pHRP309 (Gm ^R)	Promotor del gen <i>hutA</i> de la cepa DI21 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>

Tabla IV.7.-Cebadores utilizados a lo largo del capítulo IV.

Oligonucleótido	Secuencia
hutB5'1	GCAACCATCAAAACAATGCC
hutB5'2	GGTCCAATTAGCATTCGTCC
hutB5'3	GCCTAAGTTTAAAATGGTGGGA
hutB5'4	TTCGTTGAGGCTATGGATACCG
hutD5'1	GCAGCACACTATCCTCTCATAACG
hutD5'2	CTTGATGAACCCACATCTGCTC
phudams 5'1	AGGAAGATATTGAGGGCAGC
phudams 3'1	AAAGTCTGATAAGGCAGTCC
phuW 5'2	CTCACACTATGTCACTTTAAC
phuW 5'3	TTTGATCGAGGCGTACTTAGCC
phuW 5'4	AGTGGCGCAATTACTTGAAC
hutADI215'1	TCACATGTATCGCCAGATCA
hutADI215'2	AACGATGAGTTAGACCATCAATA
hutZDI215'1	GCATTGCAGGTATTGCTGTAC
delhutZ-DI215'1	GCGAATTCATCTTGTAACCTGCATAAATA
delhutD-DI213'1	GCGAATTCTATTACATTGTGTAATCGCTT
op-cdc-5'1	GTCAAACGCTTACGCGCATA
op-cdc-5'2	CAGGGAGCTTACCTTTATCA
op-cdc-5'3	GTGATGCTCGTTTATACCAA
op-cdc-5'4	AGAAAACGGCCTCTGTGCGAA
op-cdc-5'5	TTCAAATGCAGCCTGATATC
op-cdc-5'6	GGAGCAATTCTCGCCATTTG
op-cdc-5'7	GTGAATCAGAAGCCAAACAT
op-cdc-3'1	ATCAAGGATCTCTGTACCTG
delhutX-1	GCAAGCTTATGTTTTATTCTGCA
delhutB-1	GCGCGGCCGCTCGCCACGATGAACAAGCA
delhutB-2	GCGAATTCTCCGGCACTGATAATACGCGA
delhutB-3	GCGAATTCGTAAGTACCCAAACACCCGCA
delhutB-4	GCGTCGACGCCTAATAGGGCTGATACCGG
Iphut3'1	GTTTAACTTGCTGTGCGGTT
hutZDI215'1	GCATTGCAGGTATTGCTGTAC
HUP-DEG 5A	TTYGAYGARGTNGTNGT
HUP-DEG 3A	CCNCKNCKNGTRTANGCNAC
HUP-DEG 5C	GGNWSNGAYGCNATHGGNGG
HUP-DEG 5D	CARGGNTTYMGNGCNCC
HUP-DEG 3	TCDATNCCYTTDATNGTNGC
delhutADI215'1	GCCTGCAGATTGCTGTAAATCTATCCG
delhutADI213'1	GCCTGCAGTTAAAAAATCGTACTTCAC
IphutA3	GTAATCCCGCAGTAACAACATA
IphutA2	GAGTTAGAGTTGGCTAATAAT
prom-exbDXba	GCTCTAGATTGCTATGACCACAGGCTCAG
hutD3'1	TGAGCGATAACTTGAAGTGG
phuseqA	CGCAATAGCAATGCCAATAGG
deltonB2	GCGAATTCTACTAACGGCTGTTGCTCC
exbD-expr-3'	GCGAATTCTCATGCTTTGTTATCCTCTTCC
lacZhutB5'1	GCTCTAGACATCTGGGACGAATGCTAA
hutX3'1	CAAAGTCGACTGGAACCAGA
hutX5'1	TACACACTCCCCTTGAGCTG
lacZhutA5'1	GCGTCGACGACCTTGTCACAACTGTA
lacZhutA3'1	GCGGATCCTAACTTAATATTCATAATC
hupADI215'2	AGTGATGCCCTTGGTGGTACT
exbD-5'-DI21	ATACTGCAGACGACCTCTGCCG

Capítulo V

Aplicación de la Hibridación sustractiva al
estudio de la diversidad genética en
P. damselfish subsp. *piscicida*

5.1. Introducción

La patogenicidad de *P. damsela* subsp. *piscicida* es el resultado de un proceso multifactorial del que se han estudiado varios componentes, tal y como ya se ha descrito en la introducción general. A pesar de ello, tanto la biología como las bases moleculares de los factores de virulencia de este microorganismo constituyen un campo todavía por explorar.

Un aspecto muy importante a tener en cuenta a la hora de estudiar un microorganismo patógeno, es el de la diversidad genética intraespecífica. Desde el punto de vista serológico, se conoce que las cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* representan un grupo muy homogéneo, en el que no es posible diferenciar serotipos (Magariños *et al.*, 1992). Con el fin de analizar la diversidad intraespecífica de este microorganismo, se utilizaron en el pasado técnicas como el análisis de lipopolisacáridos o proteínas de membrana, y perfiles de ácidos grasos FAME: (*fatty acid methyl ester*) (Magariños *et al.*, 1992; Romalde *et al.*, 1995). Este tipo de estudios nunca revelaron datos distintivos de excesiva relevancia, dada la gran uniformidad fenotípica hallada en *P. damsela* subsp. *piscicida*. La limitada cantidad de secuencias de DNA disponibles, junto con la inexistencia de diferencias entre los distintos serotipos, llevó en un primer momento a la consideración de que *P. damsela* subsp. *piscicida* era un microorganismo homogéneo (Magariños *et al.*, 1996c). Posteriormente se realizaron análisis de los polimorfismos de DNA mediante técnicas como el ribotipado (Magariños *et al.*, 1997) o el RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) (Magariños *et al.*, 2000). Si bien ambas técnicas demostraron de nuevo una limitada eficacia a la hora de marcar diferencias entre distintas cepas de esta bacteria, constituyeron el punto de partida para el planteamiento de que sí existían diferencias genéticas entre cepas de diferentes orígenes geográficos como las aisladas en Japón y cepas aisladas en Europa. Por tanto, el estudio profundo a escala molecular de este patógeno, mediante la secuenciación de genes concretos, representa una vía todavía por explorar en busca de variabilidad intraespecífica.

La diversidad genética entre cepas de una misma especie constituye no solamente un aspecto de interés en el campo de la taxonomía y la sistemática, sino también en el de la patogenicidad. La patogenicidad bacteriana viene determinada por el

contenido genético y, por tanto, es de esperar que existan diferencias en el bagaje genético entre cepas con distinto grado de virulencia. La comparación de dos genomas microbianos, uno de una cepa virulenta y otro de una cepa avirulenta de la misma especie puede ser un método de gran utilidad para identificar regiones génicas específicas de la cepa virulenta. Algunas de estas diferencias en el contenido genético pueden ser la causa de la expresión de proteínas específicas de algunas cepas tales como factores de virulencia (Tinsley y Nassif, 1996; Groisman y Ochman, 1997; Reckseidler *et al.*, 2001; Sorsa *et al.*, 2004), cuyo estudio puede ser pues utilizado para comprender la naturaleza y severidad de la enfermedad.

Dado que en *P. damsela* subsp. *piscicida* se han aislado cepas avirulentas, resultaría factible realizar este tipo de análisis comparativos sobre el genoma completo, para tratar de identificar genes que puedan estar relacionados con la virulencia. Cuando se conoce la secuencia completa de un genoma microbiano, se pueden utilizar tecnologías del tipo *microarrays* de DNA, para definir regiones presentes en una cepa pero ausentes en otras (Behr *et al.*, 1999; Salama *et al.*, 2000; Kato-Maeda *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2001). Sin embargo, hasta el momento no se dispone de la secuencia completa del genoma de *P. damsela* subsp. *piscicida* por lo que este tipo de análisis no son factibles. Por tanto, debemos recurrir a alguna alternativa dentro de las desarrolladas para tal fin en los últimos años.

Comparación de genomas mediante hibridación sustractiva

Los procedimientos para evaluar la diversidad genética y definir la función génica, han avanzado desde los métodos desarrollados para el análisis de genes únicos específicos (*Northern Blot* y *Dot blotting*, RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa), hasta otros destinados a identificar genes que difieren en su presencia entre las diversas muestras experimentales. Tal es el caso de la Hibridación Sustractiva (HS), técnica de demostrada eficacia en la búsqueda de secuencias específicas de una cepa, pero ausentes en otra (Mahairas *et al.*, 1996; Akopyants *et al.*, 1998; Calia *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000).

Los métodos basados en el análisis comparativo de genomas mediante hibridación sustractiva se desarrollaron a principios de 1980 con el propósito de construir genotecas de cDNA para obtener sondas de genes con expresión diferencial. Fueron los primeros métodos que se utilizaron de manera amplia con el propósito de

identificar genes regulados positiva o negativamente. Sus ventajas incluyen la habilidad de aislar genes de función relacionada, sin tener conocimientos previos de su secuencia o identidad, y el uso de técnicas comunes de biología molecular que no requieren equipos especializados de detección y análisis.

La hibridación sustractiva ha sido aplicada últimamente en muchos campos diferentes en investigación. En estudios de sistemas eucariotas, la aplicación de técnicas de sustracción se centra fundamentalmente en el análisis de expresión diferencial de genes entre dos poblaciones de cDNA, más que en diferencias entre genomas. Esto es así, porque los genomas eucariotas son demasiado complejos como para aplicarles las técnicas de sustracción existentes. Sin embargo, los genomas bacterianos son considerablemente más pequeños, y mucho menos complejos que muchas poblaciones de cDNA. Por eso, los métodos sustractivos son muy apropiados para identificar secuencias que estén presentes en un genoma bacteriano, y ausentes en otro (Straus y Ausubel, 1990; Mahairas *et al.*, 1996).

El fundamento de la hibridación sustractiva se publicó por primera vez en 1996 (Diatchenko *et al.*, 1996), y se aplicó al estudio de *Helicobacter pylori* en 1998 (Akopyants *et al.*, 1998), momento desde el cual se ha convertido en una herramienta muy utilizada en estudios de genética molecular microbiana.

A pesar de que existen diferentes métodos para llevarla a cabo, se puede resumir la base de la teoría de la hibridación sustractiva de forma simple. Se llama *tester* a la muestra de DNA genómico que contiene las secuencias de interés y *driver* a la muestra de referencia contra la que se va a realizar el experimento. Los DNAs genómicos de *tester* y *driver* son sometidos a dos hibridaciones, y los fragmentos que hibridan entre sí son sucesivamente eliminados, con lo cual el DNA que permanezca sin hibridar será representativo de secuencias específicas del DNA *tester*.

La técnica de hibridación sustractiva tradicional implica llevar a cabo muchas series de hibridación, necesita cantidades grandes de DNA, y es precisa la separación física de las cadenas simples de las cadenas dobles de DNA. Por ello, en el presente trabajo hemos utilizado una versión mejorada de esta técnica, que supera algunas de estas antiguas limitaciones, y que incluye un paso de supresión por PCR (Siebert *et al.*, 1995) que previene amplificaciones no deseadas y que enriquece la muestra en fragmentos específicos de la cepa *tester* (Diatchenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996).

Aplicaciones de la técnica

Localizar los genes presentes en ciertas cepas bacterianas pero ausentes o sustancialmente diferentes en otras puede ser de gran interés biológico. Algunos genes pueden determinar características especiales de la cepa (Akopyants *et al.*, 1998), tales como resistencias a antimicrobianos (Davies, 1994), estructuras de las superficies bacterianas (Stroehrer y Manning, 1997), sistemas de restricción-modificación (King y Murray, 1994) etc.

Una característica que a menudo permite distinguir y caracterizar cepas relacionadas de la misma bacteria, es la diversidad que presentan en cuanto a las llamadas secuencias de inserción (IS de *insertion sequences*) o elementos genéticos móviles. En trabajos anteriores de diferentes autores se ha comprobado que la hibridación sustractiva es una técnica ideal para identificar esta diversidad (Sawada *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2000; Kersulyte *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2000). Dado que este tipo de secuencias de DNA constituyen una elevada proporción del genoma de organismos eucariotas (Jelinek y Schmid, 1982) y procariotas (Lupski y Weinstock, 1992), es fácil postular para las mismas un papel universal, a pesar de que sus implicaciones funcionales no son bien conocidas.

A diferencia de otros procesos involucrados en la reestructuración del genoma, la transposición no cuenta con ninguna relación entre las secuencias donadoras y receptoras, ya que los elementos transponibles se limitan a moverse por sí mismos, o con la ayuda de secuencias auxiliares del propio genoma. La primera descripción de la existencia de elementos de DNA móviles fue realizada por Barbara McClintock al inicio de los años 50 (Mc Clintock, 1951). Estudiando la herencia del color y distribución de la pigmentación del maíz demostró la existencia de elementos genéticos que pueden transponerse. McClintock observó que la regulación de la activación y desactivación de ciertos genes implicados en la coloración del maíz, podía alterarse como consecuencia de la acción de distintas unidades genéticas con capacidad de transposición, a las cuales llamó *elementos controladores*. Desde ese momento, se han descrito tanto en organismos procariotas como en eucariotas, un extenso número de elementos móviles con capacidad de trasladarse de un lugar a otro del genoma en el que se hospedan. Así, estas secuencias llegan a ocupar el 50% del genoma del maíz (SanMiguel *et al.*, 1996), el 35% del genoma humano, o el 10% del genoma de *Drosophila*, localizándose principalmente en regiones de la heterocromatina (Pimpinelli *et al.*, 1995). En

Trypanosoma cruzi, agente causante de la enfermedad de Chagas, los elementos IS representan hasta el 30% de su genoma, hecho evidenciado por estudios de cinética de reasociación de DNA genómico (Castro *et al.*, 1981).

Otro motivo por el que resulta interesante la localización de elementos de inserción en el DNA bacteriano, es que éstos están considerados una poderosa fuente de cambio tanto en los genomas de eucariotas como de procariotas. Así, se cree que la presencia de elementos IS podría contribuir al proceso de adaptación genómica de un microorganismo a un ambiente determinado mediante procesos de inactivación y posterior eliminación génica (Mira *et al.*, 2002).

La diferencia en cuanto a virulencia entre una cepa patógena y una no patógena se basa siempre en el contenido o la expresión diferencial de genes en una y en otra. La hibridación sustractiva tiene un gran potencial para la comparación de secuencias genómicas entre cepas bacterianas que difieren en su virulencia (Bjourson *et al.*, 1992). En las enfermedades infecciosas son de especial importancia las islas patogénicas bacterianas (PAIs/*pathogenicity islands*), segmentos multigénicos de las cepas virulentas, que suelen estar ausentes en miembros avirulentos de la misma especie, y que pueden ayudar a explicar la naturaleza y gravedad de la enfermedad, habiendo despertado interés en los últimos años debido al papel que juegan en la virulencia de bacterias como *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia pestis*, entre otras (Groisman y Ochman, 1997; Hacker *et al.*, 2003). Estos elementos, con una longitud de decenas de kilobases, suelen portar genes involucrados en la virulencia. Frecuentemente se integran cerca de genes codificadores de tRNAs, generando pequeñas duplicaciones del sitio de inserción. Se piensa que su inserción es catalizada por integrasas similares a las de algunos fagos lisogénicos, codificadas en la propia isla de patogenicidad. Aunque en la mayoría de los casos se desconoce el modo exacto de transferencia de estas islas, una variante de particular interés es la isla que contiene al gen para la toxina de choque tóxico en *Staphylococcus aureus*, la cual puede ser transferida entre cepas empleando un fago auxiliador (Lindsay *et al.*, 1998). Además de esta isla, se detectaron recientemente, por comparación de la secuencia de diferentes aislados de *S. aureus*, hasta siete islas diferentes (Baba *et al.*, 2002). Estas son ahora llamadas islas genómicas, dado que no siempre se encuentran asociadas con la patogenicidad.

Otros ejemplos en los que la transferibilidad de la isla patogénica es aún más clara incluyen el elemento SXT de *Vibrio cholerae* (el cual confiere resistencia a cuatro antibióticos distintos) (Hochhut y Waldor, 1999) y la llamada “isla simbiótica” de *Mesorhizobium loti* (la cual contiene genes para la fijación simbiótica del nitrógeno) (Sullivan y Ronson, 1998). Ambos elementos son integrativos y autotransferibles por conjugación, por lo que se ha sugerido designarlos con el término CONSTIN’s (*conjugal self-transmissible integrating element*) (Hochhut y Waldor, 1999).

Existen también varios trabajos en los que la HS ha jugado un papel importante en la identificación de marcadores específicos de cepas o clones para utilizarlos por ejemplo en el diagnóstico de determinados patógenos animales y humanos (Mahairas *et al.*, 1996; el-Adhami *et al.*, 1997; Creelan *et al.*, 1999; el-Adhami, 1999; Bohnsack *et al.*, 2001).

En otras ocasiones, esta técnica se ha utilizado de modo semejante al estudio de los genes del RNA ribosómico 16S, para identificar la variabilidad genética presente en un entorno microbiano, sin necesidad de cultivar todos los microorganismos presentes en el mismo (Galbraith *et al.*, 2004).

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Cepas bacterianas y extracción del DNA genómico

Las cepas utilizadas en este estudio fueron la PC554.2 (*tester*) y la EPOY 8803-II (*driver*) (Tabla II.1).

El DNA genómico de las cepas de *P. damsela* se extrajo de acuerdo con el método descrito por Ausubel *et al.*, (1995). Para ello se tomó una colonia aislada de un cultivo bacteriano fresco y se inoculó en 5 mL de un cultivo líquido en LB, que se dejó en agitación constante durante 12 h a 25 °C. Se centrifugaron entonces 1,5 mL del cultivo en una microcentrífuga durante 2 min y se eliminó todo el sobrenadante. Las células bacterianas se resuspendieron en 567 µL de tampón TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0), y se añadieron 30 µL de SDS (Merck) al 10% y 3 µL de proteinasa K (20 mg mL⁻¹) (Sigma). La suspensión se incubó en un baño a 37 °C durante 1 h para romper las paredes bacterianas, resultando una mezcla viscosa a la que se añadieron 100 µL de una disolución de NaCl (Panreac) 5 M. A continuación se añadieron 80 µL de una disolución de CTAB (*Cetyltrimethyl ammonium bromide*) (Sigma) 274 mM/NaCl 700 mM, se mezcló, y se incubó durante 10 min en un baño a 65 °C. Posteriormente se añadió 1 vol de cloroformo:alcohol-isoamílico (Panreac) (24:1), se resuspendió y se centrifugó a 4 °C durante 5 min. La interfase superior se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL desechando la fase inferior. Se añadió a continuación el mismo volumen de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (25:24:1) (Panreac), y de nuevo se resuspendió y se centrifugó a 4 °C durante 5 min, se recogió la fase superior resultante y se le añadieron 500 µL de isopropanol (Panreac) para precipitar el DNA. Se centrifugó entonces durante 1 min a temperatura ambiente y el precipitado resultante se lavó con Etanol (Panreac) al 70% y se recogió centrifugando 5 min. Finalmente se retiró cuidadosamente el etanol, se dejó secar el DNA al aire unos minutos y se resuspendió en 100 µL de tampón TE.

5.2.2. Hibridación sustractiva entre las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* PC554.2 y EPOY 8803-II

Utilizando la hibridación sustractiva, se realizó una sustracción del genoma de la cepa no patógena EPOY 8803-II (*driver*), con respecto a la cepa patógena PC554.2 (*tester*) de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Tras las sucesivas hibridaciones y PCRs sustractivas, la muestra inicial, que consistía en DNA genómico de la cepa *tester*, se fue enriqueciendo en fragmentos específicos de ésta, que no estaban presentes en la cepa *driver*.

Esta técnica se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del manual del kit *PCR-Select™ Bacterial Genome Subtraction Kit* (Clontech) utilizado para este estudio. Los componentes suministrados en este kit se enumeran a continuación:

Paso	Componente
Digestión del DNA genómico	Enzima <i>RsaI</i> (10 U μL^{-1})
	Tampón 10X de <i>RsaI</i>
Ligación de los Adaptadores	DNA Ligasa T4
	Tampón de ligación de la DNA ligasa T4
	Adaptador 1 (10 μM)
	Adaptador 2R (10 μM)
Hibridación	Tampón de hibridación 4X
	Tampón de dilución
Amplificación por PCR	Primer 1 (10 μM)
	Nested Primer 1 (10 μM)
	Nested Primer 2R (10 μM)
Controles	DNA genómico de <i>Escherichia coli</i>

Como control, se utilizó el DNA genómico de *E. coli* (proporcionado por el kit), y con él se llevaron a cabo de forma simultánea los mismos pasos que con el DNA de las dos cepas experimentales.

5.2.2.1. Digestión del DNA genómico de las cepas

Cada reacción de restricción se preparó en un tubo de microcentrifuga con 3 μL (2 μg) de DNA genómico bacteriano, 10 U del enzima *RsaI* y 5 μL del tampón 10X

correspondiente, completándose con agua desionizada estéril hasta un volumen de 50 μ L.

Las digestiones se incubaron a 37 °C durante 5 h y se utilizaron 5 μ L para comprobar que el DNA se había digerido adecuadamente, para lo cual se migró en un gel de agarosa al 1%. Se pararon entonces las reacciones añadiendo 0,2 μ L de EDTA (Merck) y se procedió a la limpieza de las mismas, añadiendo 50 μ L de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (25:24:1). A continuación se centrifugó a 14.000 rpm a 4 °C durante 10 min para separar las fases, recogiendo la fase superior acuosa que se pasó a un tubo nuevo de microcentrífuga. Este proceso se repitió con cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1) y se procedió a precipitar el DNA usando 0,5 volúmenes de acetato amónico 4 M (Sigma) y 2,5 vol de etanol absoluto (Panreac) y centrifugando 20 min a temperatura ambiente a 14.000 rpm. El precipitado resultante se lavó con etanol frío al 80%, se dejó secar al aire unos minutos y se resuspendió en 6,5 μ L de agua desionizada.

Con el fin de comprobar que el DNA genómico de las cepas utilizadas en este experimento se había cortado en tamaños del rango apropiado, las muestras digeridas con *RsaI* se analizaron por electroforesis en gel de agarosa.

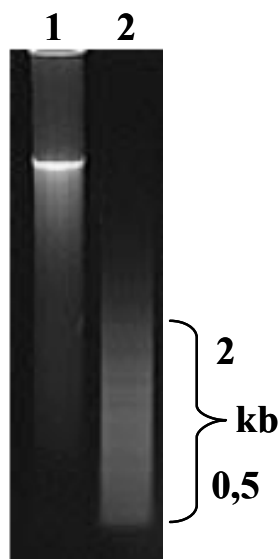


Figura V.1.-DNA genómico de la cepa PC554.2 (*tester*) antes (1) y después (2) de ser digerido con *RsaI*.

Como se observa en la Figura V.1, el DNA genómico sin digerir aparece en la zona superior del gel, mientras que el DNA digerido con *RsaI* aparece como una mancha (*smear*) en la franja entre 0,5 y 2 kb.

5.2.2.2. Ligación de los adaptadores

El DNA de la cepa *tester* se empleó para preparar dos reacciones de ligación independientes a las que se denominó tester 1-1 y tester 1-2 con los adaptadores 1 y 2R respectivamente (Figura V.2). Éstos poseen extremos compatibles para ser ligados a los extremos romos resultantes de la digestión con *RsaI* del DNA genómico de la cepa *tester*.

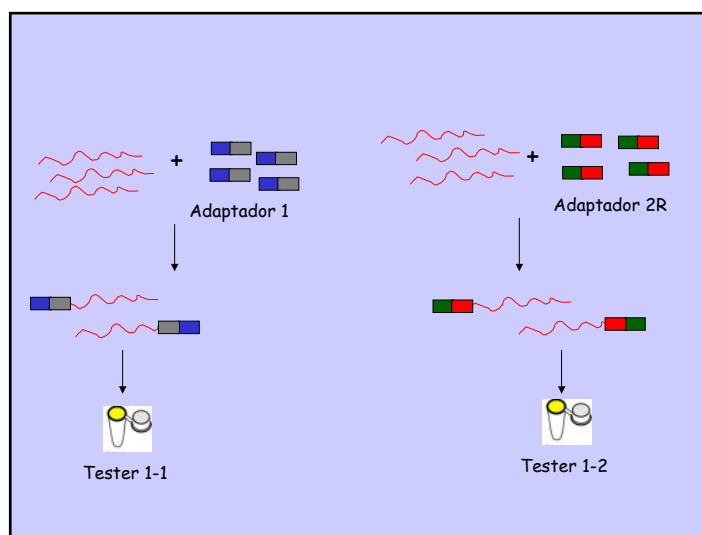


Figura V.2.-Ligación del DNA de la cepa *tester* con los adaptadores. Se generan moléculas tipo tester 1-1 y tester 1-2.

Se procedió a preparar la reacción de ligación del DNA de la cepa *tester* con los adaptadores (1 y 2R) (Figura V.3).

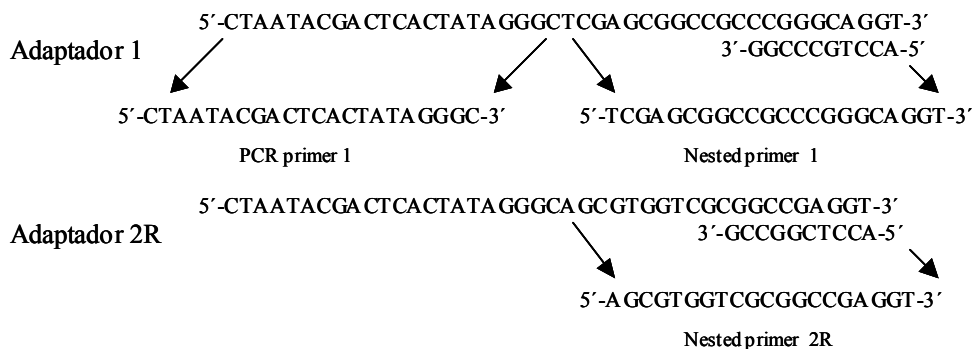


Figura V.3.-Secuencia de los adaptadores y los cebadores utilizados. Cuando los adaptadores se unen al DNA digerido con *RsaI*, se restaura la diana de restricción de *RsaI*.

En primer lugar se diluyeron 1,2 µL del DNA digerido anteriormente con 1,8 µL de agua desionizada, y se prepararon las siguientes mezclas en dos tubos de microcentrífuga de 0,5 mL:

Componentes	Tester 1-1 (µL)	Tester 1-2 (µL)
DNA <i>tester</i> diluido	1	1
Adaptador 1	2	-
Adaptador 2R	-	2
T4 DNA ligasa	1	1
Tampón 10X de la DNA ligasa	2	2
Agua desionizada	4	4

La reacción se incubó a 16 °C durante 12 h, se paró con EDTA 0,2 M y se trató a 72 °C durante 5 min para inactivar la DNA ligasa.

5.2.2.3. Reacciones de hibridación

Para que se produzca la primera hibridación, se mezcla el DNA *driver* digerido con *RsaI* con cada una de las ligaciones preparadas en el anterior apartado. De este modo, se generan cuatro clases de moléculas: a, b, c y d en cada una de las preparaciones.

Las moléculas del tipo **a** son las que contienen las secuencias específicas de la cepa *tester*, y por lo tanto, son las que más interesa que predominen. En cambio, las moléculas tipo **c** son las secuencias que han hibridado entre las dos cepas, por tanto comunes a *tester* y *driver*, y son las que se deben ir reduciendo en cada paso. También se generan formas diméricas del DNA de cada cepa hibridado consigo mismo, que vuelve a renaturalizarse (**b** y **d**), y monómeros libres de moléculas del DNA *driver* (**d**) (Figura V.4).

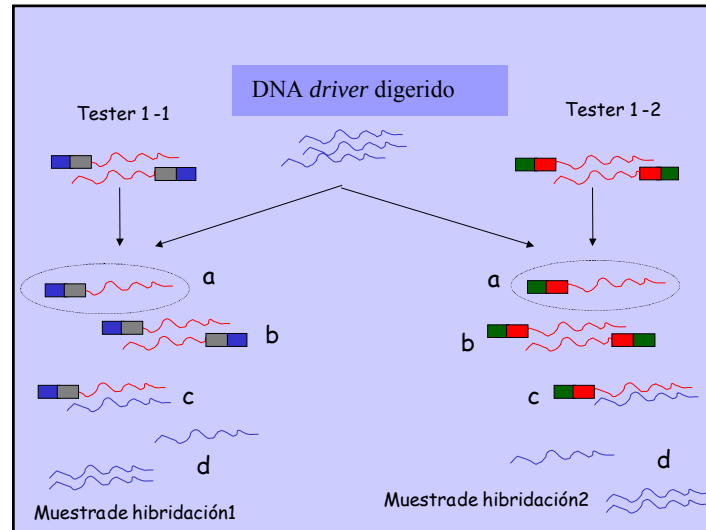


Figura V.4.-Hibridación del DNA *driver* digerido. Tras mezclar e incubar el DNA *driver* con las muestras tester 1-1 y tester 1-2, se generan cuatro tipos de estructuras diferentes: **a**, **b**, **c** y **d**.

La segunda hibridación se prepara del mismo modo que la primera, y se lleva a cabo con el fin de reducir todavía más la presencia de moléculas inespecíficas de la cepa *tester* (Figura V.5).

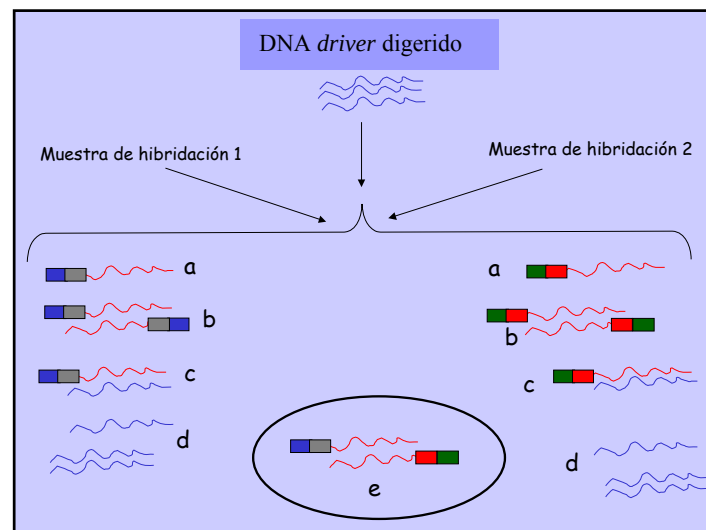


Figura V.5.-Segunda hibridación. El DNA *driver* se añade a las dos muestras resultantes de la primera hibridación y se generan así moléculas de tipo **a**, **b**, **c** y **d**, y además un nuevo tipo de estructura: **e**.

En esta segunda hibridación se generan de nuevo las estructuras formadas en la primera, pero se forma además una nueva molécula (e), que consiste en un dímero formado por dos fragmentos de DNA de la cepa *tester* que han hibridado entre sí. En cada uno de sus extremos, cada uno de estos fragmentos presenta uno de los dos tipos de adaptadores (1 o 2R). Estas moléculas, en las cuales la muestra está especialmente enriquecida al finalizar esta segunda hibridación, son las representantes de las secuencias específicas de la cepa *tester*.

Para preparar la primera hibridación se añadió a cada una de las muestras resultantes del apartado anterior (tester 1-1 y tester 1-2) un exceso del DNA *driver* digerido. Para ello se prepararon en dos tubos de microcentrífuga de 0,5 mL las siguientes mezclas de reactivos:

Componentes	Muestra de Hibridación 1 (μL)	Muestra de Hibridación 2 (μL)
DNA digerido de la cepa <i>driver</i>	2	2
Ligación Tester 1-1	1	-
Ligación Tester 1-2	-	1
Tampón de Hibridación (Clontech)	1	1
Volumen Final	4	4

Las dos muestras se colocaron en un termociclador (*iCyclerTM Thermal Cycler*, Bio-Rad), y se sometieron en primer lugar a una desnaturalización a 98 °C durante 90 s, y posteriormente se incubaron a 63 °C durante 90 min.

Se procedió entonces a realizar la segunda hibridación. Para ello, en primer lugar se preparó una mezcla de DNA *driver* (1 μL) con tampón de hibridación 2X (1 μL) y se incubó en el termociclador durante 90 s a 98 °C. A continuación se mezclaron las dos muestras resultantes de la primera hibridación con el DNA *driver* recién preparado, se incubaron toda la noche a 63 °C, se mezclaron con 200 μL de tampón de dilución y se trataron durante 7 min a 63 °C para eliminar las hibridaciones inespecíficas.

5.2.2.4. PCR sustractiva

El paso siguiente de la hibridación sustractiva consiste en la amplificación específica mediante PCR de las moléculas tipo “e”. Para que la reacción pueda tener lugar, la DNA polimerasa rellena en un paso previo los extremos libres de cada uno de los dos fragmentos (Figura V.6).

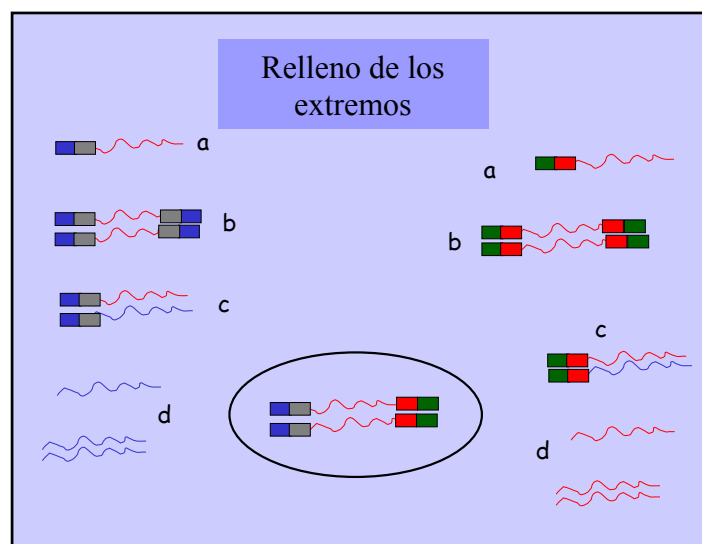


Figura V.6.-Etapa de relleno de los extremos de la hibridación sustractiva. En este paso se generarán los extremos adecuados para que pueda ser posible la posterior amplificación por PCR.

Las estructuras generadas serán las únicas válidas como molde en la primera PCR, ya que en ninguna de las otras, los fragmentos de DNA presentan en sus extremos adaptadores diferentes.

En esta primera PCR, se amplifican específicamente las secuencias del DNA *tester*. En primer lugar, la preincubación a 72° C a que se somete la muestra, “extiende” los adaptadores en cada hebra opuesta a la que ya lo tiene, creando los sitios de unión para el Primer 1. Durante la reacción, las moléculas tipo **a** y **d** no tienen ninguna posibilidad de ser amplificadas, ya que no contienen el sitio de unión al primer. Las moléculas tipo **b** sí lo tienen, pero de forma idéntica en el final de cada fragmento del DNA monocatenal, con lo cual se forman unas estructuras en forma de lazo (*panhandle-like structures*) en el paso de hibridación de cada ciclo, que impiden la posterior elongación. Así, este tipo de moléculas tampoco generarán productos de PCR (Figura V.7).

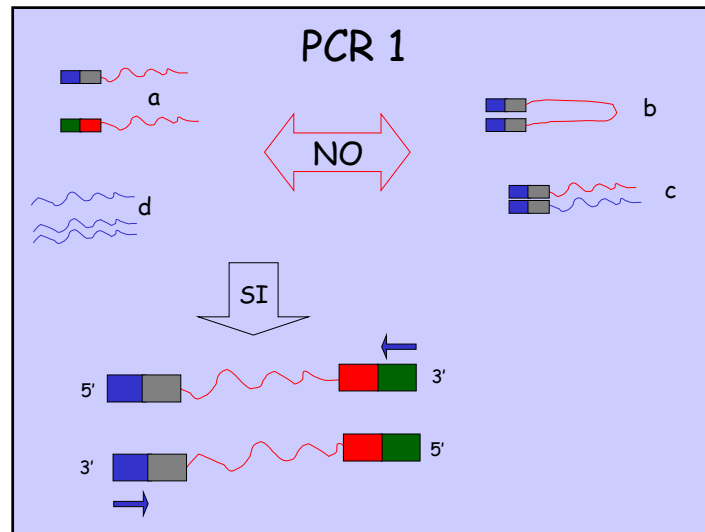


Figura V.7.-PCR 1. Como molde de esta primera PCR se utilizan las muestras 1 y 2 obtenidas tras la segunda ronda de hibridación.

Es el efecto conocido como “supresión por PCR”, que constituye una de las ventajas de esta técnica ya que elimina amplificaciones inespecíficas. Las moléculas tipo **c**, por su estructura, sólo van a poder amplificarse linealmente. Al final, únicamente las moléculas tipo **e**, que tienen los dos adaptadores diferentes, van a poder amplificarse exponencialmente.

En la segunda PCR, se produce una amplificación exponencial en la que se utilizan dos oligonucleótidos diferentes que ayudarán a reducir las amplificaciones inespecíficas y a enriquecer, además, la muestra en secuencias específicas del DNA *tester*.

Para la realización de las PCRs se utilizó la polimerasa *CLONTECH's Advantage cDNA Polymerase Mix* (Clontech). Los componentes que se utilizaron para llevarlas a cabo se enumeran a continuación:

Componentes	Cantidades (μL)
Muestra de la hibridación anterior	1
Agua desionizada estéril	19,5
Tampón de PCR 10X (Clontech)	2,5
dNTPs (Bioline) (10mM)	0,5
PCR primer 1 (Clontech)	1
50X <i>Advantage cDNA polymerase mix</i> (Clontech)	0,5
Volumen total	25

En primer lugar, la muestra se sometió a una preincubación a 72 °C durante 2 min para extender los adaptadores e inmediatamente se comenzó el programa de PCR elegido, que consistió en 30 ciclos que constaron de: 30 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de hibridación del cebador a 66 °C y 90 s de elongación a 72 °C. Se preparó entonces una dilución de este producto primario de amplificación utilizando 1 μL del mismo y 39 μL de agua desionizada, que se utilizaría a continuación en la segunda PCR en la cual se utilizaron los siguientes componentes:

Componentes	Cantidades (μL)
Producto de PCR primario diluido	1
Agua desionizada estéril	18,5
Tampón de PCR 10X (Clontech)	2,5
Nested Primer 1 (10 μM)	1
Nested primer 2R (10 μM)	1
dNTPs (Bioline) (10 mM)	0,5
50X <i>Advantage cDNA polymerase mix</i> (Clontech)	0,5
Volumen total	25

El programa de PCR consistió en 12 ciclos que constaron de 30 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de hibridación del cebador a 68 °C y 90 s de elongación a 72 °C. Para comprobar el resultado de ambas reacciones de PCR se llevó a cabo un análisis de 7 μL de las muestras en un gel de agarosa al 2%.

5.2.3. Clonación, purificación y análisis por restricción de los productos resultantes de la hibridación sustractiva

Los productos de PCR resultantes de la hibridación sustractiva se limpiaron y se ligaron al vector pGEM-T Easy, y la ligación se utilizó para transformar bacterias competentes *E. coli* DH5 α . De las colonias resultantes se extrajo el DNA plasmídico y se realizó un análisis por restricción con *EcoRI*.

5.2.4. Análisis mediante hibridación tipo dot blot

Con el fin de descartar secuencias presentes tanto en la cepa *driver* como en la *tester* (falsos positivos), y estudiar posteriormente la presencia-ausencia de las regiones aisladas por HS en diferentes cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida*, se llevaron a cabo experimentos de hibridación por dot blot. Para ello se extrajo el DNA cromosómico de 28 cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida*, siguiendo el procedimiento descrito en el primer punto de este capítulo. Se diluyeron aproximadamente 2 μ g de DNA de cada cepa en 50 μ L de tampón TE, se hirvieron durante 5 min para desnaturalizar el DNA y se transfirieron inmediatamente a una membrana de Nylon (Boehringer Mannheim) previamente activada con SSC 2X (Citrato sódico 0,03 M; NaCl 0,3 M; pH 7,0), utilizando un sistema Minifold II (Schleicher & Schuell) (Figura V.8).

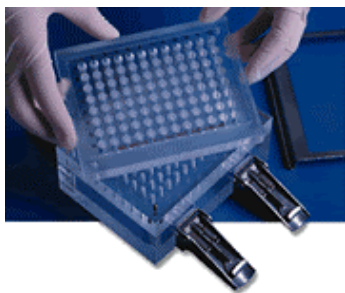


Figura V.8.-Sistema de transferencia de DNA Minifold II.

El DNA transferido se fijó a la membrana con luz ultravioleta durante 2 min en un *UV-crosslinker*, y a partir de este punto se procedió como se describió en el capítulo III, para realizar la hibridación y la detección de la señal.

En este experimento se utilizaron como sondas los fragmentos de DNA escindidos de algunos de los clones resultantes de la hibridación sustractiva. Para ello se

realizaron digestiones de los plásmidos con *EcoRI* y se migraron en un gel de agarosa al 1,2%. Los insertos liberados se recortaron del gel, se extrajeron y marcaron para ser utilizados como sonda de DNA.

En este primer análisis dot blot, con el fin de descartar los posibles falsos positivos, se analizó la presencia de todos los fragmentos en 4 cepas: la *tester* (PC554.2), la *driver* (EPOY 8803-II) y se incluyeron, además, la cepa virulenta DI21 y la cepa avirulenta ATCC 29690 (Tabla II.1).

5.2.5. Secuenciación de los clones (pRDAs)

La secuenciación del DNA plasmídico conteniendo los insertos correspondientes a los distintos clones seleccionados tras el análisis por restricción, se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos universales T7 y SP6. En la mayoría de los casos, dada la longitud de los insertos, la utilización de ambos cebadores en la secuenciación de cada clon fue suficiente para conocer la secuencia completa de los mismos. En los casos en los que no fue suficiente, se procedió al diseño de nuevos cebadores para completar la secuenciación. Las secuencias obtenidas se trataron como se describió en capítulos anteriores. Los diferentes plásmidos conteniendo los fragmentos aislados por hibridación sustractiva se enumeraron como pRDA, con numeración consecutiva.

5.2.6. Análisis por hibridación DNA-DNA (dot blot y Southern blot) de los fragmentos

Entre todos los fragmentos aislados por hibridación sustractiva, se seleccionaron cinco para estudiar su distribución en una colección de 28 cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida*, lo cual se llevó a cabo mediante un análisis de tipo dot blot.

Para estudiar la distribución en el genoma, de algunos de los genes de transposasas identificadas en el presente trabajo (*TrpA* y *TrpB*), el DNA de las cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* PC554.2 (*tester*), DI21, ATCC29690, B52 y EPOY 8803.II (*driver*), se sometió a digestión doble con los enzimas *Bgl*III y *Pst*I y se transfirió a una membrana como se describió anteriormente. A continuación, fragmentos parciales de los genes (*trpA* y *trpB*) que codificaban estas proteínas se amplificaron por PCR con

los cebadores trA5'-trA3' y trB5'-trB3' (Tabla V.5), y se utilizaron como sondas de DNA.

5.2.7. Análisis por PCR de los fragmentos

Con el objetivo de corroborar el resultado obtenido por dot blot respecto a la presencia-ausencia de los clones pRDA en varias cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, se diseñaron varias parejas de cebadores (Tabla V.6) para amplificar los insertos de determinados clones y utilizarlos posteriormente como sondas de DNA.

El programa elegido para la amplificación por PCR de los genes seleccionados consistió en un primer paso de desnaturalización a 94 °C durante 4 min seguido de 30 ciclos que constaron de: 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de *annealing* a temperaturas que variaron en función de las T_M de los oligonucleótidos y 30 s de elongación a 72 °C, ya que se eligieron para la detección por PCR fragmentos inferiores a las 500 pb.

5.2.8. Diseño de oligonucleótidos en el elemento SXT de *P. damsela* subsp. *piscicida*

Con el objetivo de amplificar algunos de los genes del elemento SXT de la cepa PC554.2, y así confirmar su presencia en esta cepa de *P. damsela* subsp. *piscicida* se diseñaron cinco parejas de cebadores. Cada reacción de PCR se preparó en un volumen final de 50 µL y el programa elegido para la amplificación de los genes seleccionados consistió en un primer paso de desnaturalización a 94 °C durante 4 min, seguido de 30 ciclos que constaron de: 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de hibridación a temperaturas que variaron en función de la T_M de los oligonucleótidos, y 90 s de elongación a 72 °C:

Pareja	Cebador	T ^a de hibridación	Tamaño esperado (pb)	Gen Diana
1	sxt-284 sxt-285	55° C	1427	<i>int</i>
	sxt-284.2			
2	sxt-286 sxt-287	63° C	1034	
3	sxt-243 sxt-244	58° C	1008	<i>traI</i>
4	sxt-119 sxt-227	61° C	553	<i>traC</i>
5	sxt-223 sxt-121	65° C	1044	<i>traN</i>

Los cinco fragmentos amplificados por PCR se extrajeron del gel de agarosa, se clonaron en el pGEM-T Easy, y se secuenciaron.

Para localizar el lugar de inserción del elemento SXT en la región *attB* de la cepa PC554.2, se diseñaron también dos oligonucleótidos (P4 y P5), uno a cada extremo de ésta. El DNA de la cepa se digirió con el enzima *Bam*HI y se realizó una reacción de ligación al plásmido pUC118, digerido previamente con el mismo enzima. El producto resultante se utilizó como molde en dos reacciones de PCR en la que se utilizaron los cebadores attL (P4) y attR (P5) y el cebador universal M13fw (Figura V.9).

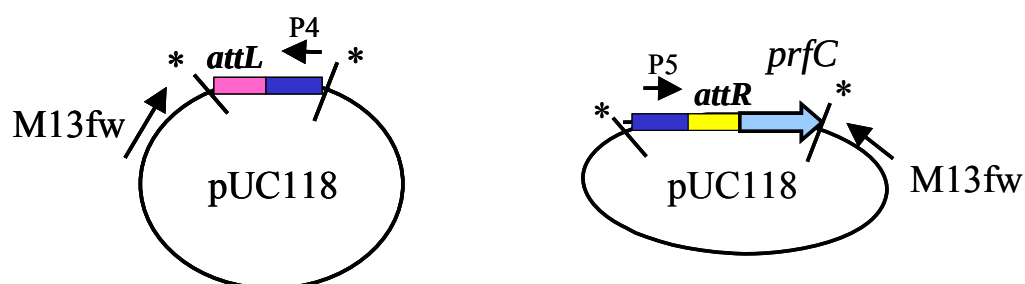


Figura V.9.-Esquema de la construcción que se llevó a cabo para amplificar el sitio de inserción del elemento SXT.

5.3. Resultados

5.3.1. Productos iniciales resultantes de la HS

La aplicación de la técnica de hibridación sustractiva a los genomas de las cepas *tester* y *driver*, siguiendo la metodología descrita, dio como resultado la amplificación de una serie de fragmentos de DNA. El análisis electroforético de los productos de amplificación resultantes de la segunda ronda de PCR de la hibridación sustractiva se muestra en la Figura V.10:

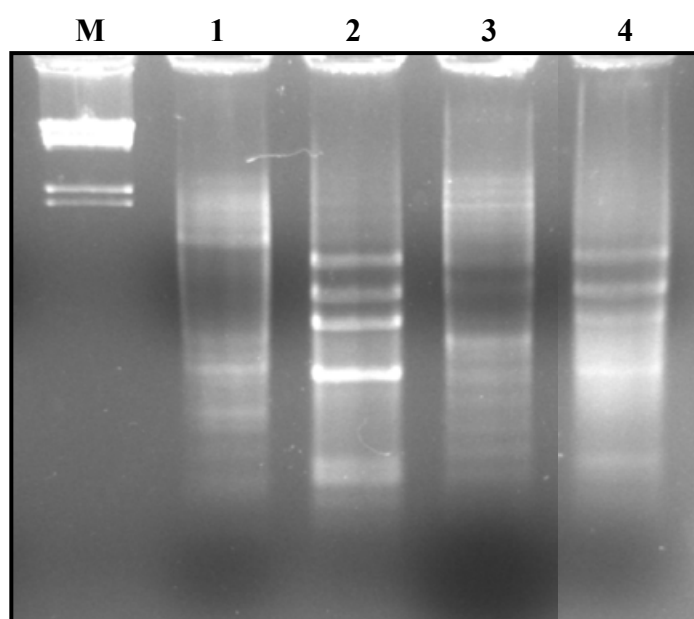


Figura V.10.-Resultados de la PCR 2 de la hibridación sustractiva. Análisis de los productos de amplificación obtenidos tras las dos rondas de PCR. Productos de amplificación primario (1) y secundario (2) utilizando como molde el DNA genómico digerido, ligado a los adaptadores y sometido a sendas hibridaciones de la cepa *tester* PC554.2. (3 y 4) Controles de la hibridación sustractiva ya que se realizó todo el proceso descrito para la cepa problema (PC554.2) con DNA genómico de *E. coli*.

5.3.2. Análisis preliminar de los fragmentos resultantes de la hibridación sustractiva.

Los fragmentos de PCR obtenidos tras la segunda ronda, se clonaron en el vector pGEM-T Easy y se transformaron en *E. coli*. De todas las colonias obtenidas tras la transformación se seleccionaron 98 para llevar a cabo el estudio de los fragmentos

contenidos en sus plásmidos. El primer estudio consistió en un análisis del patrón de restricción de los plásmidos con *EcoRI*. En la Figura V.11 se muestran los patrones de restricción de 24 clones escogidos al azar, dónde se puede comprobar que existe una amplia variedad de tamaños de inserto diferentes.

Tras este análisis se descartaron inicialmente 74 clones, 64 de ellos por presentar insertos de tamaño repetido con algún otro clon ya seleccionado (Por ejemplo, filas 13 y 14 de la Figura V.11), y los 10 restantes por no poseer ninguno (Fila 15 de la Figura V.11). Los clones restantes (23) se nombraron como pRDA_s y presentan insertos con tamaños que oscilan entre 0,7 y 2 kb.

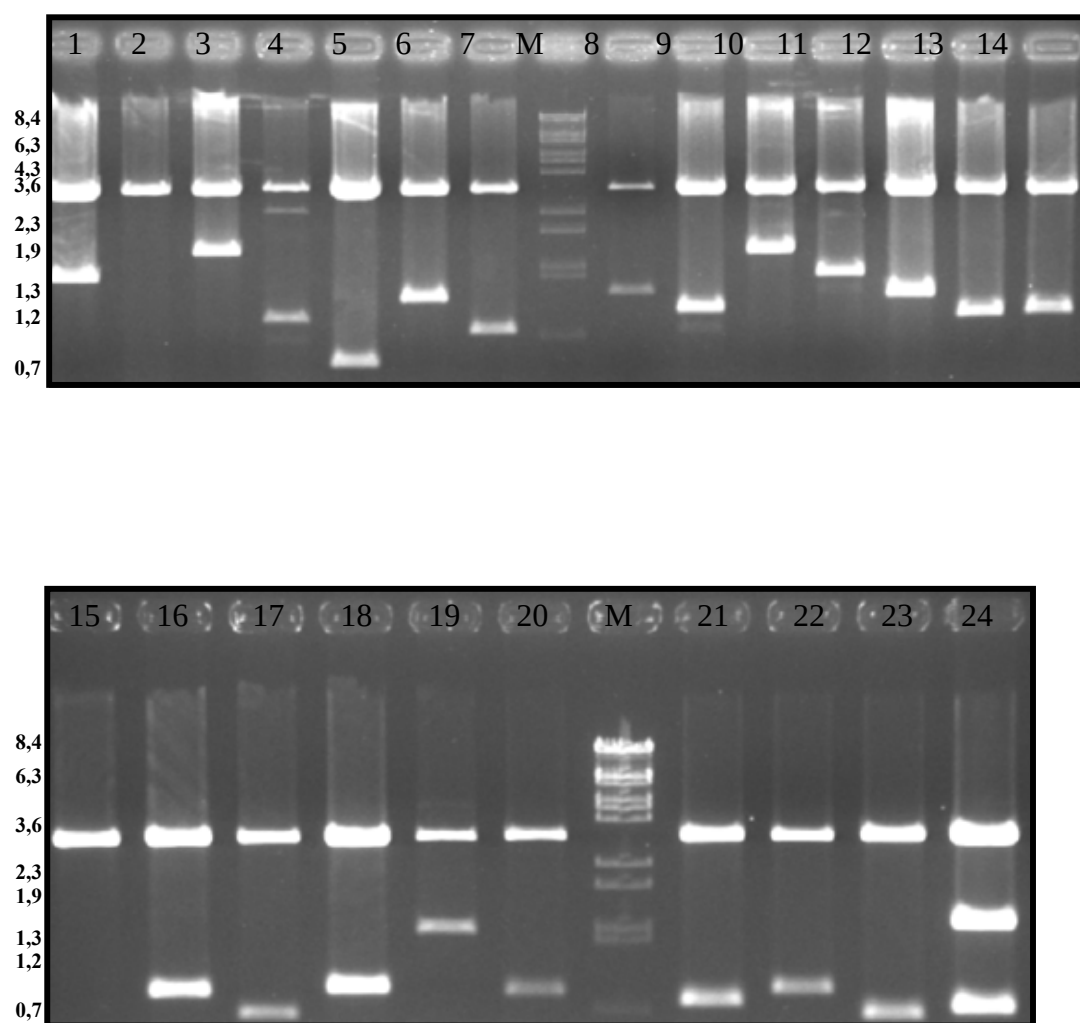


Figura V.11.-Análisis por restricción de los clones pRDAs. Gel de agarosa en el que se muestran algunas de las digestiones realizadas con el fin de conocer los tamaños de los fragmentos resultantes de la segunda PCR sustractiva clonados en el plásmido pGEM-T Easy.

5.3.3. Análisis inicial de los clones por dot blot

Los 23 clones seleccionados para su estudio se sometieron en primer lugar a un análisis por hibridación tipo dot blot para comprobar la especificidad de la técnica, en el cual se utilizaron como sonda los fragmentos escindidos del pGEM-T Easy de cada pRDA. Además de las cepas *tester* y la *driver* se incluyeron una cepa virulenta (DI21) y una avirulenta (ATCC 29690) de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Los resultados se muestran en la Figura V.12.

Como se observa en la Figura V.12, únicamente dos clones resultaron ser falsos positivos (pRDA 15 y 36), es decir, que estaban presentes en la cepa *driver*, mientras que los restantes 21 hibridaron con el DNA genómico de la cepa *tester* (PC554.2) pero no con el de la cepa *driver* (EPOY 8803-II).

Se localizaron cuatro clones presentes exclusivamente en las dos cepas virulentas (pRDA 5, 17, 19 y 23), mientras que los dieciséis restantes estaban en las cepas patógenas y en la ATCC 29690 no patógena. Uno de estos clones (pRDA 5) resultó ser exclusivo de la cepa PC554.2.

5.3.4. Secuenciación de los clones pRDAs seleccionados

Los 21 fragmentos escogidos tras comprobar que no eran falsos positivos se secuenciaron y las secuencias se sometieron a una búsqueda en las bases de datos para identificar posibles homologías con proteínas ya descritas. Se infirieron así un total de 26 posibles ORFs diferentes, tanto completas como parciales (Tabla V.1).

De todas estas ORFs, seis (pRDA 13, 14, 17, 24, 32 y 37) no mostraron una similitud significativa con ninguna de las entradas ofrecidas por la base de datos. Estas proteínas se nombraron como “proteína hipotética de *P. damsela* subsp. *piscicida*”. Hasta la fecha se han secuenciado un gran número de genomas bacterianos, entre ellos importantes patógenos, en los que se reveló la presencia de más de un 25% de genes hipotéticos sin una función conocida (Fraser, 2000). Las restantes ORFs mostraron similitud con proteínas ya descritas en otras especies bacterianas. Los clones englobados dentro de esta categoría se subdividieron en dos grupos A y B:

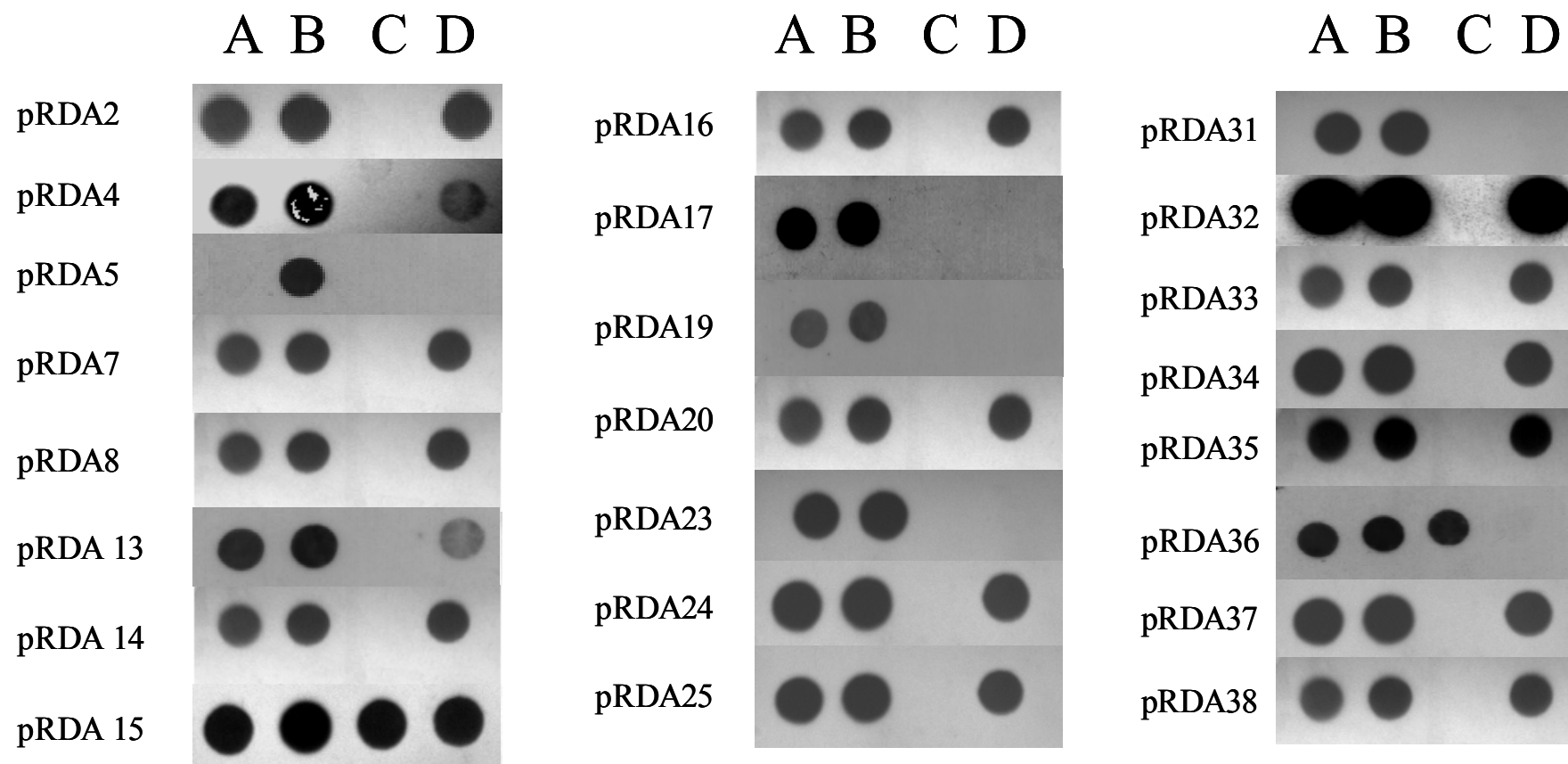


Figura V.12.-Análisis por dot blot de los fragmentos sustraídos en las cepas DI21 (A), PC554.2 (*tester*) (B), EPOY 8803-II (*driver*) (C), y ATCC 29690 (D). Los números de la izquierda indican el clon de cada pRDA utilizado.

Grupo A

En el grupo A se englobaron clones que contenían diversos tipos de secuencias, que presentaron homología con proteínas descritas en otras especies bacterianas. En cuatro clones (pRDA 2, 7, 8 y 38), se encontraron ORFs que codifican proteínas homólogas de proteínas implicadas en el transporte de moléculas a través de la membrana plasmática bacteriana. Es el caso de un transportador tipo ABC de arginina (pRDA 2), una proteína que une ATP, posiblemente formando también parte de un transportador ABC (pRDA 7). El clon pRDA 8 contiene una posible proteína reguladora del transporte de fosfoglicerato, y el clon pRDA 38 un posible transportador de N-acetilglucosamina.

En otro clon se localizaron 2 ORFs parciales con homología a proteínas implicadas en la secreción de moléculas al exterior celular (pRDA 25). Este clon contiene los extremos N y C terminales de dos ORFs que mostraron su mayor similitud con las proteínas SecD y SecF de *P. profundum*. Los homólogos de estas proteínas, en especies como *E. coli*, forman parte de un sistema de exportación de membrana (Figura V.13).

```

PRDA25:  VQACIWGMVAVMIFTLVYYKAFGLIANLALAMNLVLIIGIMSMIPGATMTLPGIAGIVLT
          +QA IWGMVAVM+FTL+YY+ FGLIAN+AL MNLVLIIG+MSMIPGATMTLPGIAGIVLT
Homol:  456 IQAMIWGMVAVMLFTLIYYRGFGLIANMALVMNLVLIIGVMSMIPGATMTLPGIAGIVLT 515

PRDA25:  VGMAVDANVLIFERIREELREGRSPQQAIQQGYANAFSTIADANITTLITAILFAVGTG
          VGMAVDANVLIFERIREELREGRSPQQAIQQGYANAFSTIADANITTLITAILFAVGTG
Homol:  516 VGMAVDANVLIFERIREELREGRSPQQAIQQGYANAFSTIADANITTLITAILFAVGTG 575

PRDA25:  AIKGFVTLSIGILTSMTAIVCTRAVVNWLYGGKRIDKLSI
          AIKGFVTLSIGILTSMTAI+ TRAVVN++YGGKR+DKLSI
Homol:  576 AIKGFVTLSIGILTSMTAIIIGTRAVVNFVYGGKRVKLSI 617

```

Figura V.13.-Alineamiento comparativo de la secuencia de aminoácidos de la ORF 1 del clon pRDA25 con su homólogo, la proteína SecD de *P. profundum* (Homol). Las cruces indican similitud entre los aminoácidos y las letras identidad.

Se identificó también en el clon pRDA 4 una ORF similar a una helicasa dependiente de RNA de *P. profundum*. A pesar de que no se ha descrito ninguna relación de estas helicasas con la virulencia de ninguna especie bacteriana, Choi *et al.* (2002) aplicando la técnica de la SSH ya habían encontrado dos homólogos de este tipo

de proteínas en una cepa virulenta de *P. aeruginosa*, lo cual sugiere que este tipo de genes son candidatos a mostrar presencia diferencial entre cepas.

Varios de los clones contenían ORFs que codifican proteínas relacionadas con la biosíntesis de sideróforos. Entre ellos, se incluye un homólogo de una fosfopanteteinil transferasa de *V. anguillarum*, que mostró un 34% de identidad con la proteína deducida del inserto del clon pRDA 31 (Figura V.14).

```

PRDA31:      FDKESFDLSVAERLNIEIPDSVLRVSVNKRQAEFTAGRYMAQLCIETLSNMHCSIPIGSHR
              FD  +  + E+LN+  P ++ ++V KR+AE+ A RY A+  +  L      ++ G  R
Homol:      42 FDLSEYHDELFEQLNLPFPATLTAKVKKRRAEYLAARYCARQLLAQLGQPAFNLISGHDR 101

PRDA31:      EPLWPECLTGAISHTDNQAIALVAKQPSYQFVGLDIETNIEKEVAQQICRDVYDADECAI
              P+WP+ + G++SH+ + AI L A Q  + +G+DIE  +++++ +I + + + E  +
Homol:      102 APIWPQNICGSVSHSHCAIVLAAPQTHNRLIGVDIEAIVDRQNIDEITKMIVNDKEIQL 161

PRDA31:      VSKQGLSLEVATTVIFSAKESLFKALFSYVGRFFGFECARVIELNETNNSIVLMLDKGLS
              +   L LE A T+ FS KESL+KAL+ V RFFGFE A +I L+  NN I L L + L+
Homol:      162 LKHCHLPLEQAFTLAFSVKESLYKALYPQVKRFFGFEEAIEIALSLENNEITLALRETLT 221

PRDA31:      RYCSGKQIFKCRYFIH
              +      +F+ ++ I+
Homol:      222 PHYTAGTLFRGQFIY 237

```

Figura V.14.-Alineamiento entre una ORF del clon pRDA 31 con la fosfopanteteinil transferasa de *V. anguillarum* (Homol). Las cruces indican similitud entre los aminoácidos y las letras identidad.

Este enzima está implicado en la síntesis del sideróforo anguibactina, y el gen que la codifica se encuentra formando parte del plásmido pJM1. Éste incluye un conjunto de genes que codifican los componentes de un sistema de captación de hierro de alta afinidad de este patógeno de peces, mediado por el sideróforo anguibactina (Di Lorenzo *et al.*, 2003). A las fosfopanteteinil transferasas se les atribuye en varias especies bacterianas un papel fundamental en la activación de los dominios de transporte de las proteínas implicadas en la síntesis no ribosómica de péptidos. Se localizaron además entre los clones sustraídos homólogos de corismato mutasas, enzimas implicadas también en la síntesis de sideróforos en muchas especies bacterianas.

El clon pRDA 23 contiene una ORF similar a una DAHP sintetasa de *V. anguillarum*, que forma parte del plásmido pJM1 (Di Lorenzo *et al.*, 2003) y una segunda ORF con un 100% de similitud con una proteína de la familia AraC de

activadores transcripcionales. El gen de este activador AraC, ya había sido descrito en un estudio previo en nuestro laboratorio (Osorio *et al.*, 2004b), y se encontró que forma parte de un operón de genes regulados por la proteína Fur. La hibridación dot blot realizada señaló una posible relación entre la presencia de este gen y la virulencia, ya que de acuerdo con los experimentos, las secuencias contenidas en el clon pRDA 23 están ausentes en las cepas no patógenas de la bacteria.

Grupo B

En el grupo B se incluyeron las ORFs correspondientes a posibles secuencias de inserción de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Entre ellas se identificaron tres transposasas diferentes. Dos de ellas, de 86 y 141 aminoácidos respectivamente, presentaron una elevada similitud con dos hipotéticas transposasas A y B de *V. vulnificus* (Figuras V.15 y V.16 respectivamente) por lo que se las designó como transposasa A (TrpA) y transposasa B (TrpB) de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Una tercera transposasa mostró similitud con una transposasa descrita en un plásmido relacionado con la virulencia de *Shigella flexneri* (Jin *et al.*, 2002).

<i>P. piscicida</i>:	1	MATIDVKCRFCNQAEQVRKYGTNPRGAQRYRCFDCNRTFLLDYAYEACKPGVKEKIVDMA	60
		MATI +CRFCNQ E VRK+GT G QR+RC +C R+F LDY YEA KP VK++I+DMA	
<i>V. vulnif</i>:	1	MATIQACRFCNQTEHVRKHGTGVTGFQRFRCIECKRSFQLDYVYEAYKPNVKKQIIDMA	60
<i>P. piscicida</i>:	61	MNSSGVRETGRVLKVGYNTPR	82
		MNSSGVRET RVLKVGYNTPV R	
<i>V. vulnif</i>:	61	MNSSGVRETSRVLKVGYNTPVLR	82

Figura V.15.-Alineamiento comparativo de la secuencia de aminoácidos de la transposasa A de *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. vulnificus*.

La transposasa A se localizó en varios clones (pRDA 2, 8, 13, 20 y 33), siendo la secuencia que la flanqueaba diferente en cada uno de ellos. Esto fue un primer indicio de que el gen *trpA* que la codifica se encontraba insertado en múltiples copias en el genoma de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Con el fin de comprobar el patrón de distribución de ambas transposasas en el genoma de *P. damsela*, se llevaron a cabo experimentos de hibridación DNA-DNA, cuyos resultados se describirán en un apartado posterior.

```

P. piscicida: 1 MTTIPFDIAHIELICEVDEQWSFVGKKKNQRWLWYAWEPYKRVIAHVFGKRDSETFHKL 60
                MT+IPFD A+I LICEVDEQWSFVGKKKN+RWLWYAWEPYKR+IAH FGKR+++ L
V. vulnif: 1 MTSIPFDKANISLICEVDEQWSFVGKKKNRRWLWYAWEPYKR+IAHAFGKRNTDALRSL 60

P. piscicida 61 QRLLLPFTIPIYCTDDFKVYSSYLPREDHIIGKRYTQRIERTNLTLRSRLKRLVRKTIGF 120
                LL PF I + TDDF VY+ LP+E H++GKR+TQRIERTNLTLRSRLKRLVR+TIGF
V. vulnif: 61 LTLLKPFDISFFFTDDFSVYAKELPKEKHVVGKRFTQRIERTNLTLRSRLKRLVRRTIGF 120

P. piscicida: 121 SKSEEMHDKVIGTFIEREFY 140
                S+SEEMHDKVIGTFIEREFY
V. vulnif: 121 SRSEEMHDKVIGTFIEREFY 140

```

Figura V.16.-Alineamiento comparativo de la secuencia de aminoácidos de la transposasa B de *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. vulnificus*.

Como se refleja en la Figura V.16, la transposasa B de *P. damsela* subsp. *piscicida* guarda una gran similitud con la transposasa B de *V. vulnificus*. En este caso no se pudo comprobar *a priori* si el gen que codifica esta transposasa estaba insertado en copia múltiple en el genoma de *P. damsela* dado que el gen *trpB* se detectó únicamente en el clon pRDA 16.

Dentro de este grupo B, se incluyó también el clon pRDA 5, que contiene una ORF parcial que mostró una elevada similitud con una proteína de función no caracterizada todavía, y que forma parte del elemento SXT de *V. cholerae*, así como de un elemento homólogo caracterizado en *Providencia rettgeri*. La identidad de la secuencia de nucleótidos entre el clon pRDA 5 y su homólogo en *V. cholerae* y *P. rettgeri* fue superior al 94% y la identidad entre las secuencias aminoacídicas deducidas fue del 93% (Figura V.17).

```

pRDA 5: 1 FRDYCSFMYFRLAEPHANKPLKEVLALIRQYSFWMPQYIWLQGHHDITYHLPAEDENGNT 60
          FRD CSFMYFRLAEPHA+KPLKEVLALIRQYSFWMPQYIWLQGH IDTYHLPAEDENG
P. rettgeri: 131 FRDDCSFMYFRLAEPHASKPLKEVLALIRQYSFWMPQYIWLQGLIDITYHLPAEDENGNA 190

pRDA 5: 61 VGVRF 65
          VGVRF
P. rettgeri: 191 VGVRF 195

```

Figura V.17.-Alineamiento comparativo de la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida de la secuencia del clon pRDA 5, con la de una proteína hipotética descrita en el elemento conjugativo e integrativo de *P. rettgeri*.

Este elemento es representativo de una familia de elementos móviles conjugativos e integrativos (ICEs: *Integrative & Conjugative Elements*), que contienen múltiples genes de resistencia a antibióticos (Beaber *et al.*, 2002). Se dedicará un apartado posterior a la descripción más exhaustiva de este elemento, así como a toda la

información recabada acerca del mismo a través de los diferentes experimentos realizados.

Tabla V.1.- Análisis de los insertos específicos presentes en la cepa patógena PC554.2 y ausentes en la no patógena EPOY-8803-II.

No de fragmento	Tamaño ORF (pb)	Predicción de la proteína (aa)	No de acceso	Homologías de las proteínas predecidas	Identidad de aminoácidos (%)	Similitud de aminoácidos (%)	No de acceso de la proteína homóloga
pRDA2	192	222	AJ749789	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> Transportador ABC de Arginina. Componente permeasa	73	89	Q87IG7
	258	91		Transposasa A de <i>Vibrio vulnificus</i>	70	80	Q7MPO6
pRDA4	330	419	AJ749790	Hipotética RNA helicasa de <i>Photobacterium profundum</i> SRBM dependiente de ATP	83	92	CAG18985
	216	259		Proteína hipotética de <i>Photobacterium profundum</i>	77	87	CAG18984
pRDA5	219	195	AJ749791	Proteína hipotética de <i>Providencia rettgeri</i> y gen del elemento SXT de <i>Vibrio cholerae</i>	93	95	Q8RL11
pRDA7	540	759	AJ749792	Cassette de unión de ATP de <i>Helicobacter pylori</i>	42	61	Q9ZK71
pRDA8	246	419	AJ749793	Proteína hipotética reguladora del transporte de fofoglicerato de <i>Photobacterium profundum</i>	48	74	CAG21141
	258	91		Transposasa A de <i>Vibrio vulnificus</i>	70	80	Q7MPO6
pRDA13	156		AJ749794	No se encontraron homólogos en la base de datos	-	-	-
	258	91		Transposasa A de <i>Vibrio vulnificus</i>	70	80	Q7MPO6
pRDA14	459		AJ749795	No se encontraron homólogos en la base de datos	-	-	-
pRDA16	423	141	AJ749797	Transposasa B hipotética de <i>Vibrio vulnificus</i>	76	87	Q7MPO5
pRDA17	588		AJ749798	No se encontraron homólogos en la base de datos	-	-	-
pRDA19	246	203	AJ749800	Subunidad monohemo de la Cytochromo C oxidasa de <i>Pseudomonas stutzeri</i>	57	72	Q8KS21
	303	488		Cytochromo C oxidasa de <i>Vibrio marinus</i>	41	65	Q9RAO8
pRDA20	258	91	AJ749801	Transposasa A de <i>Vibrio vulnificus</i>	70	80	Q7MPO6
pRDA23	717	241	AJ749802	Probable activador transcripcional de la familia AraC de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	100	100	Q8NXYE5
	504	277		Probable DHAP sintetasa de <i>Vibrio anguillarum</i>	48	67	Q83XJ7
pRDA24	579		AJ749803	No se encontraron homólogos en la base de datos	-	-	-
pRDA25	528	617	AJ749804	Proteína hipotética de exportación SecD de <i>Photobacterium profundum</i>	73	79	CAG19158
	186	315		Hipotética subunidad translocasa SecF de <i>Photobacterium profundum</i>	67	78	CAG19159
pRDA31	621	230	AJ749799	Fosfopanteteinil transferasa de <i>Vibrio anguillarum</i>	34	58	Q83XK1
pRDA32	516		AJ749808	No se encontraron homólogos en la base de datos	-	-	-
pRDA33	258	91	AJ749809	Transposasa A de <i>Vibrio vulnificus</i>	70	80	Q7MPO6
	198	186		Corismato mutasa de <i>Yersinia pestis</i>	75	83	Q8ZGE8
pRDA34	240	186	AJ749806	Corismato mutasa de <i>Photobacterium luminescens</i>	37	55	Q7MB89
pRDA35	414	248	AJ749807	Proteína hipotética de <i>Photobacterium profundum</i>	33	66	CAG20188
pRDA37	129	402	AJ749812	Transposasa de <i>Shigella flexneri</i>	35	55	Q8VSM0
	372			No se encontraron homólogos en la base de datos	-	-	-
pRDA38	102	509	AJ749800	Transportador II específico de <i>N</i> -acetilglucosamina de <i>Vibrio cholerae</i>	87	90	O32444

5.3.5. Análisis de los fragmentos por hibridación DNA-DNA

De las 26 ORFs desprendidas del análisis por secuenciación de los fragmentos, se centró la atención en los clones pRDA19, 23, y 31, que contenían ORFs que estaban presentes en las dos cepas virulentas DI21 y PC554.1 pero ausentes en las dos no virulentas EPOY 8803-II y ATCC 29690. Se incluyó además el clon pRDA5 ya que resultó estar presente únicamente en la cepa *tester*, y el clon pRDA25, que se consideró de especial interés por tener homología con un sistema de secreción de proteínas extracelulares y por su posible relación con la virulencia.

Para conocer la distribución de estos fragmentos de DNA se llevó a cabo un análisis por hibridación dot blot utilizando una membrana en la que se había transferido el DNA de 9 cepas virulentas y dos avirulentas de *P. damsela* subsp. *piscicida*, además de 17 cepas cuya LD₅₀ no ha sido determinada. Todos los resultados obtenidos con la hibridación dot blot se confirmaron por PCR. La Tabla V.2 recoge los resultados de las hibridaciones y las PCRs realizadas con los cinco fragmentos de DNA. Los números que aparecen en las Figuras V.18 y V.19, V.20 y V.21 se corresponden con las cepas enumeradas en la Tabla V.2.

El clon pRDA23 contiene dos ORFs parciales que codifican para una DAHP sintetasa y un activador transcripcional de la familia AraC. Ambos genes podrían estar relacionados con los mecanismos de captación de hierro mediados por sideróforos. Por ello, el estudio de su distribución en la especie es de especial interés, dadas las implicaciones que los mecanismos de captación de hierro pueden tener en la virulencia. La secuencia de DNA de este clon demostró estar ausente en las dos cepas de *piscicida* consideradas no virulentas, pero también está ausente en otros siete aislados, tres de los cuales sí lo son (Figura V.18 y Tabla V.2). No fue posible encontrar un patrón común en las cepas que carecen de estos genes, si bien sí se puede apuntar que, entre las cepas negativas, se encuentran prácticamente todos los aislados japoneses (excepto la cepa MP7801, que dio un positivo débil) y la cepa americana ATCC 17911.

El clon pRDA31 contiene secuencias de DNA que codifican una fosfopanteteinil transferasa, enzima implicada en la síntesis no ribosómica de sideróforos. Los datos de presencia/ausencia de este clon en la población de *P. damsela* subsp. *piscicida* indican una distribución muy similar a la del clon anterior (Figura V.19 y Tabla V.2). Todas las cepas negativas para pRDA23 fueron también negativas para pRDA31, y solamente dos cepas mostraron contener el gen de la fosfopanteteinil transferasa y al mismo tiempo

carecer de los genes de la DAHP sintetasa y el activador transcripcional AraC. Los resultados obtenidos por hibridación con el clon pRDA31 se corroboraron por amplificación por PCR (Figura V.20).

El clon pRDA25 demostró contener dos proteínas homólogas a SecD y SecF de *E. coli*. El estudio de su distribución demostró que están presentes en menos de la mitad de las cepas analizadas. No fue posible encontrar una correlación entre la presencia de estos genes y el origen geográfico o de hospedador (Figura V.21 y Tabla V.2).

Resultados similares se obtuvieron al analizar la distribución del clon pRDA19, que contiene secuencias que codifican para posibles citocromo C oxidasas. Este clon mostró estar ausente en las dos cepas no patógenas, pero también en numerosas cepas que sí se consideran virulentas. El origen geográfico o de aislamiento no se pudo correlacionar con la presencia-ausencia de este fragmento de DNA (Tabla V.2).

El análisis del clon pRDA5, que mostró estar presente únicamente en la cepa *tester*, se describe en un apartado posterior, donde se estudia el elemento tipo SXT.

Los resultados obtenidos tras este análisis de presencia/ausencia de genes en la colección de aislados de *P. damsela subsp. piscicida* demuestran la existencia de un alto grado de heterogeneidad genética, al menos en lo que respecta a las regiones de DNA ensayadas.

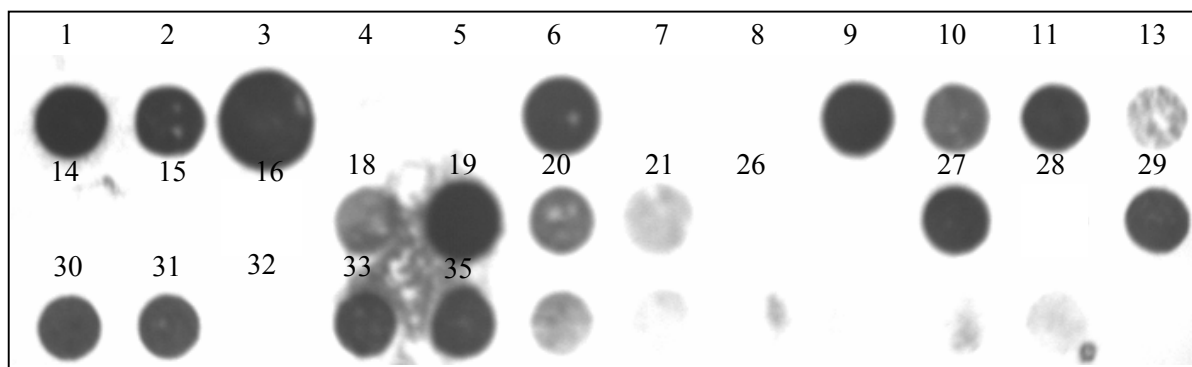


Figura V.18.-Distribución del fragmento del clon pRDA23 entre diferentes cepas virulentas y avirulentas de *P. damsela* subsp. *piscicida*. (1) DI21 (2) B52 (3) C1(4) ATCC 17911 (5) ATCC 29690 (6) 666.1 (7) 1083 1(8) IT-2 (9) 069A (10) 2101 (11) ATLIT 2 (13) MP7801 (14) EPOY 8803-II (15) P3333 (16) MZS 8001 (18) PC554.2 (19) PC435.1 (20) Lgh 41/01 (21) Lgr 52/02(26)Pp.5 (27) TW 515/02 (28) EW 194/97 (29) 188/98 (30) Nuno (31) PC610.1 (32) R.46 (33) PC267.1 (35) 91.197.

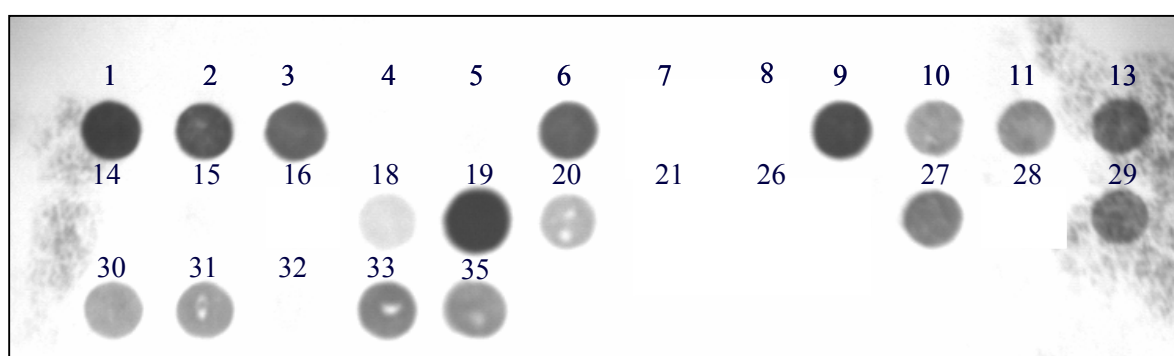


Figura V.19.-Distribución del fragmento del clon pRDA31 entre diferentes cepas virulentas y avirulentas de *P. damsela* subsp. *piscicida*. (1) DI21 (2) B52 (3) C1(4) ATCC 17911 (5) ATCC 29690 (6) 666.1 (7) 1083 1(8) IT-2 (9) 069A (10) 2101 (11) ATLIT 2 (13) MP7801 (14) EPOY 8803-II (15) P3333 (16) MZS 8001 (18) PC554.2 (19) PC435.1 (20) Lgh 41/01 (21) Lgr 52/02(26)Pp.5 (27) TW 515/02 (28) EW 194/97 (29) 188/98 (30) Nuno (31) PC610.1 (32) R.46 (33) PC267.1 (35) 91.197.

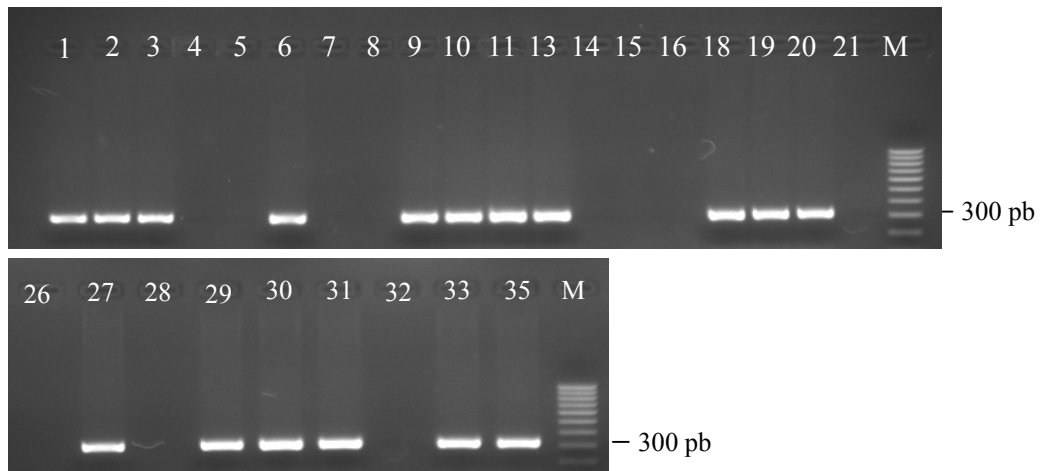


Figura V.20.-Análisis por PCR de la distribución del fragmento del clon pRDA31 entre diferentes cepas virulentas y avirulentas de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

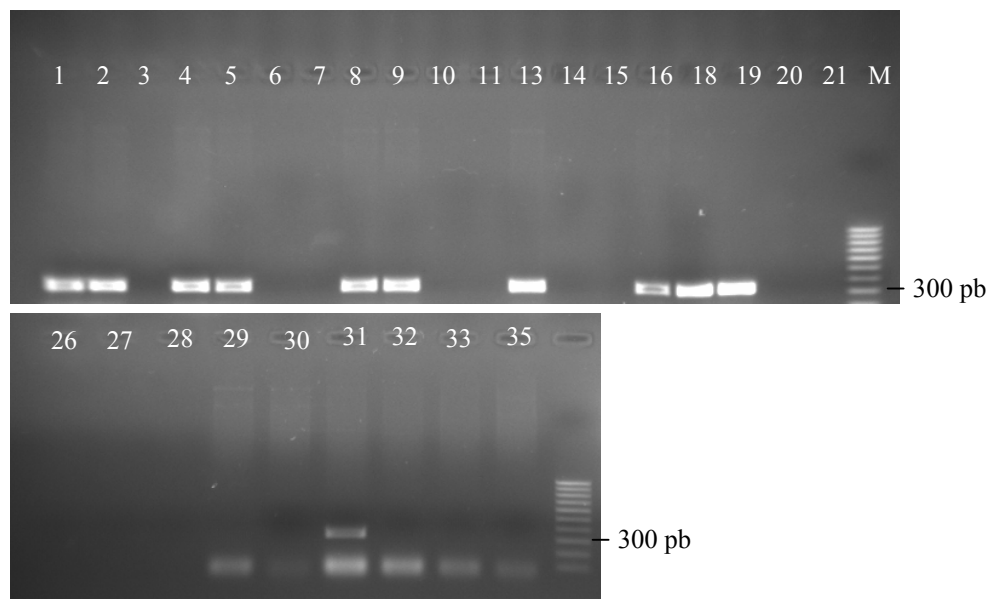


Figura V.21.-Análisis por PCR de la distribución del fragmento del clon pRDA25 entre diferentes cepas virulentas y avirulentas de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Tabla V.2.-Distribución de fragmentos específicos de la cepa *tester* entre cepas virulentas y avirulentas de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Los resultados se obtuvieron mediante dot-blot y PCR.

Nº	Cepa	pRDA5	pRDA31	pRDA19	pRDA23	pRDA25
Cepas altamente virulentas						
1	DI21	-	+	+	+	+
2	B52	-	+	+	+	+
7	1083 1	-	-	+	-	-
8	IT-2	-	-	+	-	+
11	ATLIT 2	-	+	-	+	-
13	MP7801	-	+	-	+	+
16	MZS 8001	-	-	-	-	+
18	PC554.2	+	+	+	+	+
19	PC435.1	-	+	+	+	+
Cepa moderadamente virulenta						
4	ATCC 17911	-	-	-	-	+
Cepas no virulentas						
5	ATCC 29690	-	-	-	-	+
14	EPOY 8803-II	-	-	-	-	-
Virulencia sin determinar						
3	C1	-	+	+	+	-
6	666.1	-	+	+	+	-
9	069A	-	+	+	+	+
10	2101	-	+	-	+	-
15	P3333	-	-	-	-	-
20	Lgh 41/01	-	+	+	+	-
21	Lgr 52/02	-	-	+	+	-
26	Pp.5	-	-	-	-	-
27	TW 515/02	-	+	-	+	-
28	EW 194/97	-	-	-	+	-
29	188/98	-	+	-	+	-
30	Nu no	-	+	+	+	-
31	PC610.1	-	+	+	+	+
32	R.46	-	-	+	-	-
33	PC267.1	-	+	+	+	-
35	91.197	-	+	-	+	-

5.3.6. Análisis por hibridación de los clones que codifican para transposasas

En este estudio se localizaron varios clones conteniendo un primer tipo de transposasa (transposasa A), un clon que contenía un segundo tipo de transposasa (transposasa B) que mostraron un alto grado de similitud con dos hipotéticas transposasas (A y B respectivamente) de *V. vulnificus*, y además una tercera ORF con similitud a una transposasa de *S. flexneri*.

Para comprobar el patrón de inserción de estos elementos móviles en el genoma de diversas cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* se llevó a cabo una hibridación tipo Southern blot utilizando como sonda un fragmento amplificado de las transposasas A y B. En la Figura V.22 se muestra el patrón resultante de la hibridación del gen que codifica para la transposasa A:

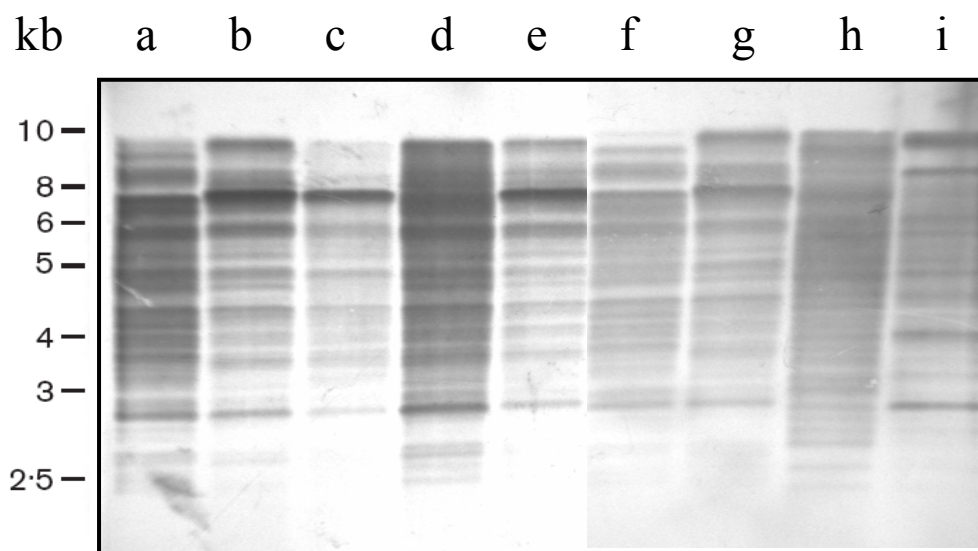


Figura V.22.-Hibridación tipo Southern blot utilizando una membrana a la que se transfirió el DNA cromosómico de diferentes cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* digerido con *Bgl*III y *Pst*I. Se utilizó como sonda un fragmento del gen *trpA*. Las líneas indican las cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* utilizadas: DI21 (a), PC554.2 (b), ATCC 17911 (c), 10831 (d), ATLIT2 (e), IT-2 (f), 666.1 (g), MP7801 (h), ATCC 29690 (i). Los tamaños moleculares (kb) se indican a la izquierda de la Figura.

La transposasa A resultó estar presente en todas las cepas ensayadas de *P. damsela* subsp. *piscicida* a excepción de la cepa *driver* EPOY-8803. Se probó asimismo la amplificación por PCR de algunas cepas de la subespecie *damsela* con los cebadores trA5'-trA3', citados en los materiales y métodos, para comprobar la presencia/ausencia de la transposasa A en esta subespecie, obteniéndose en todos los

casos producto de amplificación (dato no mostrado). Ello indica que, si bien esta transposasa no está presente en todas las cepas de la subsp. *piscicida*, tampoco es específica de ésta.

El gen de la transposasa B se había detectado en un único clon, el pRDA16. Para determinar si esta transposasa también estaba presente en copia múltiple en el cromosoma de *P. damsela*, se utilizó como sonda en un experimento de hibridación.

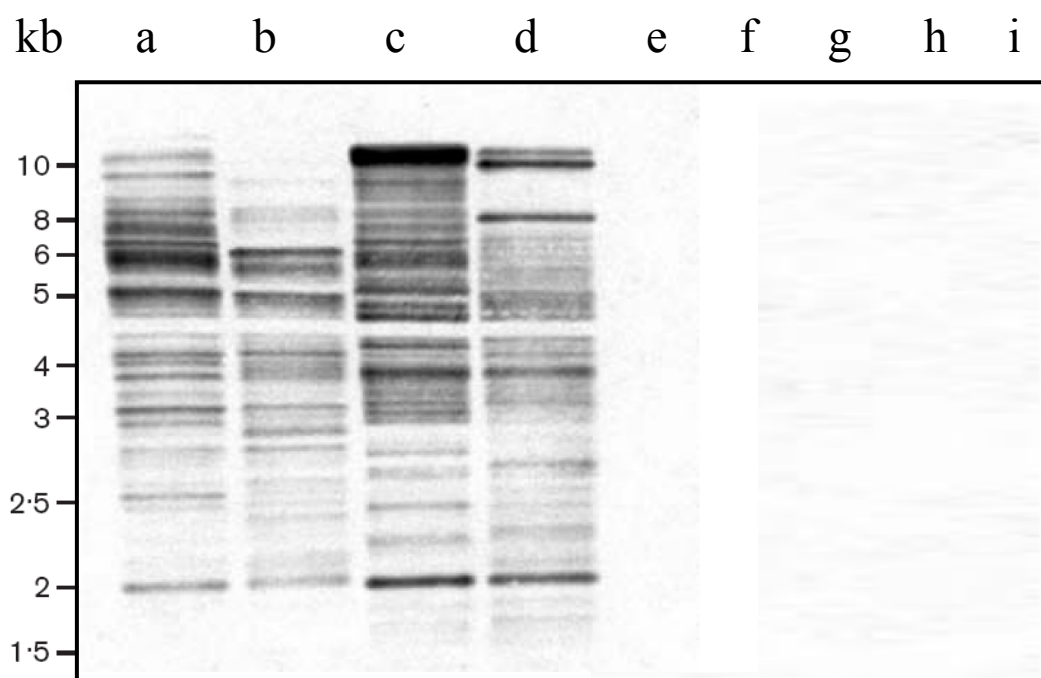


Figura V.23.-Hibridación tipo Southern blot utilizando una membrana a la que se transfirió el DNA cromosómico de diferentes cepas de *P. damsela* digerido con *Bgl*II y *Pst*I. Se utilizó como sonda un fragmento del gen *trpB*. Las líneas indican las siguientes cepas de *P. damsela* utilizadas. subsp. *piscicida*: (a) PC554.2, (b) DI21, (c) ATCC 29690, (d) B52, (e) EPOY 8803-II. subsp. *damsela*: (f) ATCC 33539, (g) RM71, (h) RG91 y (i) LD-O7. Los tamaños moleculares (kb) se indican a la izquierda de la Figura.

La transposasa B resultó estar presente también en todas las cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* que se habían probado para la transposasa A, y se comprobó que existe en copia múltiple al igual que ésta (Figura V.23 y datos no mostrados). Sin embargo, no se obtuvo hibridación con el DNA genómico de las cepas ensayadas de la subespecie *damsela* (Figura V.23). Asimismo, las PCRs realizadas con los cebadores trB5'1-trB3'1 (que amplifican el gen de la transposasa B), no rindieron tampoco ningún producto de amplificación (dato no mostrado), lo que sugiere que la transposasa B es

una secuencia específica de *P. damsela subsp. piscicida*, que la diferencia de la subespecie *damsela*.

5.3.7. Identificación y descripción de un elemento similar al SXT de *V. cholerae* en la cepa *tester* PC554.2

5.3.7.1. Determinación de la presencia del elemento SXT de *P. damsela subsp. piscicida*

Dentro del subgrupo A que se estableció cuando se clasificaron los clones pRDA se incluyó el clon pRDA5, exclusivo de la cepa *tester* PC554.2. Este clon incluye una ORF parcial que muestra una elevada similitud (95%) con una proteína hipotética perteneciente al elemento SXT de *V. cholerae* y *Providencia rettgeri* (Tabla V.1). Este elemento es representativo de una familia de elementos genéticos móviles conjugativos tipo transposones que integran un gran número de genes de resistencia a antibióticos, principalmente el Sulfametoxazol, Trimetoprim y Cloranfenicol (Beaber *et al.*, 2002a).

Para corroborar la hipótesis de la existencia de un elemento SXT conjugativo en el genoma de la cepa PC554.2 (*tester*) que podría estar muy conservado con respecto a otros descritos en el genoma de diversas especies (Boltner y Osborn, 2004), se llevó a cabo un análisis mediante amplificación por PCR, y posterior secuenciación, de cuatro genes presentes en este elemento. Para ello, se diseñaron cinco pares de oligonucleótidos diferentes en la secuencia de varios genes del elemento R391 (variante del elemento SXT de *V. cholerae*) de *Providencia rettgeri*, concretamente las de los genes que codifican una integrasa (*int*), una relajasa (*traI*), una proteína de ensamblaje del pilus (*traC*) y una proteína de ensamblaje y síntesis del pilus (*traN*) (Tabla V.3). La secuencia de estos genes mostró estar muy conservada en elementos del tipo SXT de *V. cholerae*, *P. rettgeri*, *Proteus mirabilis* y *Shewanella putrefaciens*, y la detección de homólogos de estos genes podría indicar sin género de dudas la presencia de un elemento similar en *P. damsela subsp. piscicida*.

Como resultado de la amplificación por PCR, se obtuvieron productos del tamaño que se había estimado previamente sobre la base del elemento conjugativo R391 de *P. rettgeri*, que se clonaron y secuenciaron (Figura V.24).

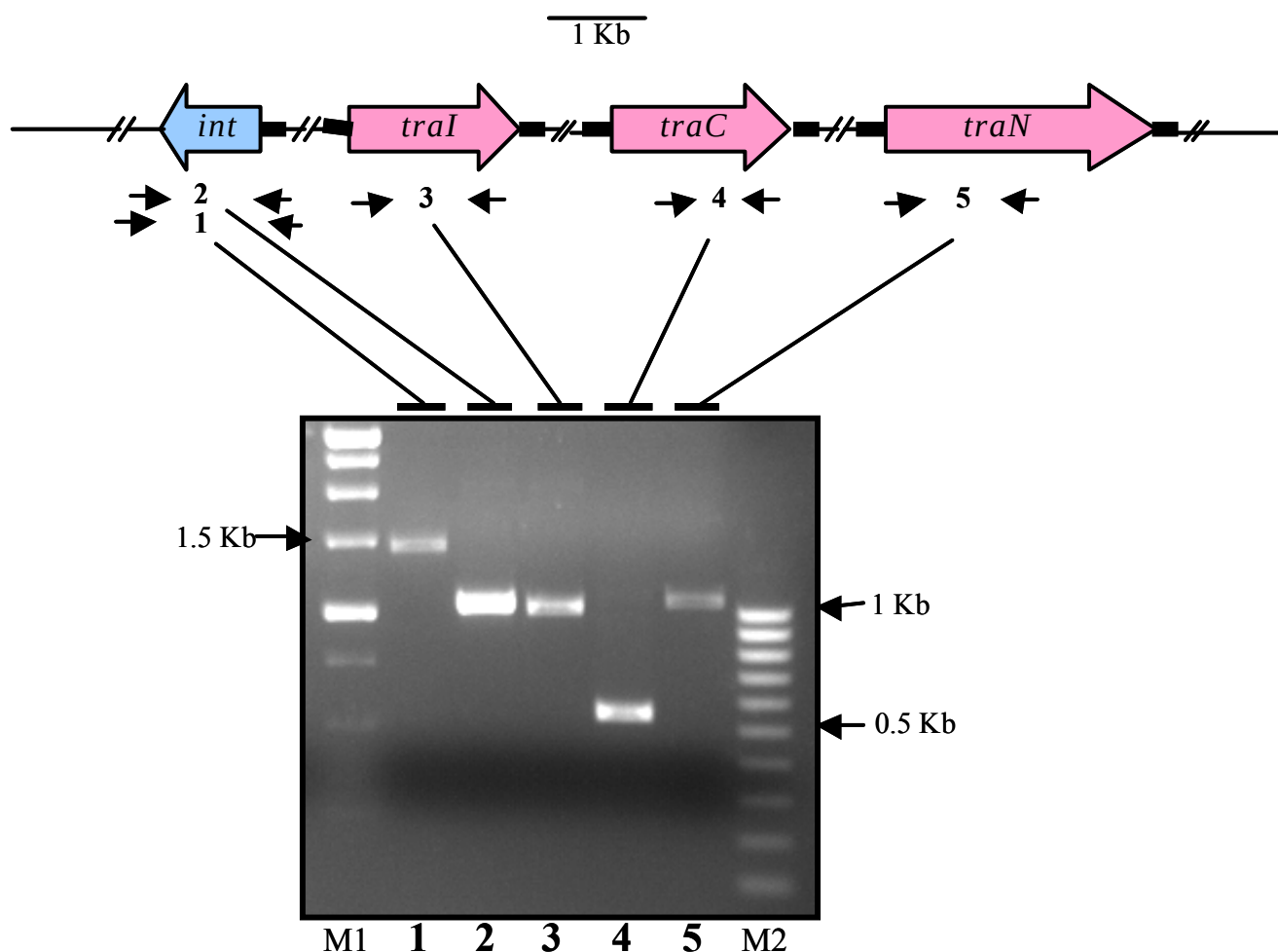


Figura V.24.-Amplificación de los genes del elemento SXT de la cepa *tester* PC554.2. Se muestra sobre el gel de agarosa un esquema de los genes amplificados tras la PCR realizada con los cebadores citados en las Tablas V.3. y V.6. Las flechas coloreadas denotan las ORFs del transposón conjugativo de *P. rettgeri* R391. Las flechas negras representan la posición relativa de los cebadores. Las líneas M1 y M2 indican los marcadores de masa molecular de 1 kb y 100 pb respectivamente. Los productos de amplificación previstos son: línea 1, gen *int* completo y bases circundantes (1.427 pb); línea 2, zona interna del gen *int* (1.034 pb); línea 3, zona interna del gen *traI* (1.008 pb); línea 4, zona interna del gen *traC* (553 pb); línea 5, zona interna del gen *traN* (1.044 pb).

Las secuencias nucleotídicas de los cinco amplicones obtenidos usando como molde el DNA de la cepa *tester* mostraron un elevado porcentaje de identidad (>92%) con sus homólogos descritas en elementos tipo SXT (Tabla V.3). Estos resultados sugieren la existencia en el genoma de la cepa PC554.2 de *P. damsela* subsp. *piscicida*, de un elemento tipo SXT.

Tabla V.3.-Amplificación por PCR de secuencias nucleotídicas del elemento SXT de la cepa *tester* PC554.2 de *P. damsela* subsp. *piscicida* y comparación de éstas con las de sus homólogos en elementos conjugativos similares descritos en otras γ -proteobacterias.

Combinación de cebadores _a	Producto de PCR _b				Función	% de similitud nucleotídica				Nº de Acceso EMBL
	Tamaño esperado (pb)	R391 posicion		SXT		R997	R391	pMERPH		
		inicio	parada							
284/285 286/287	1.427 1.034	2.701 2.884	4.128 3.918	Integrasa (<i>int</i>)	99,5	99,9	96,3	96,6	AJ870983	
243/244	1.008	32821	33.829		Hipotética relajasa (<i>traI</i>)	92,1	NA	93,5	NA	AJ870984
227/119	553	51.997	52.550	Hipotética proteína de ensamblaje del pilus (<i>traC</i>)	98,7	NA	97,8	NA	AJ870985	
121/223	1.044	56.531	57.575	Hipotética proteína de ensamblaje y síntesis del pilus (<i>traN</i>)	95,1	NA	96,2	NA	AJ870986	
P4 _c /M13fw	-	-	-	unión <i>attL</i>	99,6	98,4	95.0	98,4	AJ888462	
P5 _c /M13fw	-	-	-	unión <i>attR</i>	98,8	98,8	99.4	98,8	AJ888463	

ND, No disponible

a Descritos por Boltner y Osborn, (2004)

b El tamaño del producto de PCR y la posición de los cebadores se calculó sobre la base de la secuencia completa del elemento conjugativo R391 de *P. rettgeri* (N° de acceso EMBL AY090559).

c cebadores P4 y P5 descritos por Hochhut y Waldor, (1999).

Con el objetivo de comprobar si estas regiones del DNA de la cepa PC554.2 estaban presentes en otras cepas de *P. damsela*, se emplearon los mismos cebadores que se habían empleado en la cepa *tester*, con las cepas EPOY 8803-II, ATCC29690 y DI21, pero no se obtuvo ninguna amplificación. Este resultado concuerda con el obtenido por hibridación dot blot (Tabla V.2), usando el clon pRDA como sonda, y sugiere que el elemento SXT es exclusivo de la cepa PC554.2 de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

5.3.7.2. Localización del lugar de inserción del elemento SXT de *P. damsela* subsp. *piscicida* PC554.2

Todos los elementos tipo SXT descritos hasta la fecha se insertan en el cromosoma bacteriano en el locus *prfC*, un gen que codifica para un factor involucrado en la traducción. Con el fin de determinar si realmente el elemento tipo SXT de la cepa PC554.2 se hallaba integrado en el genoma en este locus, se diseñó una estrategia para tratar de identificar el sitio de integración. Para ello, se utilizaron cebadores diseñados en secuencias conservadas de los extremos izquierdo y derecho de elementos tipo SXT ya descritos, y que delimitan el sitio de unión de éste con el cromosoma bacteriano (Ahmed *et al.*, 2005).

Así, se postuló la hipótesis de que la recombinación entre la secuencia *attB* del cromosoma de la cepa PC554.2 y la zona *attP* del elemento tipo SXT podría generar las zonas de unión izquierda y derecha *attL* y *attR*, respectivamente. Para demostrarlo, se utilizaron los cebadores P4 y P5 combinados con los cebadores universales M13fw y M13rv, siguiendo la estrategia descrita en Materiales y Métodos.

Se obtuvieron sendos productos de amplificación con cada combinación de cebadores, y la secuenciación de éstos reveló una secuencia de nucleótidos altamente similar (cercana al 100% de identidad) a la descrita para las regiones *attL* y *attR* del elemento SXT de *V. cholerae* (Figura V.25) y de otros transposones conjugativos. Además, se obtuvo una porción del DNA cromosómico de la cepa PC554.2 adyacente a la zona de inserción.

Se demostró así, que el elemento SXT de *P. damsela* subsp. *piscicida* se encuentra insertado en el gen *prfC* (Figura V.26), que codifica para el factor 3 de liberación de la cadena peptídica durante la síntesis de proteínas (Hochhut y Waldor, 1999). La inserción del elemento SXT aporta un codón ATG alternativo en el extremo 5' del gen *prfC* que reemplaza el codón nativo del cromosoma y restituye un gen *prfC* funcional (Figuras V.25 y V.26).

<i>P. damsela</i>		ATCATCTCTCACCTGAT GCCGCCAGCCTTTCAACGCTTAAACACCTTTTATTGCACACCACAATCACATCTCTACGTACTGAATTT
<i>V. cholerae</i>	1	ATCATCTCTCACCTGAT GCCGCCAGCCTTTCAACGCTTAAACACCTTTTATTGCACACCACAATCACATCTCTACGTACTGAATTT
<i>P. damsela</i>		AAAGGCTTTTTGTCTTTTCTCGTTTCTTTGCTTTTCAATGATGTTCAAGCGTAACCTCGGAAAGTGTTACAACTTGAGTACAAATTC
<i>V. cholerae</i>		AAAGGCTTTTTGTCTTTTCTCGTTTCTTTGCTTTTCAATGATGTTCAAGCGTAACCTCGGAAAGTGTTACAACTTGAGTACAAATTC
<i>P. damsela</i>		CGTTTTAGAGGCCTTTGGTGAAATTCATGACACAAATCTGGCTGTAGGCCTTGTGTTTACTGGGTTTGATGAAGAAAGTACTTCCTGC
<i>V. cholerae</i>		CGTTTTAGAGGCCTTTGGTGAAATTCATGACACAAATCTGGCTGTAGGCCTTGTGTTTACTGGGTTTGATGAAGAAAGTACTTCCTGC
<i>P. damsela</i>		TTTTGGTACTTTGGTTTCGACATTACAAAGCGGAATAAATGCGATCATCTCTAGTTTTTTGTTTATAAGTTTATGAATTTAAAGGGTTTC
<i>V. cholerae</i>		TTTTGGTACTTTGGTTTCGACATTACAAAGCGGAATAAATGCGATCATCTCTAGTTTTTTGTTTATAAGTTTATGAATTTAAAGGGTTTC
<i>P. damsela</i>		GTCATTGTGGTTTTTGATGTGTCATTGTTGCGAGTGTACAAACAGTGTGTACAAATTTTTCTCGTTAGGCGTGTGATTGCTATTCTATGA
<i>V. cholerae</i>		GTCATTGTGGTTTTTGATGTGTCATTGTTGCGAGTGTACAAACAGTGTGTACAAATTTTTCTCGTTAGGCGTGTGATTGCTATTCTATGA
<i>P. damsela</i>		CACAAACCGCCTTTGAGCCCTTGTATTATCATAGGTTTGAGCTGAAAGTACCTAATAGCAACATTCTGTTTTGATGAAGGCTGATCTTCT
<i>V. cholerae</i>		CACAAACCGCCTTTGAGCCCTTGTATTATCATAGGTTTGAGCTGAAAGTACCTAATAGCAACATTCTGTTTTGATGAAGGCTGATCTTCT
<i>P. damsela</i>		GAACAAATCATGCATCTTTCTGACCATCAACAAGTGATGAATCAGGCGATGATAGCTTTA
<i>V. cholerae</i>		GAACAAATCATGCATCTTTCTGACCATCAACAAGTGATGAATCAGGCGATGATAGCTTTA
<i>P. damsela</i>		CATTGATTTTCAGGAGAAATGCAGATGACAGCA
<i>V. cholerae</i>		CATTGATTTTCAGGAGAAATGCAGATGACAGCA 632
<i>P. damsela</i>		CCAATTACGATTAACACGACGG ATTGACAAGCGAAGAAGTGAAGAGAGTACTTCCAAAAGTGTGTACAAATCCGTGTACAACTAAA
<i>V. cholerae</i>	99315	CCAATTACGATTAACACGACGG ATTGACAAGCGAAGAAGTGAAGAGAGTACTTCCAAAAGTGTGTACAAATCCGTGTACAACTAAA
<i>P. damsela</i>		AGAATTTATACATGGCAAACCAAGATTTTCTCAATGAAATCAATAAGCGAAGGACCTTTGCT ATCATCTCTCACCCGGA
<i>V. cholerae</i>		AGAATTTATACATGGCAAACCAAGATTTTCTCAATGAAATCAATAAGCGAAGGACCTTTGCT ATCATCTCTCACCCGGA 99483

Figura V. 25.-Alineación de la secuencia nucleotídica de la cepa PC554.2 de *P. damsela* subsp. *piscicida* y el cromosoma de *V. cholerae* 0139 a la izquierda (arriba) y derecha (abajo) de las uniones SXT-cromosoma. La duplicación de 17 pb resulta de la integración del elemento SXT y constituye el núcleo de los sitios *att* señalados en negrita y subrayados. Las secuencias de los cebadores utilizados P4 y P5 se muestran en letras itálicas y negrita. El codón de inicio ATG alternativo en el extremo 5' del gen *prfC* que reemplaza el codón de inicio 5' del cromosoma y restituye un gen *prfC* funcional se encierra en un cuadro. Los números indican las posiciones de la secuencia del SXT de *V. cholerae* (número de acceso AY055428).

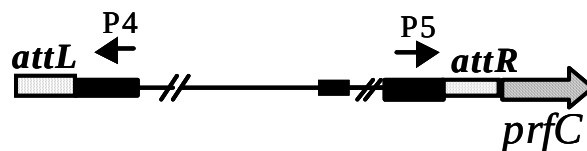


Figura V.26.-Determinación del lugar de inserción del elemento SXT de *P. damsela* subsp. *piscicida*. El gen *prfC* se representa a continuación del sitio *attR* como una flecha rayada. P4 y P5 son los cebadores utilizados en combinación con los M13 para amplificar el sitio de inserción del elemento tipo SXT de *P. damsela* subsp. *piscicida* PC554.2.

5.3.7.3 Patrón de resistencias y sensibilidades a antibióticos de la cepa PC554.2

El estudio del antibiograma de la cepa PC554.2 mostró que esta cepa es sensible a la mayoría de los antibióticos probados (Tabla V.4), incluyendo el Trimetoprim, Sulfametoxazol y Cloranfenicol. Precisamente, los elementos tipo SXT conocidos confieren resistencias a estos agentes antimicrobianos y, por tanto, la ausencia de resistencias a dichos antibióticos sugieren que la cepa PC554.2 posee una versión de elemento tipo SXT diferente a los descritos hasta la fecha.

Tabla V.4.-Resultados del antibiograma de la cepa de *P. damsela* subsp. *piscicida* PC554.2. Esta cepa mostró sensibilidad a los antibióticos a los que típicamente los elementos tipo SXT confieren resistencia.

Antibiótico	Sensibilidad (S) o Resistencia (R)
Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT25)	S
Kanamicina (K30)	S
Enrofloxacin (ENR5)	S
Oxytetraciclina (OT30)	S
Flumequina (UB30)	S
Florfenicol (FFC30)	S
Nitrofurantoína (F300)	R
O129 (129/150)	S
Acido oxolínico (OA2)	S
Linco-Espectin (MXS150)	S
Amoxicilina (AML25)	S
Amikacina (AK30)	R
Cloranfenicol (C30)	S
Neomicina (N30)	S
Ampicilina (AMP10)	S
Ciprofloxacina (CIP5)	S
Ceftiofur (EFT30)	S
Penicilina (P10)	S
Eritromicina (E5)	R
Ticarcilina (TIC75)	S
Gentamicina (CN10)	S
Norfloxacina (NOR10)	S
Espiramicina (SP100)	S
Estreptomicina (25)	S
Acido Nalidíxico (NA30)	S

5.4. Discusión

El bagaje genético puede variar considerablemente entre cepas de la misma especie, y dicha variación es particularmente frecuente en los genes que codifican factores de virulencia. La hibridación sustractiva y las técnicas que han ido surgiendo derivadas de ésta, se han utilizado para identificar diferencias genómicas entre cepas virulentas y no virulentas en una gran variedad de especies bacterianas (Mahairas *et al.*, 1996; Calia *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000). En los últimos años se han descrito diversas técnicas destinadas a identificar genes esenciales para que se produzca la infección bacteriana, como la “tecnología de expresión *in vivo*” (Mahan *et al.*, 1993), la mutagénesis por transposición (*signature-tagged transposon mutagenesis*) (Shea *et al.*, 1996), o los chips de DNA (*microarrays*) (de Saizieu *et al.*, 1998). En el presente estudio, se utilizó la técnica de hibridación sustractiva para identificar diferencias genéticas entre dos cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida*, que diferían en su origen de aislamiento, así como en su virulencia para peces. Esta técnica demostró ser de utilidad para aislar fragmentos de DNA de presencia diferencial entre genomas, y la especificidad en el experimento realizado en el presente estudio resultó ser de un 92%, y tan sólo 2 de 23 clones (8%) resultaron ser falsos positivos. Si se tiene en cuenta que el conocimiento previo de la secuencia del genoma de las dos cepas utilizadas en el ensayo era prácticamente inexistente, es evidente que esta técnica puede aportar datos muy interesantes acerca del contenido genético de las cepas. Ello estriba en el hecho de que los genes diferenciales entre aislados de la misma especie suelen corresponder no a genes del metabolismo básico de la célula (*housekeeping genes*), sino a genes que aportan características particulares, relacionadas con la virulencia, la capacidad de adaptación a ambientes, resistencias a compuestos químicos, nuevas capacidades biosintéticas o catabólicas, y también secuencias de DNA móvil (elementos de inserción, islas patogénicas, profagos, transposones etc).

Identificación de elementos de inserción

Una característica que permite caracterizar cepas estrechamente relacionadas, es la presencia en sus genomas de elementos móviles (Lawrence *et al.*, 1989). Se ha demostrado que la hibridación sustractiva es una técnica mediante la cual se obtienen

muchos resultados satisfactorios a la hora de buscar elementos insertados de modo diferencial entre genomas bacterianos (Brown *et al.*, 2000; DeShazer, 2004; Lai *et al.*, 2000; Sawada *et al.*, 1999). En este trabajo se localizaron diversos clones que contenían un primer tipo de transposasa (Transposasa A) y un único clon (pRDA16) que contenía un segundo tipo de transposasa (Transposasa B), y ambas mostraron una gran similitud con las transposasas A y B descritas en *V. vulnificus*. Además, el clon pRDA37 contenía una ORF con homología con una transposasa de *S. flexneri* incluida en el plásmido de virulencia pCP301 (Jin *et al.*, 2002). En todos estos casos, las transposasas se encontraron insertadas en el genoma de la cepa PC554.2 de modo que interrumpían la secuencia de DNA nativa. Esto implica que, en muchos casos, estas transposasas generan pseudogenes y, por tanto, es de esperar que contribuyan a la microevolución de la especie y a la ganancia de nuevas funciones génicas por presión selectiva tras la pérdida de la función original. Los dos genes correspondientes a las transposasas A y B se encuentran dispersos por el genoma de la bacteria, en un número de varias decenas, lo cual constituye una característica típica de los elementos de inserción que presentan un tamaño reducido (Winstanley, 2002). Es de destacar que las transposasas encontradas en el presente estudio representan los primeros genes de este grupo que se describen en la especie *P. damsela*.

Los experimentos de hibridación realizados sugieren que existen patrones de inserción diferencial de estas transposasas en las diferentes cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* analizadas. Ello sugiere el uso de este tipo de secuencias como marcadores epidemiológicos para la caracterización de líneas clonales de cepas de esta subespecie. Asimismo, es de esperar que la presencia en copia múltiple de estas transposasas facilite la recombinación intracromosómica en el genoma de *P. damsela* subsp. *piscicida* y, por tanto, contribuya a generar diversidad en la estructura del genoma entre aislados diferentes.

Es de señalar la ausencia de la transposasa B en las cepas de la subespecie *damsela*. Este hecho constituye una herramienta que se podría utilizar para distinguir aislados de *P. damsela* subsp. *piscicida* y *P. damsela* subsp. *damsela*. Además, probablemente *P. damsela* subsp. *piscicida* haya adquirido esta transposasa por transferencia horizontal, lo cual podría ser una señal indicativa de que ambas subespecies se encuentren en un proceso de cambio y diferenciación génica, que probablemente las esté llevando a divergir cada vez más.

Por otro lado, algunos autores señalan que el hecho de que exista un número elevado de elementos IS insertados en el genoma de una bacteria, puede indicar una adaptación reciente a un nuevo hospedador o una restricción de nicho (Moran y Plague, 2004). Este podría ser el caso del patógeno de animales *Burkholderia mallei*, donde por hibridación sustractiva se identificaron varios clones conteniendo secuencias de inserción (ISA, ISB e ISC) que resultaron estar insertadas en el genoma de la bacteria en multicopia (Brown *et al.*, 2000). En este sentido, se podría aventurar que la presencia de la transposasa B insertada en tan alto número de copias en el genoma de *P. damsela subsp. piscicida* constituye una de las huellas de su especialización como patógeno de peces, en contraste con el amplio número de organismos que puede infectar la subespecie *damsela*.

Identificación de un elemento tipo SXT

El clon pRDA5, resultó ser exclusivo de la cepa PC554.2 (*tester*) tras los experimentos que se llevaron a cabo tanto de PCR como de hibridación dot blot. En el fragmento de DNA contenido en este clon se identificó una ORF parcial que resultó tener prácticamente un 100% de identidad con una proteína incluida en el elemento SXT de *V. cholerae* (Beaber *et al.*, 2002b). Esta ORF presentó también homología con otra proteína perteneciente al elemento conjugativo R391 de *Providencia rettgeri* (Boltner *et al.*, 2002). Ambos elementos de gran tamaño (aproximadamente 100 kb), son representativos de una familia de elementos genéticos móviles (ICEs o elementos conjugativos e integrativos) que llevan genes de resistencia múltiple a antibacterianos, y muestran similitudes funcionales y estructurales con islas de patogenicidad, transposones conjugativos y bacteriófagos (Beaber *et al.*, 2002b; Burrus y Waldor, 2004). En un estudio reciente Boltner y Osborn (2004) describen cómo la utilización de algunas parejas de cebadores dirigidas a zonas específicas del DNA puede resultar útil para detectar secuencias correspondientes a elementos SXT en γ -proteobacterias. Se ha descrito que los elementos SXT comparten grandes esqueletos conservados, que incluyen genes que codifican funciones relacionadas con la escisión e integración, transferencia conjugativa y regulación (Beaber *et al.*, 2002a). Se seleccionaron cinco pares de cebadores dirigidos a amplificar secuencias nucleotídicas muy conservadas tanto en el elemento SXT de *V. cholerae* como en el R391 de *P. rettgeri*, el R997 de *P. mirabilis* y el pMERPH de *Shewanella putrefaciens* (Boltner y Osborn, 2004). La

secuenciación de los cinco fragmentos amplificados en la cepa *tester* PC554.2 reveló un altísimo grado de similitud con los elementos conjugativos descritos anteriormente, aportando una evidencia muy clara de la presencia de un elemento de este tipo en el genoma de esa cepa de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Hemos demostrado también que el gen *prfC* es el sitio de integración del elemento SXT descrito. La integración en el cromosoma debe suceder tras la recombinación específica de una secuencia de 17 pb localizada en el gen *prfC* del cromosoma bacteriano con una secuencia de 17 pb muy similar del elemento SXT como ya se ha descrito en otros microorganismos (Hochhut y Waldor, 1999; McGrath y Pembroke, 2004). En nuestros resultados se evidencia que secuencias prácticamente idénticas a los sitios *attL* y *attR* de la diana del lugar *attP* del elemento SXT de *V. cholerae* están presentes en el cromosoma de la cepa PC554.2 de *P. damsela* subsp. *piscicida* y que la unión *attR* reconstituye una copia completa del gen *prfC*, tal y como se ha descrito en elementos similares (Boltner y Osborn, 2004).

Cuando se llevaron a cabo los experimentos de hibridación y PCR con las 28 cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* utilizando el inserto del clon pRDA5 como sonda, se encontró que éste estaba presente únicamente en la cepa *tester* PC554.2. Este hecho parece indicar que su adquisición ha sido relativamente reciente y por transferencia horizontal. La transferencia de islas de patogenicidad o plásmidos de una especie a otra puede permitir a una bacteria no patógena sobrevivir en un hospedador y convertirse en patógena o a un patógeno adquirir nuevas capacidades o nuevos mecanismos de virulencia.

El hecho de que las resistencias a antibióticos de la cepa de *P. damsela* subsp. *piscicida* no se correspondan con las que codifican los típicos elementos SXT descritos hasta la fecha, sugiere que o bien éste está incompleto, o bien que los genes que codifican estas resistencias están inactivados. El elevado número de transposasas detectadas en el genoma de esta especie podría sugerir que algunos genes del elemento SXT hayan sido inactivados por la inserción de elementos móviles. El elevado grado de virulencia que presenta la cepa PC554.2 (aislada de un brote de pasteurelosis en lenguado) en la que se ha encontrado este elemento hace pensar que este elemento SXT tenga algo que ver con la virulencia, aunque se necesitan más datos para confirmar esta hipótesis.

Hasta la fecha se han descrito variantes del elemento SXT en tan sólo otras seis especies bacterianas: *V. fluvialis* (Ahmed *et al.*, 2005), *V. cholerae*, *Providencia* spp.

(R748, R749) *P. rettgeri* (R391, R392 y R397), *Shewanella putrefaciens* (pMERPH), *Proteus mirabilis* (R997) y *P. vulgaris* (R705 y R706) (McGrath y Pembroke, 2004), y nuestros resultados apuntan firmemente hacia la presencia de este elemento integrativo y conjugativo en el genoma de la cepa PC554.2 de *P. damsela subsp. piscicida*. La gran similitud que se encontró al analizar en este trabajo las secuencias de diversos elementos tipo SXT, junto con las ya investigadas previamente por otros autores, refuerzan la hipótesis de que este tipo de elementos deben compartir un origen común desde un elemento ancestral (Boltner y Osborn, 2004).

A la luz de todos estos datos, se puede aventurar que la presencia de elementos móviles en general, parece haber sido importante en la evolución de *P. damsela*, y que puede haber jugado un papel en la consolidación de las dos subespecies que se han determinado actualmente.

Genes relacionados con la captación de hierro

En varios de los clones descritos en este capítulo se identificaron ORFs que guardaban similitud con proteínas descritas en otras especies bacterianas implicadas en la biosíntesis de sideróforos (pRDA23, 31, 33 y 34). El aislamiento diferencial de genes relacionados con la síntesis de sideróforos es un hecho frecuente en experimentos de hibridación sustractiva, y ha sido descrito recientemente en cepas aviarias de *E. coli*, al comparar aislados patógenos y variantes no patógenas (Schouler *et al.* 2004).

Como ya se ha comentado en los dos capítulos anteriores, el hierro disponible en el medio resulta generalmente insuficiente para cubrir las necesidades nutricionales de la bacteria. Así, los microorganismos que cuenten con algún sistema específico mediante el cual se puedan surtir de un aporte extra de este elemento, poseen una ventaja a la hora de competir con otros que no lo posean.

En el clon pRDA23 se localizó una ORF que mostraba homología con el gen *vibD* necesario en los últimos pasos de la biosíntesis de vibriobactina en cepas patógenas de *V. cholerae* (Wyckoff *et al.*, 2001). Este gen, codifica en esta bacteria una fosfopanteteinil transferasa, un enzima implicado en la activación de uno de los dominios de las proteínas dedicadas a la síntesis de este sideróforo (péptido sintetadas no ribosómicas), mediante la transferencia de una molécula de ácido fosfopanteteínico a un resto de serina de este dominio. De modo similar, los clones pRDA33 y 34 portan ORFs con homología con dos corismato mutasas, enzimas que pueden estar

indirectamente implicados en la biosíntesis de sideróforos ya que catalizan la conversión del corismato en otros intermediarios necesarios para la síntesis de aminoácidos aromáticos, muchos de los cuales son precursores de los sideróforos. El clon pRDA23 codifica para dos ORFs, la primera de ellas con homología a una DAHP sintetasa incluida en el plásmido pJM1 de *V. anguillarum* relacionado con la virulencia de este patógeno de peces (Di Lorenzo *et al.*, 2003). Este enzima participa en la ruta de biosíntesis del ácido corísmico, una molécula que es el punto de partida para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. La segunda ORF es homóloga a un miembro de la familia AraC de activadores transcripcionales de la ruta de biosíntesis del sideróforo yersiniabactina de *Y. pestis* (Fetherston *et al.*, 1996), que ya había sido identificado en la cepa DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida* en un experimento encaminado a la búsqueda de genes regulados por hierro (Osorio *et al.*, 2004). Además, es interesante destacar que el homólogo de este activador AraC forma parte de una isla patogénica que incluye los genes de síntesis de yersiniabactina en especies patógenas de *Yersinia* (Carniel *et al.* 1996).

El análisis por hibridación dot blot y por PCR reveló una posible relación entre los genes que codifican elementos pertenecientes a los sistemas de captación de hierro de alta afinidad. De acuerdo con estos experimentos, aquéllos se encuentran ausentes en las dos cepas no virulentas ensayadas, aunque su presencia en el resto de cepas virulentas es variable y en principio no se encontró ningún patrón en su distribución. Se sabe que las cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* son capaces de producir sideróforos cuando la concentración de hierro del medio le resulta insuficiente (Magarinos *et al.*, 1994), aunque se desconocen las bases genéticas de la biosíntesis de estas moléculas quelantes de hierro. Los genes aislados en este estudio constituyen un primer eslabón en la búsqueda de estas bases, que nos permitirán avanzar en el estudio molecular de los sistemas de captación de hierro.

Otros genes de presencia diferencial

El clon pRDA25 incluye dos ORFs que codifican proteínas homólogas a SecD y SecF pertenecientes al locus Sec de *E. coli*, el cual agrupa nueve genes implicados en la translocación de proteínas a través de la membrana (Gardel *et al.* 1990; Manting y Driessen, 2000). Estas proteínas forman parte de lo que se conoce como vía general de secreción (GSP ó *general secretory pathway*) (Pugsley, 1993). Se ha sugerido que las

proteínas SecD y SecF formarían un complejo en la membrana interna que participaría en los últimos pasos de la exportación de proteínas (Economou *et al.*, 1995). La presencia de este sistema de transporte de proteínas podría estar relacionada con la virulencia de algunos aislados de *P. damsela subsp. piscicida*, dado que las proteínas extracelulares, algunas de las cuales pueden ser consideradas como potenciales factores de virulencia, necesitan un sistema de exportación de proteínas para ser translocadas a través de la envuelta bacteriana (DeShazer *et al.*, 2001). En este sentido, se ha descrito que las bacterias gram-negativas con potencial virulento utilizan la GSP para transportar al entorno extracelular factores de virulencia que son necesarios para la interacción con el hospedador. Dentro de los ejemplos bien estudiados de determinantes de virulencia que utilizan la GSP para su secreción, se incluyen las toxinas extracelulares, pili, autotransportadores y las capas-S cristalinas (Stathopoulos *et al.*, 2000).

Se aisló también una ORF con homología con una SrmB helicasa de *P. profundum* en el clon pRDA4. No está claro con los resultados disponibles si la presencia diferencial de los genes de la helicasa tiene alguna relación con la virulencia de la bacteria o no. De todos modos, es interesante destacar que, utilizando la técnica de hibridación sustractiva, otros autores también detectaron dos genes diferentes que codificaban helicasas en un aislado patógeno de *Pseudomonas aeruginosa* y que estaban ausentes en la cepa *driver* avirulenta (Choi *et al.*, 2002). Nuestros resultados suponen pues una evidencia adicional de que este tipo de proteínas pueden tener una presencia diferencial entre los genomas de cepas muy próximas.

El clon pRDA19, contiene dos ORFs parciales con homología con dos citocromo C oxidasas. Estas ORFs, mostraron también una distribución diferencial en los diferentes aislados probados de *P. damsela subsp. piscicida*. Resultaron estar ausentes en las dos cepas avirulentas, aunque este resultado no es en principio indicativo de una correlación con la virulencia, ya que no están presentes en todas las cepas virulentas.

La distribución de los genes en una población bacteriana, puede proporcionar información de su implicación en la virulencia. Se investigó la distribución de algunos genes aislados en el presente estudio en 28 cepas virulentas y avirulentas de *P. damsela subsp. piscicida*. Los resultados obtenidos, muestran claramente que la población de esta bacteria es altamente heterogénea a nivel genético. Ninguna de las cepas estudiadas mostró contener el total de las secuencias génicas descritas aquí (excepto la PC554.2), y ninguna de las secuencias mostraron estar presentes en todos

los aislados virulentos ensayados. Esta diferencia es también muy evidente entre cepas aisladas del mismo hospedador y del mismo origen geográfico. Por ejemplo, cada una de las siete cepas aisladas de lenguado en España, rindieron un perfil completamente distinto en los análisis por Southern blot y por PCR. Este dato indica claramente la alta heterogeneidad genética existente en las poblaciones de este patógeno.

Los resultados demuestran que la HS es una técnica adecuada para identificar diferencias genéticas entre cepas virulentas y avirulentas de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Es de esperar que todos estos datos serán de gran utilidad para profundizar en el conocimiento de la base genética de los mecanismos de virulencia de este patógeno. El aislamiento de genes implicados en sistemas de captación de hierro sugiere un importante papel de estos sistemas en la virulencia. Además, la presencia de varios genes relacionados con elementos móviles puede indicar la existencia de islas patogénicas en *P. damsela* subsp. *piscicida*.

5.5. Anexos

Tabla V.5.-Cebadores utilizados en el apartado 5 del presente capítulo.

Pareja	Oligonucleótido	Secuencia
1	TRANSPA-3'1	ACCCGTCTCTCTTACTCCTGA
	TRANSPA-5'1	ATGGCTACTATTGATGTGAAATGTC
2	proteasa-5'1	GAGTATTAGCATCATATCCAGTGCT
	proteasa-3'1	GATGTTGCTATTACTGGCTCTATGA
3	transpB-5'1	GAATCAGCGCTGGTTATGGTATGCG
	transpB-3'1	CGTTCCAATAACCTTATCGTGCATC
4	secD-5'1	GGTCTGATCGCTAACCTTGCAATTGG
	secD-3'1	TTAAGATACCGATAGATAGTGTTAC
5	sxt-5'1	ACTGTGCGTATAAGAGCCAATACTTC
	sxt-3'1	CGCACTGAAACCATCAGAAGTGGA

Tabla V.6.-Cebadores utilizados en el apartado 7 del presente capítulo.

Oligonucleótido	Secuencia
sxt-284	GGAGGAGTATGAGAAGAAAG
sxt-285	CAACCCAATATATCAACGACAT
sxt-284'	TCGAGACTGGATAGACTCTGC
sxt-286	CTGTGGCCAATCATCAACTC
sxt-287	CGACCGAGATGGGCTAAGTG
sxt-243	CCAAAGATTGAGGAGATTCA
sxt-244	CAGTGGAACCCTTTTTTAGA'
sxt-119	GACGATGAGGCGGCCAATC
sxt-227	GTGAGCAGCTCTATCCGTTTA
sxt-223	TTTGTTCCAGCCGGACTCAC
sxt-121	GCGCAATCCAAATACCGATCT
attp-F	TGCTGTCATCTGCATTCTCCTG
attp-B	GCCAATTACGATTAACACGACGG
Tra-3'	ACCCGTCTCTCTTACTCCTGA
Tra-5'	ATGGCTACTATTGATGTGAAATGTC
TrB-5'	GAATCAGCGCTGGTTATGGTATGCG
TrB-3'	CGTTCCAATAACCTTATCGTGCATC
secD-5'1	GGTCTGATCGCTAACCTTGCAATTGG
secD-3'1	TTAAGATACCGATAGATAGTGTTAC
sxt-5'1	ACTGTGCGTATAAGAGCCAATACTTC
sxt-3'1	CGCACTGAAACCATCAGAAGTGGA

Capítulo VI

Identificación de un sistema genético de
síntesis de sideróforos en *P. damsela* subsp.
piscicida

6.1. Introducción

6.1.1. Los Sideróforos

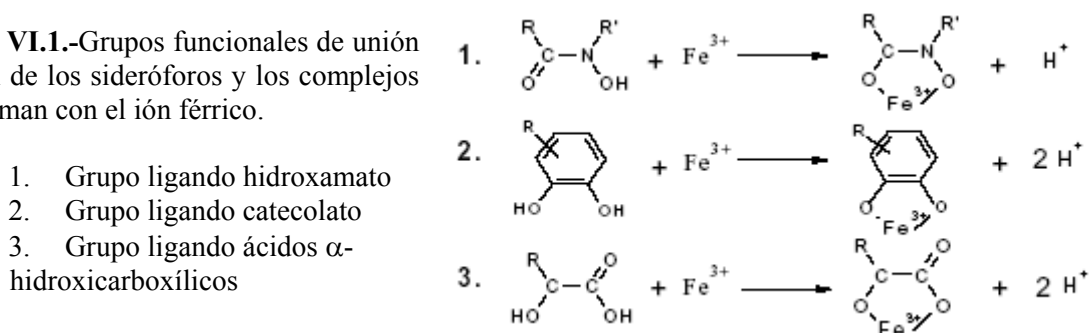
Los sideróforos pueden definirse como compuestos microbianos de bajo peso molecular con una elevada afinidad por el hierro. Estos quelantes de hierro son producidos por bacterias y por hongos en respuesta a la baja disponibilidad de hierro en el medio ambiente en el que crece el microorganismo. Su función es permitir la asimilación de este nutriente esencial por parte de las células (Winkelmann, 2002).

La mayoría de los sideróforos son solubles en agua y son secretados al ambiente, pero otros sideróforos no se excretan, como es el caso de las micobactinas producidas por micobacterias y que están localizadas en la membrana celular (Ratledge y Dover, 2000).

La característica principal de este tipo de moléculas, es que presentan una elevada constante de disociación del hierro, oscilando entre 10^{22} y 10^{55} . Esta afinidad tan elevada además de facilitarles la captación de este metal, les permite también arrancar los átomos de éste unidos a proteínas del huésped como la transferrina (con constante de disociación 10^{23}), o la ferritina (Neilands, 1995). La unión al hierro es extremadamente específica y les permite discriminar el hierro del aluminio, calcio, cobre o zinc, más abundantes en la naturaleza (Tilbrook y Hider, 1998).

Se han descrito más de 500 tipos de sideróforos sintetizados fundamentalmente por bacterias gram negativas y gram positivas. A pesar de que tienen estructuras químicas muy diversas, podemos agrupar en principio a todos ellos, dentro de uno de los siguientes grupos (Figura VI.1) (Crosa y Walsh, 2002):

Figura VI.1.-Grupos funcionales de unión a metal de los sideróforos y los complejos que forman con el ión férrico.



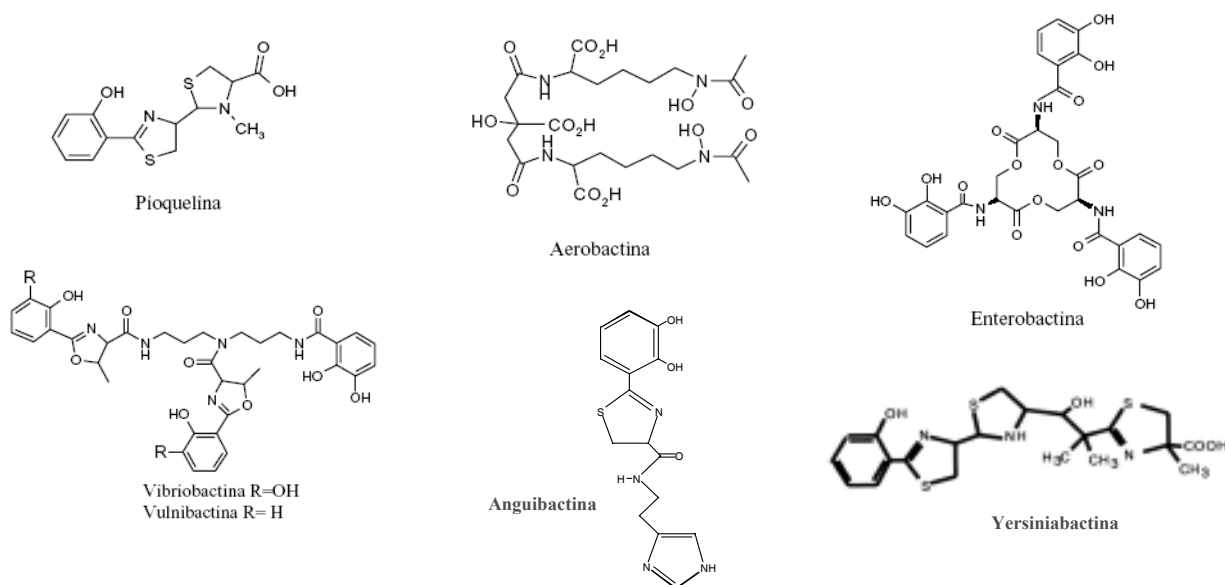
1) catecolatos, del tipo de la enterobactina de *E. coli* y otras enterobacterias (Kingsley *et al.*, 1995); este sideróforo presenta una de las constantes de disociación del hierro más elevadas (10^{52}), pudiendo arrancarlo fácilmente de las transferrinas. Para detectar la presencia de estructuras de este tipo en el medio de cultivo, se puede realizar una determinación mediante el reactivo de Arnow (Rioux *et al.*, 1983), aprovechando las características estructurales de este tipo de sideróforos, ya que este reactivo reacciona con los grupos catecolato presentes en aquéllos.

2) hidroxamatos, del tipo de la aerobactina de *Salmonella sp.*, *Shigella flexneri*, algunas cepas de *E. coli* o del tipo de *P. damsela* subsp. *damsela* (Fouz *et al.*, 1997); la aerobactina por ejemplo, presenta una constante de disociación (del orden de 10^{25}) muy parecida a la de las transferrinas y parece usarse preferencialmente para extraer el hierro de otras fuentes del huésped, como la ferritina, presente en el interior de las células de éste (Ratledge y Dover, 2000).

3) ácidos α -hidroxicarboxílicos, del tipo de la pioquelina de *Pseudomonas aeruginosa*.

Estas unidades funcionales se distribuyen para formar arquitecturas moleculares lineales, endocíclicas o exocíclicas, que facilitarán en mayor o menor grado y del modo más eficiente posible la organización de una cavidad de quelación, la flexibilidad del ligando y la facilidad relativa de asumir una geometría de coordinación pseudo-octaédrica afectando en última instancia a la estabilidad termodinámica del complejo ferri-sideróforo (Albrecht-Gary y Crumbliss, 1998). Los centros de unión de la mayoría de los sideróforos son hexadentados, están compuestos por tres grupos ligando bidentados dispuestos alrededor del ion férrico central, permitiendo un sistema hexacoordinado con geometría octaédrica de elevada estabilidad. Los sideróforos hexadentados forman complejos 1:1 con el ion férrico, de modo que la redistribución del hierro es poco probable, disminuyendo así la toxicidad potencial del complejo ferri-sideróforo (Tilbrook y Hider, 1998).

A pesar de la variedad de sideróforos que se han descrito, la diversidad de los grupos funcionales que coordinan el ión férrico es escasa, debido a la necesidad de grupos donadores adecuados como por ejemplo los oxianiones, para coordinar la forma más oxidada del hierro. En la Figura siguiente se muestran ejemplos de alguna de las organizaciones moleculares que adoptaron estos compuestos en *Pseudomonas spp.* (Pioquelina), *Aeromonas spp.*, Enterobacterias (Enterobactina y Aerobactina) y *Vibrio spp.* (Vibriobactina, Anguibactina y Vulnibactina):



Existen bacterias capaces de usar no sólo los sideróforos que ellas producen, sino también los producidos por otras especies bacterianas e incluso hongos (Neilands, 1995). Así *Salmonella* es el microorganismo más conocido que utiliza xenosideróforos (Kingsley *et al.*, 1995), pero por ejemplo *E. coli* puede incorporar el hierro quelado por ferricromos, coprógenos, y/o por el ácido rodotorúlico, y seguramente la ferroxiamina B (Ratledge y Dover, 2000), todos ellos sintetizados por hongos.

6.1.2. Biosíntesis de sideróforos: mecanismos básicos

La pared de las bacterias gram negativas, por su estructura, es impermeable al intercambio de algunos nutrientes y otros compuestos con el exterior. La presencia de porinas en la membrana externa facilita este intercambio, pero el tamaño de poro es demasiado pequeño para importar moléculas como los sideróforos (Moeck y Coulton, 1998). Por ello, el proceso de adaptación a ambientes pobres en hierro, no sólo implica la síntesis de sideróforos, sino la de todo un sistema de proteínas de membrana que actuarán como receptores del complejo sideróforo- Fe^{+3} (Griffiths, 1983).

Muchos sideróforos son polipéptidos sintetizados en el citoplasma bacteriano por un complejo multienzimático de péptido-sintetasas no ribosómicas (NRPS, de *non ribosomal peptide synthetases*) similar al descrito para la síntesis de algunos antibióticos (Wandersman y Delepelaire, 2004). Hay sin embargo otros sideróforos que no son polipéptidos y que se han formado a partir de la adición de bloques alternos de ácidos

dicarboxílicos y diaminas o aminoalcoholes unidos por enlaces tipo amida o éster (aerobactina, rizobactina, vibrioferrina etc.). Todas estas reacciones estarían catalizadas por unas enzimas conocidas como sideróforo-sintetasas (Challis, 2005).

Los sideróforos de tipo catecolato utilizan ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA) y los de tipo fenolato utilizan ácido 2-hidroxibenzoico (ácido salicílico). Estos precursores se sintetizan a partir del ácido corísmico, un intermediario de la ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (Ratledge y Dover, 2000). En *E. coli* esta vía metabólica se produce gracias a la acción secuencial de los enzimas EntC, EntB y EntA, codificados en el operón *entCEBA* de la agrupación génica de biosíntesis y transporte de enterobactina (Figura VI.2). Se cree que las bacterias que produzcan sideróforos con DHBA conjugado con aminoácidos, tendrán versiones del operón *entCEBA*. Este es el caso de *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Paracoccus denitrificans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Aeromonas* spp., *Agrobacterium tumefaciens* y *Azotobacter vinelandii*, entre otros (Byers y Arceneaux, 1994). Los sideróforos que contienen conjugados de ácido salicílico con aminoácidos, sintetizan dicho fenolato mediante vías alternativas. *Yersinia pestis* sintetiza el ácido salicílico de la yersiniabactina directamente a partir del ácido corísmico, en cambio *P. aeruginosa* deshidrata el 2,3-DHBA para obtener el precursor fenolato de la pioquelina (Ratledge y Dover, 2000).

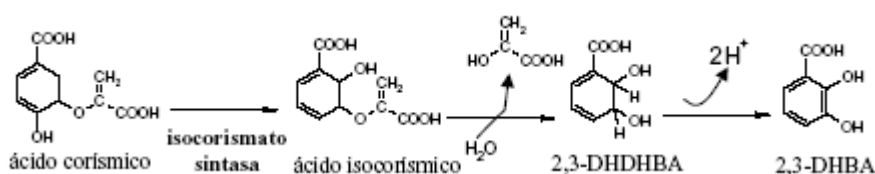


Figura VI.2.-Formación del ácido 2,3-DHBA (Dihidroxibenzoico) en *E. coli*

Una vez formado el precursor aril (2,3-DHBA) se llevan a cabo varios procesos de ensamblaje, modificación, maduración y terminación antes de que los sideróforos estén preparados para llevar a cabo su función. La descripción de los mecanismos de síntesis de sideróforos mediada por NRPS se detallará en puntos posteriores de este capítulo, al exponer los Resultados, y en la Discusión.

6.1.3. Transporte de sideróforos

En la Figura VI.3 se representa un modelo general de la captación de hierro mediada por sideróforos en bacterias gram-negativas. Los sideróforos son excretados al exterior a través de una proteína de membrana (Furrer *et al.*, 2002) y allí capturan el Fe^{+3} , y son internalizados a través de un receptor específico (Webster y Litwin, 2000; Butters *et al.*, 1992). El transporte de sideróforos al interior celular, requiere además de la participación de un sistema de proteínas localizadas en el periplasma y la membrana interna, denominadas transportadores ABC, que terminan de internalizar el complejo. Los sistemas transportadores de ferri-sideróforos, hemo y vitamina B12 pertenecen a la misma familia (Andrews *et al.*, 2003; Clarke *et al.*, 2001).

Una vez en el citoplasma, el último paso consiste en la liberación del Fe^{+3} del sideróforo, proceso en el cual podría también estar implicada otra proteína. Generalmente, el proceso de liberación del hierro de los complejos Fe(III)-sideróforos es efectuado por ferri-reductasas citoplasmáticas, que median la formación del complejo Fe(II)-sideróforo para facilitar su subsiguiente disociación, puesto que la afinidad de los sideróforos por la forma reducida del hierro es relativamente baja. Las ferri-reductasas citoplasmáticas bacterianas tienen un amplio rango de especificidad de sustrato y hasta la fecha no se ha caracterizado ninguna ferri-reductasa cuya expresión esté inducida por las condiciones restrictivas de hierro (Schroder *et al.*, 2003).

El hierro liberado es incorporado a proteínas o almacenado intracelularmente en forma de ferritinas, bacterioferritinas y proteínas Dps (Proteínas desintoxicadoras de hierro). Algunos sideróforos se reciclan, como por ejemplo la aerobactina. En cambio, el desferri-ferricromo se inactiva mediante la acetilación de los grupos hidroxamato (Braun y Braun, 2002).

6.1.4. Sideróforos en la familia *Vibrionaceae*

Dentro del grupo de bacterias pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*, encontramos que existe una gran variedad en cuanto a la producción de sideróforos, desde el punto de vista de su estructura química (Drechsel y Winkelmann, 1997). Así, por ejemplo, *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus* y *V. fluvialis* producen sideróforos de tipo catecol. Otras especies, como *V. salmonicida* producen un sideróforo de tipo

hidroxamato, la bisucaberina (Winkelmann *et al.*, 2002). En cambio, *V. anguillarum* produce un sideróforo, la anguibactina, que es del tipo mixto catecolato-thiazolin-hidroxamato, y otras especies de *Vibrio* producen aerobactina, de tipo hidroxamato. Esta diversidad en el tipo de sideróforos producidos dentro de esta familia, refleja sin duda la existencia de una amplia diversidad de genes biosintéticos, que lógicamente deben diferir entre especies, y también indica que la heterogeneidad genética entre géneros y especies de esta familia puede ser mayor de lo esperado. En todos los ejemplos citados, los sideróforos se sintetizan por NRPSs. En cambio, el sideróforo vibrioferrina producido por *V. parahaemolyticus* se sintetiza por un mecanismo que no incluye NRPSs (Tanabe *et al.*, 2003).

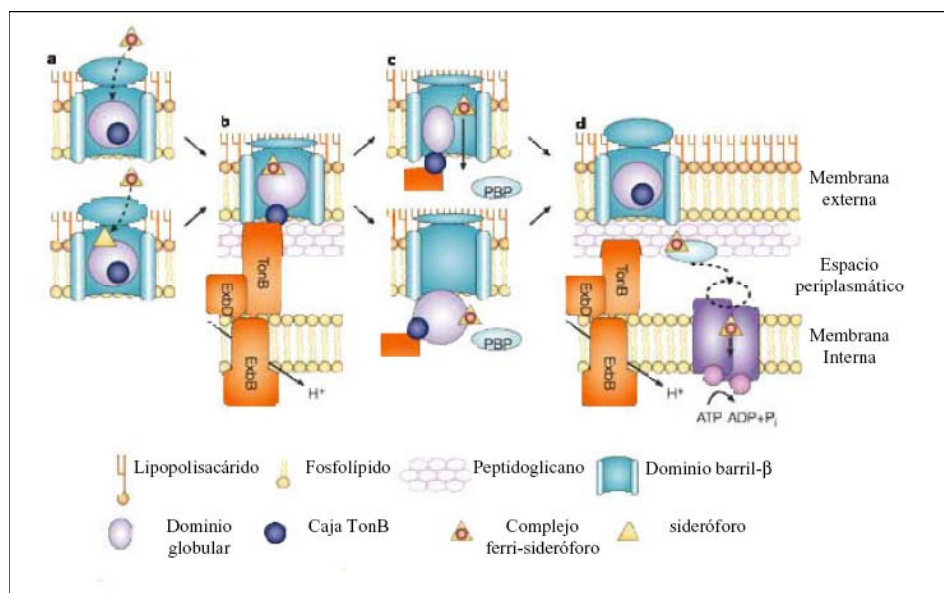


Figura VI.3.-Mecanismo propuesto para la captación de sideróforos en una bacteria Gram negativa. a/ Se produce la unión del receptor de membrana externa y el complejo ferri-sideróforo (se han descrito receptores con el apo-sideróforo previamente unido). b/ Transducción de la señal. La unión de ligando provoca cambios conformacionales que tienen como resultado un cierre al ambiente extracelular y una mayor exposición del dominio aminoterminal al espacio periplasmático, aumentando la probabilidad de interacción con el complejo TonB. c/ La interacción con el complejo TonB induce cambios estructurales en el receptor, que resultan en la translocación del ferri-sideróforo al espacio periplasmático. Se desconoce si la interacción induce simplemente la apertura de un canal de difusión o si causa la salida de todo el dominio globular hacia el espacio periplasmático. d/ Las proteínas de unión periplasmática dirigen el complejo ferri-sideróforo a transportadores ATP-dependientes de membrana interna. Modificado de Faraldo-Gomez y Sansom, (2003).

6.1.5. Estado actual del tema en *P. damsela*

Se conoce por experimentos previos, que *P. damsela* subsp. *piscicida* produce sideróforos en condiciones de baja disponibilidad de hierro en el medio. Asimismo, se ha descrito que en cepas de esta subespecie se induce la síntesis de determinadas proteínas cuando las células se cultivan en presencia de un quelante de hierro. La molécula que actúa como sideróforo en *P. damsela* subsp. *piscicida* no ha sido todavía purificada ni caracterizada, sin embargo sí se han realizado experimentos que nos dan alguna pista acerca de su naturaleza y en principio no se trataría de sideróforos tipo hidroxamato ni catecol (Magariños *et al.*, 1994c).

En cambio, en *P. damsela* subsp. *damsela* sí se conoce que el sideróforo producido por cepas de dicha subespecie es de tipo hidroxamato (Fouz *et al.*, 1997). Por tanto, es de esperar que los genes que intervienen en la síntesis y la utilización de sideróforos sean diferentes entre cepas de ambas subespecies. En este capítulo se tratará de dar respuesta a estos interrogantes.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Análisis de las proteínas de membrana inducidas en condiciones de limitación de hierro

El patrón de proteínas de membrana totales cuya síntesis se ve inducida en condiciones de limitación de hierro en el medio, se analizó en *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 y en *P. damsela* subsp. *damsela* RM71.

Protocolo de purificación de proteínas

Se cultivaron las cepas a estudiar, en medio de cultivo CM9 a partir de un inóculo 1/100 de 2 mL de TSC-1. Como se pretendía realizar una extracción de proteínas inducidas en limitación de hierro, se prepararon dos tipos de cultivo para cada cepa, uno con 100 mL de medio añadiendo FeCl_3 10 μM , y el otro con 200 mL de cultivo añadiendo 60 μM de 2,2'-dipyridyl. Se incubó durante 24 h a 25 °C en agitación. Las células se recogieron por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C, y se

resuspendieron en 3 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 + 0,3% de NaCl. A continuación, se sonicaron con un sonicador (Bandelin electronic) en cuatro pulsos de 30 s cada uno en hielo picado. La solución resultante se transfirió a dos tubos de microcentrífuga y se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm y a 4 °C. El sobrenadante se centrifugó durante 1 h a 17.000 rpm a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 20 µL de agua desionizada estéril.

La concentración de proteínas se midió siguiendo el método descrito por Bradford (1976). El colorante del reactivo de Bradford forma un complejo estable en presencia de las proteínas en medio ácido que absorbe a 595 nm. Del extracto crudo obtenido de cada cepa, se tomaron 3 µL y se adicionó 1 mL de reactivo de Bradford previamente diluido 1:5. La reacción se incubó durante 5 min a temperatura ambiente en agitación, y se midió en un espectrofotómetro a 595 nm. Los resultados se trasladaron a una recta patrón de albúmina y se extrapolaron los µg de proteína obtenidos.

Una vez conocida la concentración de proteína de las muestras, se tomaron del orden de 40 µg de cada una, se llevaron a un volumen final de 40 µL con tampón 2X FSB (*final sample buffer*) (Tris-ClH 65 mM, SDS 2%, Glicerol 10%, azul de Bromofenol 0,001% y 2-Mercaptoetanol 5%) y se hirvieron durante 5 min. Transcurrido este tiempo se cargaron y migraron en un gel de poliacrilamida Tris-HCl al 12% (Bio-Rad), con tampón de electroforesis (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1%) durante 4 h a 30 mA (100V). El gel se tiñó entonces con la disolución de tinción de proteínas (Coomasie Blue 0,05%, isopropanol 25% y ácido acético 10%) con agitación durante 2 h, y a continuación se destiñó con una disolución de ácido acético al 10% y metanol al 40% hasta decoloración, conservándose a 4 °C en ácido acético al 5%.

6.2.2. Hibridación Sustractiva

La técnica de hibridación sustractiva se llevó a cabo entre las cepas DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida* y RM71 de *P. damsela* subsp. *damsela* siguiendo el procedimiento ya descrito en el capítulo V, con el fin de localizar los genes responsables de la presencia diferencial de proteínas reguladas por hierro entre *P. damsela* subsp. *piscicida* y *P. damsela* subsp. *damsela*.

Con este procedimiento se aisló un clon específico de la cepa DI21, que se denominó pSSH1. Utilizando la técnica de PCR Inversa se avanzó en la clonación y secuenciación de las regiones vecinas a este fragmento.

6.2.3. Análisis informático de las secuencias de proteínas

El análisis predictivo de los dominios de las proteínas estudiadas en este capítulo se llevó a cabo utilizando el programa PFAM (*Protein Families Database*) que compara las secuencias problema, con una amplia recopilación de familias de proteínas así como de sus dominios. Esto permite la estimación de los dominios funcionales partiendo de la estructura primaria de una proteína dada, mediante el análisis comparativo con las proteínas homólogas existentes en dicha base de datos.

6.2.4. Construcción de un mutante del gen *irp1*

Una vez obtenida la secuencia parcial de un operón presuntamente involucrado en la síntesis y transporte de sideróforos en *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21, se diseñó una estrategia para obtener un mutante por inactivación de dicho operón, y así poder demostrar su papel en la síntesis de sideróforos.

Para ello el plásmido pCAR186 (conteniendo un fragmento de PCR Inversa que engloba el extremo 3' del gen *irp2* y el 5' del gen *irp1*), se cortó con *EcoRI* y *XbaI* y el fragmento resultante se clonó en pWKS30 generando pCAR219. El inserto en esta construcción se liberó con *NotI* y *Sall* y se clonó en el vector suicida pNidKan, generando así el plásmido pSJR52. Este último plásmido se transfirió por conjugación a *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21-Rif, mediante el protocolo ya descrito en el capítulo IV. Con esta estrategia se genera una inserción con efectos polares en el gen *irp1* que forma parte del operón estudiado.

6.2.5. Análisis del mutante *irp1*⁻

Para lograr crecer el mutante *irp1*⁻ y así poder llevar a cabo la extracción de sus proteínas se utilizó una concentración de 30 μ M de 2,2'-dipyridyl ya que aquél no era capaz de crecer lo suficiente a concentraciones superiores de este quelante. La extracción de las proteínas se llevó a cabo del modo descrito anteriormente.

Para evaluar la producción de sideróforos por parte del mutante *irp1*⁻ se llevó a cabo el test de CAS. Desarrollado por Schwyn y Neilands (1987), este test utiliza un complejo ferricromogénico que cambia de color como consecuencia de la pérdida de hierro. Los sideróforos, que tienen más afinidad por el hierro que el cromógeno, pueden capturar el hierro del complejo ferri-cromógeno, resultando en un cambio del color del colorante de azul a amarillo-anaranjado. Este método, basado en las propiedades funcionales de los sideróforos, es el más universal elaborado hasta la fecha para la detección de sideróforos, porque únicamente depende de la habilidad de un compuesto para unir el hierro con una afinidad relativamente elevada. El complejo ferri-cromógeno utilizado para la detección de sideróforos se puede incorporar al medio sólido o puede utilizarse en un test líquido (ver anexo de medios de cultivo).

Tras determinar la CMI, se llevó a cabo una curva de crecimiento del mutante *irp1*⁻ del mismo modo al descrito anteriormente utilizando una concentración de 60 μ M de 2,2'-dipyridyl.

6.2.6. Análisis transcripcional del sistema

Con el objetivo de conocer la organización transcripcional de los genes del sistema se llevó a cabo un análisis por RT-PCR. Para ello se extrajo en primer lugar el RNA de la cepa DI21 de *P. damselae* subsp. *piscicida* como se describió anteriormente. A continuación se llevaron a cabo dos RT-PCRs distintas. En la primera (RT-1) se utilizó el cebador AngR-like 3'7 y en la segunda (RT-2) el cebador F15-in-3'4.

A continuación, usando como molde el cDNA de las dos RT-PCRs se llevaron a cabo las siguientes reacciones de PCR:

cDNA molde	Cebadores
RT-1	F15-in-5'2
	F-44-in-3'4
	AngR-like-5'3
	AngR-like-3'8
RT-2	F15-in-5'2
	F-44-in-3'4

6.2.7. Análisis de la presencia de los genes del operón de síntesis de sideróforos en cepas de las dos subespecies de *P. damsela*

La presencia de los genes del operón de síntesis de sideróforos se analizó por hibridación de DNA-DNA (Southern blot). La síntesis de las sondas internas a los genes *irp1* e *irp2* se llevó a cabo de la siguiente forma: un fragmento del gen *irp1* de 520 pb se amplificó por PCR con los cebadores angRlike 5'6 y angRlike 3'6. Asimismo, un fragmento del gen *irp2* de 500 pb se amplificó con los cebadores angRlike 5'-3 y angRlike 3'8. Los procedimientos de marcaje de las sondas, hibridación y revelado se realizaron tal y como se describió en el capítulo III.

6.2.8. Determinación de la virulencia para peces del mutante *irp1*-

La importancia del sistema de captación de hierro mediante sideróforos en la virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* para peces, se determinó realizando experimentos con el rodaballo como modelo animal. Para ello, se prepararon suspensiones en solución salina (NaCl al 0,85 %) de las cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21-Rif (cepa parental) y CS31 (mutante *irp1*-). Se seleccionaron cuatro grupos de 9 alevines de rodaballos (cada uno con un peso promedio de 15 g) a los que se les inocularon intraperitonealmente, dosis de 10^6 y 10^5 células bacterianas en un volumen de 100 μ L, tanto de la cepa salvaje como de la mutante. Los peces se mantuvieron a una temperatura de 20 °C y las mortalidades se fueron registrando diariamente. Los peces muertos se diseccionaron para tomar muestras del bazo y el riñón para análisis bacteriológico, y los cultivos obtenidos se identificaron por pruebas bioquímicas y serológicas para determinar la recuperación de las cepas inoculadas. El

cálculo de la dosis letal 50 (LD₅₀) se realizó siguiendo el método descrito previamente (Magariños *et al.*, 1992).

6.3. Resultados

6.3.1. Análisis de las proteínas inducidas en condiciones de limitación de hierro

Tal y como se ha comentado anteriormente, en trabajos previos se describió la producción y utilización de sideróforos por *P. damsela* subsp. *piscicida* (Magariños *et al.*, 1994c). Sin embargo, no han sido caracterizados hasta el momento los genes cuyos productos intervienen en los procesos de transporte, síntesis y secreción de los mismos, ni se conoce la naturaleza de la molécula que actúa como sideróforo, si bien se sabe que no posee grupos catecol ni hidroxamato. Asimismo, se conoce que cepas de la subespecie *damsela* producen un sideróforo de tipo hidroxamato.

Con el objetivo de avanzar en el conocimiento del mecanismo de captación de hierro mediado por sideróforos en *P. damsela*, se procedió a realizar un análisis del perfil proteico de las cepas DI21 y RM71 pertenecientes a las subespecies *piscicida* y *damsela* respectivamente. El análisis electroforético de las preparaciones de proteínas totales de membrana de ambas cepas crecidas bajo condiciones de exceso y déficit de hierro se muestra en la Figura VI.4.

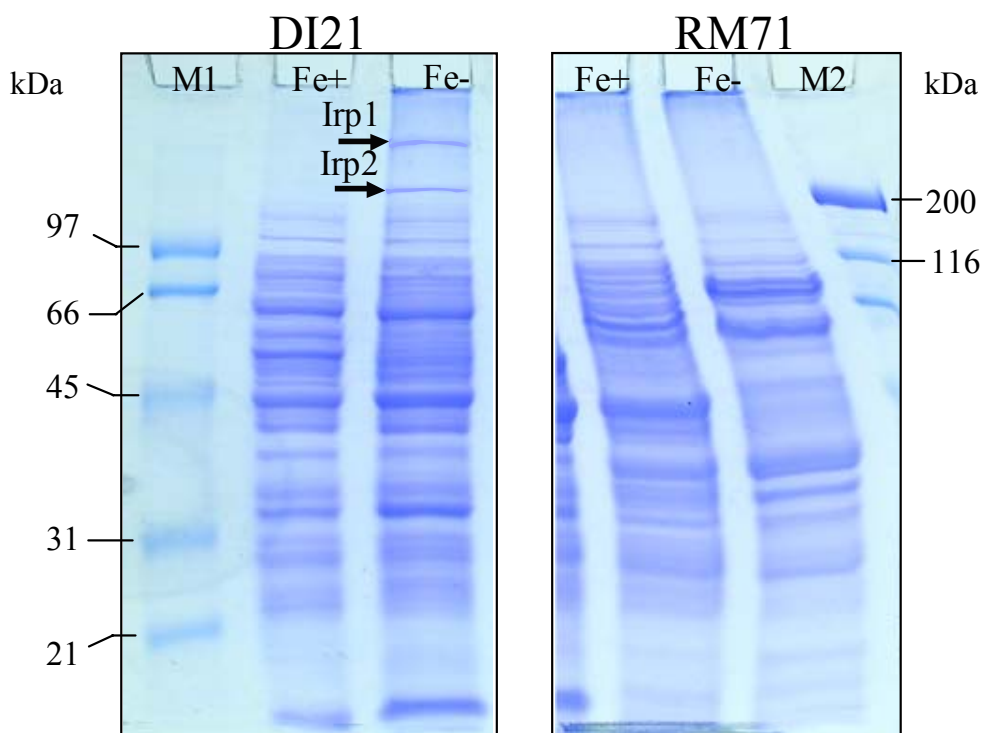


Figura VI.4.-Análisis del perfil de proteínas totales de membrana en *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 y *P. damsela* subsp. *damsela* RM71 crecidas en condiciones de exceso (Fe^+) y déficit (Fe^-) de hierro. Irp1 e Irp2 denotan dos proteínas de elevado peso molecular cuya síntesis se induce en condiciones de déficit de hierro en DI21, y que están ausentes en RM71. M1 y M2 indican los marcadores de medio y alto peso molecular respectivamente.

En la Figura VI.4 se observa un amplio rango de proteínas totales en los dos tipos de condiciones que va desde 20 kDa hasta más de 200 kDa. La masa molecular más elevada se corresponde con una proteína situada por encima del marcador de 200 kDa.

Cuando las células se cultivaron bajo condiciones de déficit de hierro, se manifestó la existencia de dos bandas correspondientes a dos proteínas de alto peso molecular en la cepa DI21 (Irp1 e Irp2, en la Figura VI.4), que no se detectaban en condiciones de exceso de este elemento, ni tampoco bajo ninguna de las dos condiciones en la cepa RM71 de *P. damsela* subsp. *damsela*. Este resultado evidenció la existencia de diferencias entre ambas subespecies con respecto a las proteínas inducidas en condiciones de limitación de hierro.

6.3.2. Aislamiento de fragmentos de un gen relacionado con la síntesis de sideróforos mediante Hibridación sustractiva.

El experimento anterior fue el punto de partida tras el cual se decidió llevar a cabo un experimento de hibridación sustractiva entre las cepas DI21 y RM71, para tratar de localizar los genes que codifican las proteínas de presencia diferencial reveladas en la Figura VI.4, cuya síntesis se incrementaba en condiciones de déficit de hierro, ya que éstas no aparecían en la cepa RM71.

De entre los distintos clones que se secuenciaron tras realizar la hibridación sustractiva se localizaron dos que se nombraron pSSH1 y pSSH6 que contenían insertos de 1.500 y 1.000 pb respectivamente, y sobre los que se centró el resto de este estudio. El inserto del clon pSSH6 era el de menor tamaño de los dos y al examinar su secuencia se observó que se solapaba con la del clon pSSH1, por lo que el resto del análisis se llevó a cabo únicamente con este último.

Cuando se realizó la predicción informática de ORFs del inserto del clon pSSH1, se localizó una ORF que codificaba una proteína de 508 aminoácidos que mostró un 63% de similitud con la proteína HMWP2 (*High Molecular Weight Protein 2*) de *Yersinia enterocolitica* (Figura VI.5). Esta proteína, de alto peso molecular, de 2.035 aminoácidos forma parte de la familia de las péptido-sintetasas no ribosómicas implicadas en la síntesis del sideróforo yersiniabactina de *Yersinia enterocolitica*.

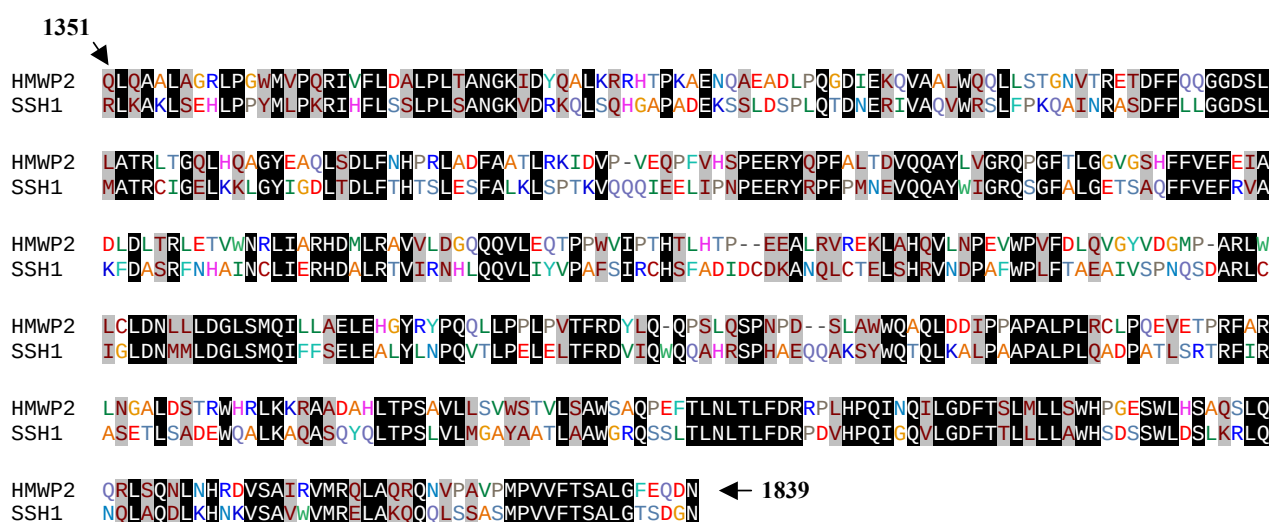


Figura VI.5.-Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida del clon pSSH1, con la secuencia de la proteína HMWP2 de *Y. enterocolitica*, con la que mostró el mayor porcentaje de identidad entre las secuencias depositadas en la base de datos EMBL. Los números denotan las posiciones en la proteína HMWP2.

6.3.3. Secuenciación de un operón regulado por hierro relacionado con la síntesis y el transporte de sideróforos

El clon pSSH1 contiene la secuencia parcial de un gen que codifica una proteína que mostró similitud con una péptido-sintetasa no ribosómica involucrada en la síntesis del sideróforo yersiniabactina, por lo que nos planteamos la hipótesis de que este fragmento de DNA podría formar parte de un operón involucrado en la síntesis de sideróforos en *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21.

Para avanzar en la secuencia de este gen y de los posibles genes adyacentes, se utilizó la PCR Inversa tal y como ya se ha descrito en capítulos anteriores. En un primer experimento, el DNA genómico de *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 se cortó con el enzima de restricción *Xba*I, se circularizó y se sometió a una PCR Inversa con los cebadores IP-Furta-15-1 y IP-Furta15-2. Como resultado se obtuvo una banda de amplificación de aproximadamente 9 kb. Esta banda se cortó con *Eco*RI, rindiendo dos bandas, una de 6 y otra de 3 kb, que se clonaron en el vector PT7-7, creándose así los plásmidos pCAR186 y pCAR187 respectivamente. La secuenciación de estos dos plásmidos permitió avanzar aproximadamente 9 kb más en la secuencia de DNA del clon pSSH1 identificado originalmente por hibridación sustractiva. Como resultado, se identificó la ORF completa, que codifica una proteína de 1.979 aminoácidos. El tamaño de esta proteína sugiere que corresponde con la segunda banda de mayor peso molecular de la Figura VI.4, que se denominó Irp2. Ésta mostró una gran similitud con proteínas en las que se ha demostrado una función en la síntesis de sideróforos en especies de los géneros *Yersinia*, *Pseudomonas*, y en *E. coli* y con una ORF deducida del genoma completo de *Photobacterium profundum*, y que está anotada como una hipotética péptido-sintetasa no ribosómica (Tabla VI.1). Por tanto, el análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de Irp2 sugiere que esta proteína es un firme candidato a estar relacionada con la síntesis de sideróforos en *P. damsela* subsp. *piscicida*.

La secuencia del extremo 5' de Irp2 coincidió exactamente con una ORF parcial que en un estudio previo de nuestro laboratorio se había identificado, mediante un ensayo de titulación de Fur (FURTA), como parte de un operón regulado por la proteína Fur (Osorio *et al.*, 2004b). Uniendo las secuencias de DNA obtenidas en dicho estudio previo, con la obtenida en el presente trabajo, el mapa génico parcial de este operón queda establecido tal y como se describe en la Figura VI.6.

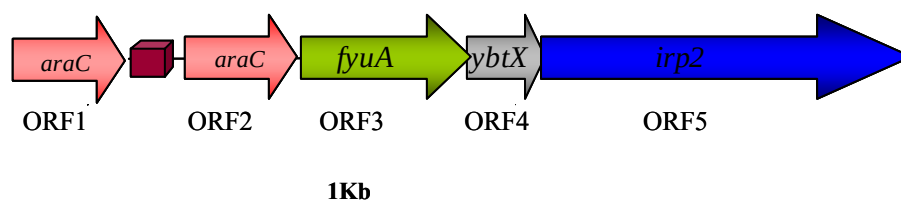


Figura VI.6.-Mapa génico parcial del *cluster* de genes regulado por la proteína Fur, que contiene el gen *irp2*, identificado en este estudio por hibridación sustractiva, y genes previamente descritos (Osorio *et al.*, 2004b). La caja violeta indica la presencia de una caja Fur. Las flechas indican ORFs completas y la dirección de la transcripción. ORF1 y ORF2-activadores de la familia AraC; ORF3-Receptor sideróforo; ORF4-YBTX-like; ORF5-*irp2*.

El gen *araC* (ORF2 en la Figura VI.6) ya había sido localizado y secuenciado parcialmente en el capítulo V de la presente tesis, mediante la utilización de la técnica de hibridación sustractiva entre las cepas PC554-1 y EPOY 8803-II de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Las proteínas del tipo AraC constituyen una subfamilia dentro del grupo de reguladores transcripcionales y la mayoría funcionan generalmente como factores activadores (Gallegos *et al.*, 1993). Entre las ORFs 1 y 2, se localiza una caja Fur que contiene 16 de las 19 bases establecidas como secuencia consenso de la caja Fur de *E. coli*, responsable probablemente de la regulación mediada por hierro de este operón génico.

La ORF3 se estableció como una proteína de 660 aminoácidos con homología con receptores de sideróforos pertenecientes a diferentes especies. La similitud más elevada se correspondió con un receptor de sideróforos de *Photorhabdus luminescens* así como otro de *Ralstonia solanacearum*. La ORF4 resultó ser similar a la proteína YbtX de *Y. pestis*, la cual forma parte del *cluster* de genes implicados en la biosíntesis del sideróforo yersiniabactina (Gehring *et al.*, 1998), si bien la función exacta de esta proteína YbtX es desconocida.

Tabla VI.1.—Porcentajes de identidad (Id) y similitud (Sim) de las proteínas pertenecientes al *cluster* génico de síntesis y transporte de sideróforos de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Proteínas de <i>P. damsela</i>	Homólogo	EMBL No Acc	Id.(%)	Sim.(%)
ORF2	Regulador transcripcional de la familia AraC de <i>Anabaena</i> sp.	Q8YTY8	44	59
ORF3	Receptor de ferri-sideróforos FyuA de <i>Photorhabdus luminescens</i>	Q7N4L5	40	61
	Receptor de quinolobactina de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Q84HG2	25	42
ORF4	Proteína YbtX de <i>Y. pestis</i>	Q9ZC28	35	52
Irp2 (ORF5)	Hipotética NRPS de <i>P. profundum</i>	Q6LRJ7	55	70
	HMWP2 de <i>Y. enterocolitica</i>	Q7N4L1	47	63
	NRPS de <i>Ps. syringae</i>	Q882M4	47	61
	Irp2 de <i>Y. pestis</i> (HMWP2)	Q9Z399	45	61
	Hipotética péptido-sintetasa de <i>E. coli</i>	Q8FGF3	45	61
	HMWP2 de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Q666G1	44	61
	AngR de <i>V. anguillarum</i>	Q6ZXE0	31	50
Irp1 (ORF6)	HMWP1 de <i>Y. enterocolitica</i>	CAA73127	37	52
	HMWP1 de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	CAH20834	37	52
	HMWP1 de <i>Y. pestis</i>	AAM85958	37	52
	NRPS de <i>Ps. syringae</i>	AA056104	34	50

La secuencia de la proteína Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida* se refleja en la Figura VI.7. Asumiendo que el primer codón ATG es el situado en la posición señalada en la Figura VI.7, la ORF *irp2* de *P. damsela* subsp. *piscicida* codifica una proteína de 1.979 aminoácidos con una masa molecular estimada de aproximadamente 221 kDa y un punto isoelectrónico teórico de 5,67 (calculado con el *Expasy ProtParam*).

262

CATGATTGGCAACACAATTAGAAAGCGTTATCAACTAAAGCACCTGTCTACTGCGTATCCAAACGAGTTTGAAACGGCTGCCGATTTT 3150
 H D L A T Q L E S A Y Q L K A P V T A Y P N E F E T A A D F
 ACTCAAGCAAGTGAATTGCTCAAAGCGATAATGACTGGAGACACATCTGCGAATGCGTTATTAGACAGCCCGCTATCACCAGAAGCACTG 3240
 T Q A S E L L K A I M T G D T S A N A L L D S P L S P E A L
 TTAACCTAAAATCCAGCTTTCCAGGATCAAATCATCGCGATTTCAAACGCGGATCTCAGTTATCATCTCAACTTGGTCGCCCTGTCTATC 3330
 L T Q N P A F Q D Q I I A I S N A V S Q L S S Q L G R P V I
 CTTACCGAGTTTCGACTCGAGGAGCGGACGTGTGCGCCGAGCACTACTAGAGGTATGCGGCTCAAAGACTGTTCGAATATCATGCAATAGAT 3420
 L T E F D S R S G R V A E A L L E V C G G S K T V E Y H A I D
 GCCTCGTTGTCTTTGGTTCAATCAGCCACAGATAGATTAAGTCGTTTCTCACACGCTCACGTTTCATCATTGGGATGGTAACGATCAGCCC 3510
 A S L S L V Q S A T D R L S R F S H A H V H H W D G N D Q P
 CCCTTGTGTGCAAAAGTCGACATCGTGCTAATCAACAATGTCTTCCACCGAGTGACCAAGCCACAAAACGTTCTCAGCAACGCCAGAAA 3600
 P L C A K C D I V L I N N V L H R V T K P Q N V L S N A Q K
 CTGGCCACTTCGCAAGGGCTGATGATAGTACTGGAATATCAACACTTTGAAGATGGTGGCTGATCAGCGCTCAAGTCATCCAACCTGAA 3690
 L A T S Q G L M I V L E I S T L E D G A L I S A Q Q P E
 TTGTCTACACTGCCAACCCAGAGCGAACTGCTATCTCTGTTGAAAAACAACGCACTGCGTGTAGAACAGATCTTAGACCATTCAACATTT 3780
 L S T L P T Q S E L L S L F E N N A L R V E Q I L D H S P F
 ATCGGCTATGTCTGCGTAATCAATCGCCAGTACTGATTGCCAATAGTGAAACGCTAAAAGCCAAACTTAGCGAACATTTGCCGCCATAT 3870
 I G Y V L R N Q S P V L I A N S E R L K A K L S E H L P P Y
 ATGCTGCCCAAGCGTATTCACCTTCCGAGCTCGCTTCCATTGAGCGCAAAACGGAAGATCGATCGCAACAGTTGTCAACATGGTGCA 3960
 M L S P K R I H F S L S L P L S A N G K V D R K Q L G H G A
 CCAGCCGATGAAAAATCATCGCTGGATTCTCCCTACAACTGATTAACGAACGCATTGTAGCCCAAGTGTGGCGCTCACTTTTCCCTAAG 4050
 P A D E K S S L D S P L Q T D N E R I V A Q V W R S L F P K
 CAAGCGATAAACCGCGTAGCGATTTTCTTCTATTAGGGGAGACAGCTTGATGGCGACGCGCTGCATCGGAGAAGTGAAGAACTTTGGT 4140
 Q A I N R A S D F F L L G G D S L M A T R C I G E L K K L G
 TATATAGGCGATCTTACCGATCTTCTCACTCACACCAGCTTAGAAAGCTTTGCTCTAAAACATATCGCCGACCAAGGTTCAACAGCAGATC 4230
 Y I G D L T D L F T H T S L E S F A L K L S P T K V Q Q Q I
 GAGGAGTTAATACCAACCCCGAAGAGCGCTATAGACCGTTCCTATGAACGAAGTCCAAACAGCGTATTGGATTGGTCGCCAATCTGGT 4320
 E E L I P N P E E R Y R P F P M N E V Q Q A Y W I Q A Y W P S G
 TTTGCTCTCGGTGAGACAGCGCTCAGTTCTTTGTGCAATTCCGCGTCCCAAGTTTGATGCCTCACGTTTCAACCACGCCATCAACTGT 4410
 F A L G E T S A Q F F V E F R V A K F D A S R F N H A I N C
 TTGATAGAGCGCCATGATGCGTTAAGAAGAGTGATACGTAACTCACCTGCAGCAAGTGTTAATTTATGTTCCAGCCTTCTCCATTCGCTGC 4500
 L I E R H D A L R T V I R N H L Q Q V L I Y V P A F S I R C
 CATTCCTTTGCCGATATTGATTTGTGACAAAGCCAAACAGCTCTGCACTGAGTTATCTCACCAGTCAATGATCCCGCGTTTGGCCACTG 4590
 H S F A D I D C K A N Q L C T E L S H R V N D P A F T W P L G
 TTCACCGCGGAAGCGATAGTATCGCCCAATCAGAGTGATGCGCGACTGTGTATCGGATTAGACAACATGATGCTTGATGGATTGAGTATG 4680
 F T A E A I V S P N Q S D A R L C I G L D N M M L D G L S M
 CAGATTTTCTTCTCAGAATTAGAAGCGCTGTATCTAAATCCACAAGTGACGTTGCTGAACTTGAGCTTACATTCCGTGACGTTATACAA 4770
 Q I F F S E L E A L Y L N P Q V T L P E L E L T F R D V I Q
 TGGCAGCAAGCACACCGCTCTCCTCATGCTGAGCAACAGGCAAAAGTTATTGGCAAAACCGATTGAAAGCGCTGCCTGCAGCTCCGGCG 4860
 W Q A A H R S S P H A E Q Q A K A A S Y T Q T Q L K A L P A Q P A
 CTACCTTTACAAGCGGATCCGGCACTTTATCTCGCACTAGGTTTATCCGAGCTTCCGAGACTTTATCAGCCGATGAATGGCAAGCGCTG 4950
 L P L Q A D P A T L S R T R F I R A S E T L S A D E W Q A L
 AAAGCACAAGCAAGCCAATATCAGCTCACTCCTTCACTCGTTCTAATGGGCGTTACGCGGTACCTTAGCGGATGGGGGCGTCAAGTCA 5040
 K A Q A S Q Y Q L T P S L V L M G A Y A A T L A A W G R Q S
 TCGTTGACTCTCAACTTAACTCTGTTTGTGCGCCCTGATGTGACCCCTCAGATTGGCCAAGTGTAGGTGACTTCCACCACTACTATTA 5130
 S L T L N L T L F D R P D V H P Q I G Q V L G D F T T L L L
 TTAGCTTGGCATAGTGATTCTAGCTGGCTTAGCTTAAGCGTTTGCAAAACCAATTAGCCCAAGACTTAAACACAACAAAGTGTG 5220
 L A W H S D S S W L D S L K R L Q N Q L A Q D L K H N K V S
 GCAGTTTGGGTGATGAGAGAATCTGCTAAACAACAGCAATTGTCTAGTGCAAGTATGCCAGTAGTCTTTACAGTGCCTTGGTACTTCC 5310
 A V W V M R E L A K Q Q Q L S S A S M P V V F T S A L G T S
 GATGGCAACTTTTTGTCCAACAAAGGTTGGCTAAACCTGTTTGGGGCATCTCTCAGACCCCGCAAGTTTGGCTCGATCATCAAGTATAC 5400
 D G N F L S N K G W L K P V W G I S Q T P Q V W L D H Q V Y
 GAATCAGAGGGGCACTGTGTTTGAACCTGGGACGAGTGGAAGCAATTACTGCCTCAAAACCTGCTCGAACAAATGTTTGGTCAATATGTT 5490
 E S E G Q L C L N W D A V E A L L P Q T L L E Q M F G Q Y V
 GAGCTACTCAAAACATTGGCAAGCCAAACGCAAGCTGGTCTCAACGATCGATAAACTGCTCTCTGGCGATACGCCATCTTTACCATCA 5580
 E L L K T L A S Q P Q S W S Q T I D K L L S G D T P S L P S
 CCTGCTTCGTATCCACCGCTCAACGTCTTGTGCCCATTCATACAACGACAAGGCGAGCCAGAAAAGATCCAACGGATTCAAGGAGCA 5670
 P A S Y P T A Q R L V P H S I Q R Q G E P E K I Q R I Q A A
 TTTCAGCAGATTGTCTCAGCGCCGATTGGCGAGAAGGACAACCTTTTGTGTCAGggggcagctcattacagctagtacaacttcatggg 5760
 F Q Q I V S I P I G E N N F F A D G A G A S S L Q L F V Q L H G
 CGATTAAACCAAGGCGACACACTCTCAGTGACGGATCTGTTTACCTACCTTACCCGCCTTCTTGAAGTTTCATATCAACGTG 5850
 R L T Q Q G D T L S V T D L F T Y P S P A L L A S S Y L T S
 GTAGAGCAAGCTAAGCCAAATACCGACCGAGAACAACGCCAACAGAGACAAGCTCTGCGCAAACTCGTACGCCGAAACGCGTTAACTAA 5940
 V E Q A K P N T D R E Q R Q Q R Q A L R K L V R R K R V N *

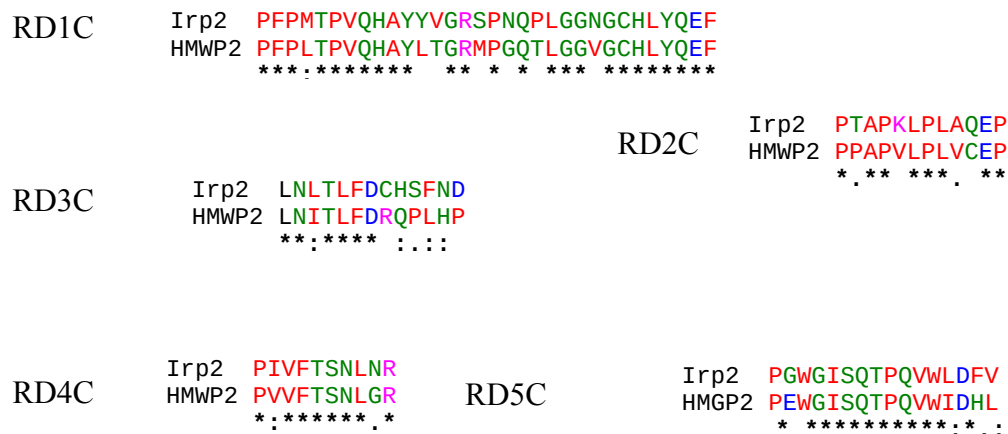
Figura VI.7.-Secuencias del gen *irp2* y la proteína Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Se marca con un asterisco el codón de parada de la transcripción.

Un análisis comparativo entre la secuencia de aminoácidos de la proteína Irp2 y la de proteínas homólogas ya descritas en la literatura, nos permitió localizar regiones específicas en la molécula que mostraron un elevado grado de conservación entre las proteínas de distintas especies (Figura VI.8).



Figura VI.8.-Secuencia de la proteína Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Se subrayaron las repeticiones directas (RD), las secuencias SBS (*Substrate binding site*) y las hth (*helix-turn-helix*).

Una característica llamativa es la presencia de unos 550 aminoácidos repartidos en 5 tipos de repeticiones que se denominaron repeticiones directas (RD₁₋₅) por su gran similitud con las halladas en la proteína HMWP2 de *Y. enterocolitica* (Guilvout *et al.*, 1993), localizadas en los extremo amino y carboxi-terminal de la proteína. En la Figura VI.9 se muestra un alineamiento de las secuencias de las cinco repeticiones localizadas en el extremo N-terminal de ambas proteínas, donde se puede apreciar el grado de conservación de estas zonas, cuya función exacta es todavía desconocida.



265

Como se observa en la Figura VI.8, se delimitó la secuencia SGSTGTPKG situada entre los aminoácidos 633 y 641 a la que se denominó “Bucle P”. Ésta se corresponde con una región altamente conservada en el grupo de proteínas implicadas en la síntesis de antibióticos (Farrell *et al.*, 1990) e idéntica entre las proteínas Irp2 e Irp1 (descrita en el punto siguiente) de *P. damsela* subsp. *piscicida*, AngR de *V. anguillarum* y HMWP2 de *Yersinia enterocolitica* (Figura VI.10) (Hori *et al.*, 1991).

```

Irp1  SGSTGTPKGVV
Irp2  SGSTGTPKGVV
AngR  SGSTGTPKGVV
HMWP2 SGSTGTPKGVV
      *****

```

Figura VI.10.-Alineamiento del dominio “Bucle P” de las proteínas Irp1 e Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida*, AngR de *V. anguillarum* y HMWP2 de *Yersinia enterocolitica*.

La secuencia de aminoácidos comprendida entre las posiciones 910 y 934 de Irp2 mostró una elevada similitud con el dominio *helix-turn-helix* de la proteína AngR de *V. anguillarum*, y HMWP2 de *Y. enterocolitica* (Guilvout *et al.*, 1993), compartiendo 12 de las 22 posiciones que forman esta región, entre ellas el residuo central de glicina (importante para la flexibilidad de movimientos de las proteínas), tal y como se muestra a continuación:

```

Irp2  GVRHGVSLALSTQGGKDRQLAFAVV 25
AngR  GVRRAVAIAV---GNKDKTLAAFIIV 22
HMWP2 GVKQATVLAI---GEKEKTLAAVVVV 22

```

Asimismo, entre los aminoácidos 1359 y 1367 se identificó la secuencia consenso SBS (*substrate aminoacid binding site*) ubicada en los dominios de tiolación o PCP (*peptidyl carrier protein*) de las péptido-sintetasas no ribosómicas:

Secuencia consenso SBS	F(F/Y)X L G G(H/D)S L(I)
Secuencia de Irp2	F F L L G G D S L
	* * * * *

Secuenciación del gen *irp1* de *P. damsela* subsp. *piscicida*

Para seguir avanzando en la secuenciación del operón, una vez que se secuenciaron los clones pCAR186 y pCAR187, se construyó un nuevo mapa de restricción del operón, que permitió diseñar nuevas estrategias de amplificación por PCR Inversa. En este caso, el DNA de *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 se cortó por

separado con los enzimas de restricción *Apa*LI y *Xho*I, y la reacción de PCR Inversa se realizó con los cebadores IP-HMWP1-3' y AngR-like-3'-2. Como resultado se obtuvo en cada caso una banda de aproximadamente 5 kb. Se escogió la banda obtenida con *Apa*LI, y se clonó en el vector pGEM-T Easy, creándose el plásmido pCAR217.

A partir de la secuencia del pCAR217, se continuó avanzando por *chromosome walking*. Para ello, nuevamente el DNA de *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 se cortó con los enzimas *Bam*HI, *Cla*I, *Kpn*I, *Pst*I, y *Sac*I, se circularizó, y en este caso la reacción de PCR Inversa se llevó a cabo con los cebadores *irp1-in-3'-1* y IP-*irp1-like-5'*, diseñados en el extremo 3' de la secuencia de pCAR217. Como resultado se obtuvieron bandas en el rango de las 6-8 kb. Se escogió la banda obtenida con *Sac*I, de aproximadamente 7 kb (Figura VI.11), y se secuenció completamente.

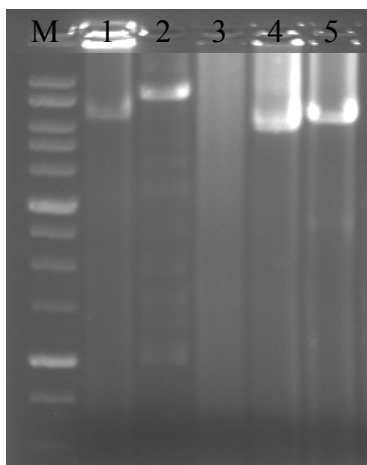


Figura VI.11.-Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR Inversa llevada a cabo con los cebadores *irp1-in-3'-1* y IP-*irp1-like-5'*, diseñados en el extremo 3' de la secuencia del pCAR217, utilizando como DNA molde el DNA genómico de la cepa DI21 cortada con diferentes enzimas y circularizado. (1) *Bam*HI, (2) *Cla*I, (3) *Kpn*I, (4) *Pst*I, y (5) *Sac*I.

De este modo, el mapa génico de este operón al que se denominó “*irp*” queda establecido tal y como se describe en la Figura VI.12.

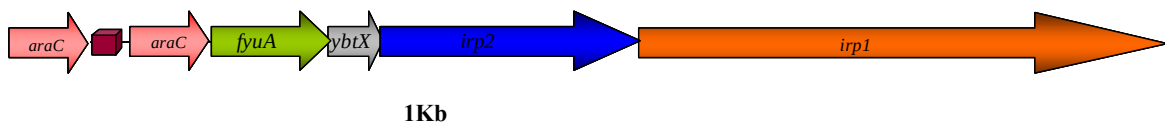


Figura VI.12.-Mapa del *cluster* de genes *irp*, regulado por la proteína Fur, que contiene los genes *irp2* e *irp1* (ORF6) obtenido en este estudio al avanzar en la secuenciación de la región adyacente del gen *irp2*. La caja Fur se señala como un cubo violeta.

Así, se identificó una ORF completa que codifica una proteína de 3.996 aminoácidos con una masa molecular estimada de 442 kDa, punto isoelectrico teórico de 5,28 y que se transcribe en la misma cadena que *irp2*. Cuando se realizó una búsqueda en las bases de datos, se observó que era homóloga a varias péptido sintetasas no ribosómicas relacionadas con la biosíntesis de sideróforos en diversos microorganismos (Tabla VI.1). Por homología con otras proteínas descritas en el género *Yersinia*, se denominó a este gen *irp1* (Figura VI.13).

```

ATGATCATGGATAACAAATAATTTGATGATAACTGCGACCCCATTTGCGGTCTAGGTATGGCGTGTGGGTTCCCTAAAGCGCCAAACATC 90
M I M D N N N L Y D N C D P I A V I G M A C R F P K A P N I

GACGCGTTTTGGCATAACTGTCCAATGGTCTATCAGGCCAATCCTTTTTTCAGTGATGAAGAGCTAAAAACGCTGGCGTGGATGCAGAC 180
D A F W H N L S N G L S G Q S F F S D E E L K T A G V D A D

GTACACCAACGCGAACACTTTGTTCCAAGTGGTGGGTGATTGACAAACCCAGAGTACTTTGATGCCAGCCTGTTGCGCTACTCGCCTGCA 270
V H Q R E H F V P S G A V I D N P E Y F D A S L F G Y S P A

GAGGCGACATCTATCGACCCGCAGCAACGTTTGTCTTACAAAATGTATGGCACGCACCTTGAGCAGCGGGTTATGCGCCCACTCAAGCA 360
E A T S I D P Q Q R L F L Q N V W H A L E H A G Y A P T Q A

CCATCGAAAACCGGTGTTTGGCGCAGTGAGATCCAGTACTTACCCGTCAATTTAAAGCTTTTCGACGTAACCTAAGTTGGTCAAGTGAAA 450
P S K T G V F G A V R S S T Y P S F K A F D V T Q V G Q V K

GGACTACAAGCTTTGCTCGGTAAAGCAGCAAGATTACCTTGCCACTCGAGTCGCGCATTAAGTTCAACTTCACCGGACCCGCTTTACGGTT 540
G L Q A L L G N D K D Y L A T R V A H K F N F T G P A F T V

CAAAACCGCATGCTCCAGCTCACTGGTTGCAGCGCATCTTGCCTGCGAAAGTTTACGCTCTGGTGAGTGCGATATGGCGATTGCAGGCGGT 630
Q T A C S S S L V A A H L A C E S L R S G E C D M A I A G G

GTTGCCGTGTCAATTTCCGCAAGTATCGGGATACGAATATCAGCCCGGCGATGATTTTCTCCCCGATGGTTTGTGTGCGCCCTTTCGATCAG 720
V A V S F P Q V S G Y E Y Q P G M I F S P D G L C R P F D Q

CAAGCGAATGGTACCTTTGGCGGGCATGGTGTGCGGACGCTAGTGTAAAACGCCTTGATGATGCGCTTAACGCGGGAGACACCATCCTT 810
Q A N G T F G G H G V G S V V L K R L D D A L N A G D T I L

GCGGTACTACGTGGCAGTGCCATTAATAACGATGGCAAGAAAAAGTTGGCTTCACCGCGCTTCGGTCAATGGCCAATCTCAAGTTCTT 900
A V L R G S A I N N D G K E K V G F T A P S V N G Q S Q V L

ACCGAAGCACTTCATCTTGCAGACATTCGTCCAGATGACGTTGAGATGATTGAAGCGCACGGAACCGGAACCTAAGCTTGGTGATCCTATC 990
T E A L H L A D I R P D D V E M I E A H G T G T K L G D P I

GAAGTCACTGCGATCAAAAATGCTTATCAACGTAGCCCTGACGCGACCTATGTGCCGACTAGGCTCTGTGAAAAGTGGTCTTGGTCAATTTG 1080
E V T A I K N A Y Q R S P D A P M C R L G S V K S G L G H L

GATACAGCGGCAGGCATTGCTTCATTGATTAAGCTGTCTTGTGCGTTTCAAGACAAAAGATTCCGATGTCAATTGAACATCAGCCAACCC 1170
D T A A G I A S L I K A V L S V S R Q K I P M S L N I S Q P

AATCCAGAGCTGCAGCTTGAGGGTTGCGGATTTACCCTAGCGACTCAAACTGTTCGATTGGGTGACTCCACTGCGCACCGCCGAGCCTCT 1260
N P E L Q L E G S G F T L A T Q T V D W L T P L R T A A A S

TCCTTTGGCATGGGAGGCACCAACTGCCATATGCTGGTTCAATCTTCACCGCAACAAGCCC GCCAGAACAGCCTGCCAAAAAGAGAGA 1350
S F G M G G T N C H M L V Q S S P Q Q A R P E Q P A K K E R

ACCTATATCCCGTTACTGCTCTCTGCCAATTCGTCCAATCTCTTCGTGAGCTGGCGCAAGCTACAGTAGCTACTTGAACCAACACCCCT 1440
T Y I P L L L S A N S S K S L R Q L A Q S Y S S Y L N Q H P

GCTGCAGACAATATCGCCTATTGAGCTTTATCCTCGCGTGCACCTCGACTTGCCCTACCGATTAGCCGTTACCAATATGGCTCACGCCGAA 1530
A A D N I A Y S A L S S R A L D L P Y R L A V T N M A H A E

TCGACGCTCAGTGCAATTTGCACAACTTGGCGAAGCTTCATCCGAGCTAGTCACAGGTGTGCCCCAATCTCGAGCCCGACTTGCATGGACA 1620
S T L S A F A Q S G E A S S E L V T G V A Q S R A R L A W T

```

TTCACAGGTCAAGGCAGCCAAATTTGGCGGCATGGGCGAAACTTTGGTATCACACCAGCGACGCTTTTCGTCAGAGTATCGACCTGAGCCAG 1710
 F T G Q G S Q F G G M G E T W Y H T S D A F R Q S I D L S Q
 AGCTACTGTGAGATAAACTCACCAGCCCTTTGACTGAGATTATGTTTGGCTCAAAATCGCGATAAGTTAGCTCACACCGATGGTGCCCAA 1800
 S Y C R D K L T A P L T E I M F G S N R D K L A H T D G A Q
 GTCGCTATTGTCGCATTTGAGCTCGCATTGGCTGCGCACTGGCAAGCTAAGGGTCTAACCCAGATGTTGTATTAGGCCATTCCGTGGGA 1890
 V A I V A F E L A L A A H W Q A K G L T P D V V L G H S V G
 GAGATCTCGGCATGTGTCGTTGCCGGATATCTAAGTCATCAACAAGCGATTGAACTGGTGATTGAACGGGTCAACAAATGCACCAATGC 1980
 E I S A C V V A G Y L S H Q Q A I E L V I E R G Q Q M H Q C
 GCTCAGCAACATAACGGGGCAATGCTTGCCTGATTGCGCCCACTTTGGACAGCTCACTGGGATCCCAGCACTTGCCAAGCTCGATATAGCC 2070
 A Q Q H N G A M L A V F A P L G Q L T G I P A L A K L D I A
 GCTCATAACGGTACAGCGCATTGGGTTTTCTTGGAGATATCCAAGATAAAGAACAGCCGTGTACGAGCTTGAACAGGCTAACCTAACG 2160
 A H N G T A H W V F S G D I Q D K E Q A C H E L E Q A N L T
 TATCGACAGCTCGAAGTCCCTGCGCGGCACACTCTCGACATCTTGACTCGATGCTGGACTCATACACCAATTTCACTCGCCAACCTGACG 2250
 Y R Q L E V P C A A H S R H L D S M L D S Y T N F T R Q L T
 CCCACTCAAGGGCGAATCACCTGATTTTCTGGCGTGACAGGAAAAACCTCAACTCCGTCAACGAACCTAAACCCCGATTACTGGGCACGT 2340
 P T Q G R I T L I S G V T G K T I N S V N E L N P D Y W A R
 CATGTGAGAGAGTCGGTTCAATTTAGACCAGCAATCGGGCAGGCCTAGCGTTAGAGTGTGAGGTCCTTTATGGAGATGGGACCAAAATCT 2430
 H V R E S V Q F R P A I G Q A L A L E C Q V F M E M G P K S
 CACCTCACTTCAATCGGTGCGCGTGAAGAGTGGACCTCTCCTTCTGCTTGGTTCCACGAGAGAGGATAATATTGGCTGCGCGCTGTAC 2520
 H L T S I G R R E E W T S P S A W F H A E E D N I G C A L Y
 ACCTTGGGGGTAGATGCTCCATGGAAGCAAGTGTCAACCTAACAGGTCAACGTTGTGATCTGCCGCTCTACGTGTTTGATGAGCAAGCA 2610
 T L G V D A P W K Q V F N L T G Q R C D L P L Y V F D E Q A
 TATTGGGTGAGACAGAGCAACCAATTAAGCACCTCAATTAGCTGATTAGAGAAACCAATCATTCCCCAGTCGACCAATGACACTG 2700
 Y W V E T E Q P I K A P Q L A D S E T T I I P P V D P M T L
 CGCTGCGTGTGATTCAAGACTTCTGACATCTTTCGTAAACAAAGCCCGTTAAGCCTGATTAACATCCTTGGGGAGGACGAATTTTA 2790
 R C A V I Q D F L T S C V K Q A P L S L I N I L R G G R I L
 CCGCGTCATCGACACCATATTAGGGCTCTATTAGATCTCTTGGTCAACCAAGGCTACTACCATAAACAAAGCGATGTGTGGCTACCATCT 2880
 P R H R H H I R A L L D L L V T Q G Y Y H K Q G D V W L P S
 CAATCACTACTATTGCCTAGCGCTGATGTTGTCACTCAACGCTGGCTAGCAGAGAGGAGCGCTGACGACATGGCCAATGTTGAACAACAT 2970
 Q S L L L P S A D V V T Q R W L A E R S A D D M A N V E Q H
 TGCCAGCAGTTATTGTCGTTAAGTCCACAATTTGCCAACTTATTGCGCCAGCTAAACCATGTGGCAACTCTAGAGGCACAGTTAGCGCCA 3060
 C Q Q L L S L S P Q L P N L L R Q L N H V A T L E A Q L A P
 TTGCTCACTGGGCAGAGCTTGAATCACTACCTACCCAGAGCAACAGCAGTTGGCAAGATTTGCATGCCAACCTCACCTATCAAGACTGG 3150
 L L T G Q S F E S L P T Q S N S S W Q D L H A N L T Y Q D W
 TCTTTACTCAGTGAGCAACAGGATTTGCCCACTGCGATTACCATCAGTGTTCACAACTCTTGCCCATATCCCAAAACGTTGACCTATCG 3240
 S L L S E Q Q D L P T A I H H Q C S Q L L P I S Q N V D L S
 GTGTCTGACACTTACCCAGTTAAAGAGTTATGCGCGCTTGCATCTGCCGATTGAGCAAAATGTGGGGGCAAGATATCTACGACCTGCGC 3330
 V S D T Y P V K E L S R V A I C R L S K M W G Q D I Y D L R
 GCTCAAGCCCTCAAGGTCAATTGGCAATGGCTAGCTCGGATCCAACCTCAAAACAGCGAACAACGATGACTGCCAGAGCTACTCCCTTCA 3420
 A Q A P Q G H W Q W L A R I Q P Q T A N N D D S P E L L P S
 CCACACAACCGTTACCAAGTGGCAAGCGACTCCTGTTGAATCCGACCATCAGATAAACTCAGTGACCGCTGAACAAGTGACATTAAGCCCTT 3510
 P H N R Y Q W Q A T P V E S D H Q I N S V T A E Q V T L A L
 ACTTCAACAGGCACTGTCCACAAAATCACACCAGAGCAAGGGGTAAATGTTTTGCTGCAACCTCTCTCTCCGAGGCCAATACATCTGAG 3600
 T S T G T V H K I T P E Q G V I V L P A T S L S E A N T S E
 AGCATCACTCAACTTGTCTCAGACCTTAAGCCATAGCCCGGATAATTTACGGATTGTGGTTTGGGCGCAATAAAAGTCTCAGCTAACGAT 3690
 S I T Q L A Q T L S H S P D N L R I V V C G A I K V S A N D
 GATATCGCACCACTAGCAACTGCCTTGCCTCACTAATACGCGTCGCCGTACCGAGATTCCAAACAGCAATTTTTTGTCTTGGATACG 3780
 D I A P L A T A L H S L I R V A R T E Y P N K Q F F V L D T
 AACGTTAGTCAACCAACAACAGCTTGCAGAATTAATGGCGGCTGCGCCTTTCTCTTGTATCACGATCTCGCTTATCGTGATAGTCAATAT 3870
 N V S Q P Q Q L A E L L A A A P F S C Y H D L A Y R D S Q Y

GCGTTTGCTATGAACGTTAGTCCAAACCCAGCTCAATTTGCCAAGCATTTTAGATTGGAATCTCAATCCAGTAACAAGCCGTCAACTCAA 4680
 A F A M N V S P N P A Q F A K H F R L E S Q S S N K P S T Q

CCTCTGCCGGTTGAAAAGATCGAGATAACCAGCTGGCTTCAAGACCGAGTGCATACCCAGTTGGGTCTAGCGAAAACTATCGCCTTGAG 4770
 P L P V E K I E I T S W L Q D R V R Y Q L G L A K N Y R L E

CCTCAACAAGATCTCTTGCAGTTGGGAATGGATTGCTGCAATTTCTCGATCTCAACGCAGCAATTCAAAAGCAATTTAATATTAAGCTT 4860
 P Q Q D L L Q L G M D S L Q F L D L N A A I Q K Q F N I K L

ACCGCAGAAGAAGCCTACCAACCGATGACTGTGCATGGGCTAGAAGCATTGATTAATGCTAAGAGCCAAGATTCCAAACCGCAATCGACA 4950
 T A E E A Y Q T M T V H G L E A L I N A K S Q D S K P Q S T

CTTGCTTTTGTGTTCAACCAGATCAAAAACACCAGCCGTTCCCACTGACCCTATTCAACACGCCTACTGGGTGGGACGAGAGTCTTGG 5040
 L A F A V Q P D Q K H Q P F P L T P I Q H A Y W V G R E S W

GTGCTTACGGGGGCATTGCATGCAATGTTGTGTTGAGTGGGACCTTATCACTCGCCCATTTTGATATCGAGCGACTTGAGGCGCTTGG 5130
 V P Y G G I A C N V V F E W D L S L A H F D I E R L E A A W

AATGCCCTTGTTCAGCGTCAACGATATGCTAAGAATGTGGTATTACCTACTGGTGAGCAAAATCATCTCAGCCGAAGTACCGAGCTATTCT 5220
 N A L V Q R H D M L R M S V L P T G E Q I I S A E V P S Y S

TTTACTCGTCATGATTTGTCTGATTTAACGGATGATGCCAAGGCCAACGCGCTGGAAGAAACTCGGCAGATCATAGCAAAACAGTACGC 5310
 F T R H D L S D L T D D A K A N A L E E T R Q I I S K Q V R

CCTGCCAGCCAATGGCCGTTATTTGACGTTGCTATTAGTGAGCTGACACCATTGTAGTATCGACTTCACATGAGTCTAGATTTACTCCAA 5400
 P A S Q W P L F D V R I S E L T P C E Y R L H M S L D L L Q

TTTGATGTGCAAGCTTCAAGATCATGATGGACGATCTCAGTCGGGCCTATCAAGGTGAAGCATTGCCAGCGTTATCCTTATCATTAGA 5490
 F D V Q S F K I M M D D L S R A Y Q G E A L P A L S L S F R

GATTACGTGGTCCACGAGCAATCGTTAAAAGATCAACCTGAATGGCAAGCCTCATGGAATTACTGGTTAAATCTTATTCGGTCAATTCCTC 5580
 D Y V V H E Q S L K D Q P E W Q A S W N Y W L N L I P S I P

AAGGCGCCGATGTTACCGCTGGAATAATGTCGCTGATTCGCACACGCCAACATTTGTAACCTCGTAAAGGTGCTTTAGCAAAATCTCACTGG 5670
 K A P M L P L E N V A D S H T P T F V T R K G R L A K S H W

ACAAGTTAAAGCCCATTTGGCAGCAGCGGGGTATCACACCATCTGCTGGTTTGTGACCTTGTTCTCGCGCTTGCTGGCGAAGTGGTCT 5760
 T K L K A H W Q H A G I T P S A G L L T L F S R L L A K W S

CAATCAGCCGCTTTTACCCTCAATGTGACCTTCTTCAACAGACAGCCATTTTCATCAGATGTGCAAGATTTGATTGGCGACTTTACATCG 5850
 Q S A A F T L N V T F F N R Q P F H H D V Q D L I G D F T S

GTGCTACTGATGGATTTTCGATTGGTCTCAAGGCCTCGATCTGAAACAGCAAAATGTCTCGGACTCAGGAGACACTCTGGGCGCGCTAAGC 5940
 V L L M D F D W S Q G L D L K Q Q M S R T Q E T L W A R L S

CACAGCCAAGTGAATGGCGTTGAAGTGATGCGCGAGTTGGCAAAATACCGCAAGCTCAAAATCAGCTGACAGAGCAAGAAGCGGCATTA 6030
 H S Q V N G V E V M R E L A K Y R K A Q N Q L T E Q E A A L

CCCATGACTCCGGTTGTTTTACTAGCGTGCTTGGTATGTGATGGATGGTATGGACATTGAAAAAGCCATGACCCATCTATTTGGTGAT 6120
 P M T P V V F T S V L G M S M D G M D I E K A M T H L F G D

CCTGTTTACGTGCTCAGTCAAACGCCCTCAAGTTTGGTTGGATCATCAAATCATGGAAGTCGATGGTGAGCTTAAGTATCACTGGTATTGC 6210
 P V Y V L S Q T P Q V W L D H Q I M E V D G E L K Y H W Y C

ATGGATGGCGTCATAGCTCCGGATGTGATTGACGAGATGTTGCCCCAATACGCTCAATGGTTGGATGAAATTGCCCAAGCACCTGACAAT 6300
 M D G V I A P D V I D E M F A Q Y A Q W L D E I A Q A P D N

TTCCAACGAAACCTATTGATTTACCAAGTTGAGCCAACGTCTTATGCGGCGACTCTCCCTGAAATTAATCCAGCGGTTGAAAAAGAAGTA 6390
 F Q R N L L I S P V E P T S Y A A T L P E I T P A V E K E V

ACCAGCGCTTGGTCTACTTGGAGCACCAAGCATTGGCAGGTCTTTGGGCAACCTGCGTCAGCACCACCTGTTTACTCAGCCTGAGCAG 6480
 T S A W S Y L E H Q A L A G L W A T L R Q H Q L F T Q P E Q

CGTTTCAGCCATTCTCACGTTGTTCAAGCGCTGAGTGCTGCGCCAAACATCATAAATTAAGTCCCTGCTGTGGCTAGACCAATTAGTTAGA 6570
 R F S H S H V V Q A L S A A P K H H K L V L L W L D Q L V R

GAAGGTCTACTTCAGGTAGAGGATAACCTCTACGCGTGGCAGGGAAACGAGCTCGCTGCATCACTGGTGAATTTGCCAACAAAACTGG 6660
 E G L L Q V E D N L Y A W Q G N E L A A S L V E L P N K N W

TGCCAGCAGTTATCCCACTATCTCGCTACGTCACCTCAAGCGCACAGTGAGTTATTAGGTGGCCATATGTCAGCGCTCGAGATCTTGTGT 6750
 C Q Q L S H Y L A T S L Q A H S E L L G G H M S A L E I L F

CACATAGAGCACTATCGCTTTACCGACATTTGCGACGCATTTTGAATGAGGCCAAGCAATCCTTAGCAAAATACAGCCAAGTTAACTTG 7020
 H I E H Y R F T D I S H A F L N E A K Q S L A K Y S Q V N L

GGCTGGCTAGATATCAACCTTGATATCGAACCGAGGCTACACGTTGCTGATGGCTACGATGTCAATTGTCGCTGTTAACGTTCTCCATGAT 7110
 G W L D I N L D I E P E L H V A D G Y D V I V A V N V L H D

GCTACAGATCTACCCAAAACCTTAGCTCGTCTAAACGCTGCACTCGCCGCAAAACGGGCATCTACTACTTATCGAAGCAACCGACCGAT 7200
A T D L P K T L A R L K R A L A A N G H L L L I E A T D Q Y

AGCTCGATGCAACTGGCGACAGTTGGCTTTATTGAGGGAATCAACGCCCTTTAGCGATTTTCGTTGCCAAACAGGGAGTGCGATGCTCAAT 7290
S S M Q L A T V G F I E G I N A F S D F R C Q T G S A M L N

GCTACAGACTGGCAGTCCCTACTTGATCAGCAAGGCTTTGCAACTCAGTGCCGTTACCCAGACAGTGACAGCTCGGTATTACGTCAACAT 7380
A T D W Q S L L D Q Q G F A T Q C R Y P D S D S S V L R Q H

TTATTCTTGGCTCAGGCCAAGAATAGTCAGGCTTTGGTCGCTAAACCTTCTCTATCGCTATCCATTGAGAATGACGAGGTTACGCAACT 7470
L F L A Q A K N S Q A L V A K P S L S L S I E N D E V H A T

ACTGCAGAACTAAAAAGCATACCGGAGCAAGATCAACGCCTGTCACTCATTACGCAAAATTTGGTCATCAATACTCCAACAAGAGGTCGTT 7560
T A E L K S I P E Q D Q R L S L I T Q I W S S I L Q Q E V V

CTGGATACCGATTTCTTCCAAAGTGGCGGCACAGTCTGATGGCGACCAAAATGATTGTCGAGGTCAATAGCAACAACCCGATCAAGTC 7650
L D T D F F Q S G G D S L M A T K M I V E V N K Q Q P D Q V

AGTTTGCAACAGATATTCGAGCACCCAAACGCTCAACAGTTCTGCCAAGCATTAGCGGAGAGTGGTGAGGCTAACCCCTGTGATGCGGCA 7740
S L Q Q I F E H P T L K Q F C Q A L A E S G E A N P C D A A

ACAGAGCGTCAAAATGAGATCAGAGAGATAGAACACATCTGGCAGCAACTGCTCGATCAAAACCATCAACCCCGACACGGACTTCTTCCAA 7830
T E R Q N E I R E I E H I W Q Q L L D Q T I N P D T D F F Q

TCTGGTGGAGACAGCCTGATGGCGACCAAGTTGATCGTTCAACTCCAGCAAGTCGGTTTTGAAAGCGTAACACTGCAACATATCTTTGAG 7920
S G G D S L M A T K L I V Q L Q Q V G F E S V T L Q H I F E

CACCCGTTTTTACCAACTTCTGTCAACAGTTGTTTAAACAGATATCGATTCAACCAATCAACAGTATGAGGCGAGTCGAGACTACCCA 8010
H P V F T N F C Q Q L F K Q D I D S T N Q Q Y E A S R D Y P

CTCACTCCACTGCAAAACGCCATTTGGCTTGGTGAGAGCCGCTTTTCTCACTCGGCCAAGGCATCGCTCATTTTTATGCTGAGTTAGAA 8100
L T P L Q N A Y W L G E S R L F S L G Q G I A H F Y A E L E

ATCAAAAGACCTAGACTGCGCCGCGCTTGTGATGGCTGGAATCGTCTGGTCAGCCACCATGATCAGTTACGCGGAGAAGTCCGCGAAGGA 8190
I K D L D C A A L V D G W N R L V S H H D Q L R G E V R E G

CACTATTGTATTTTGAACAAGTACCTCACTATGAACCGAGCTATGTTGATCTCTCCAGCAGCAGGAGTCCGACACAACACAATACCTTA 8280
H Y C I L Q Q V P H Y E P S Y V D L S S S S E S D T T Q Y L

GCCCCAGCTCGCAACCGAATTCGCACTCAAGGTGTGTCTACCGATCGTTGGCCTCTGTTTCGACATCAACATCATCCGCATAGATGAAGAG 8370
A Q A R N R I A T Q G V S T D R W P L F D I N I I R I D E E

ACCCACCTACTTCATCTCGTATTGATTTAGTGGTAGCCGACGGAAGAGTCTCAATTTGCTGTTCCAACAATGGCAACAGCTGTATCAA 8460
T H L L H L V I D L V V A D G K S L N L L F Q Q W Q Q L Y Q

GATCCCCTACGCACTTGTATACACCGCAATTAAGTGTGCTCAATACCTAGAGAAACAAAGCAGAGCAAAAGTGTGATGAAGATGGGTTA 8550
D P A T H L D T P A I T V A Q Y L E N K A E Q S A D E D G L

GCTGCTCAACAACTACTGGAATCAACGCCTGCCAACCTCCCTGATGCCCTGCACCTCCATTAGCAGAGACAAGGGGAGAGCTTTTAGAT 8640
A A Q Q Y W N Q R L P T L P D A P A L P L A E T R G D V L D

CAAGGCGTATTTACCATAGTCTATCTGCTGAGCGCTGGAATCAACTGCAACATCAAGCATTTAGCCATAATGTTCTGCCTTCCATGGCA 8730
Q G V F T H S L S A E R W N Q L Q H Q A F S H N V L P S M A

ATGCTTGCCACATTTCTGCTTAGTACTGCGCCGCTGGAGTGAGACAAAACACTTTTTCATTGAATGTCCTGCACGGCAATCGACCGCAAGT 8820
M L A T F C L V L R R W S E T K H F S L N V L H G N R P A S

AGCCCTGAAATCGCCAATCTGGTAGGAAACTGTCAACCCACATCAATGTTAGAGGTGGATGTATGTGAAGAGCCGGCGTTACTTACTCTT 8910
S P E I A N L V G N L S T T S M L E V D V C E E P A L L T L

ATCCAACAAATTCAGCAGCGAATGTGAGACGACCTAGCGCACGCTCAGTTTGATGGTCAGGATGTATTAACGGAGAAAAACCGACTCAAT 9000
I Q Q I Q Q R M S D D L A H A Q F D G Q D V L T E K N R L N

CGTAACCTTACGCGCCGGTATGCCTGTTGTGTTCAATGATACAACCTCTGTTGGTCAACACAGCTCACTCACTTTAGGAACGCTGCGTGAC 9090
R N F S A G M P V V F N D T T S V G Q H S S L T L G T L R D

TTTGGTGCTCAAACACCATGTTTACCTAGATGCGATGTTAATTTCTCAACATGCGGTGGGGTCGACATCAAAATGGACGGTGACGAT 9180
F G A Q T P H V Y L D A M L I S S T C G G V D I K W T V Q H

GGTCACCTTAAGTCAGGCGTGTGATGCCATGTTCCACGCTATATCAATGCCGTGGAGTCACTGCCGACTCGCAACTGGCTTGATGTT 9270
G H L K S G V F D A M F H A Y I N A V E S L P T R N W L D V

CTTTGCTCAACCTGCCTCAAGCGCAGCAGAAACGCCAACATACACTCATATTTGTCAGACGGAAGCGTCGCCCTATTCAACACCGCAA 9360
L C L N L P Q A Q Q K R Q Q Y T H I V Q T E A S P H S T P Q

ACGCTGCTTGATATGATCGCTGAGGGGGTCAATAAATATCCCGACAACTTGTATTCAACAGGTGAGCTTTTACTGACCTATCAAGAC 9450
T L L D M I A E G V N K Y P D N I A I Q Q G E L L L T Y Q D

GTTGGGCGCCTCAAAGCACTTGCATCGCAGATTACCGCACAAAATGATGACGCGCGTTTAATCGCTGTTGTGATGGACAAAAGTTGG 9540
 V W R A S K A L A S Q I T A Q N D D A R L I A V V M D K S W

CAGCAAGTGGTTGCGGTGATTGCAATATTAAATGGCAGGAAAGGCCATCTACCTATTGATGCTACGTATCCTCAAGCGAGAAATTGATGCC 9630
 Q Q V V A V I A I L M A G K A Y L P I D A T Y P Q A R I D A

TTGCTCGAACAGGAGAAATCACCCAAAGTCGTTGCACAAAAGAGTTAGCGAAACAACCTCAAACCATACCACGTGCTAACGCCATCTCTC 9720
 L L E Q G E I T Q V V A P K E L A K Q L K P Y H V L T P S L

GACCAGCAAGATATGGCTACATTCCAGCCCCGTGACGCTACATCCAACCGATTTAGCCTATGTCATCTTTACGTCTGGCTCTACTGGGCAA 9810
 D Q Q D M A T F Q P L T L H P T D L A Y V I F T S G S T G Q

CCAAAGGGGTGATGATGGATCATCAAGCGGTTATCAATACCTTAGTAGATATTGAAGCTCGCTTGAATCTCAATGAGCAAGACAAGGTG 9900
 P K G V M M D H Q A V I N T L V D I E A R L N L N E Q D K V

TTGGCAATCTCAGCCCTCAATTTTGACTTGTCCGTGTTTGATCTGTTCTCGACTTTGCAATTGCGGTGCGTGCTTAGTGATACCTGAGATA 9990
 L A I S A L N F D L S V F D L F S T L H C G A C L V I P E I

TCTCCAGCTCAAGATCCCGACGGCTTAATCACACTGGCTGAACAAGCGCAGATCACCATATGGAATAGCGTCCCCGCTTTTGCTCAGCTA 10080
 S P A Q D P D G L I T L A E Q A Q I T I W N S V P A F A Q L

TTGACGGATGGCTTGAACCTCTGCAACACAGCTCTGCCCTCTTTCGTAACATAATGATGAGTGGTGACTGGATCCCGGTATCACTACCG 10170
 L T D G L N S R N T A L P S L R N I M M S G D W I P V S L P

GATCAGCTCAATCTCGTTGCTCTAACGCTAAGCTACTTAGCCTTGGGGCGCTACAGAGGCCGCTATTTGGTCAATTGCTATTCGATC 10260
 D Q L N L V A P N A K L L S L G G A T E A A I W S I A Y S I

AAAGGCGCTATGTGCATCGAAGTAGCATCCCTTATGGGCAACCGCTAACAAATCAAAGCTTTTTCTTCTAGACAGCGAACTTAATCCA 10350
 K G S Y V H R S S I P Y G Q P L T N Q S F F V L D S E L N P

TGCCAGATTGGTTACAGGTGAGCTATATCGGCGGTTTAGGGTTATCACTTGGCTACTGGCAAGATGAAGCCAAAACAGCTGCCGCC 10440
 C P D W V T G E L Y I G G L G L S L G Y W Q D E A K T A A A

TTCATCACTACCCCGCAGAGTGGCGAGCGGTTATATAAAACCGGCGATCTGGGACGTTATCAATCTGATGGCAACATAGAGTTTTAGGC 10530
 F I T H P Q S G E R L Y K T G D L G R Y Q S D G N I E F L G

CGTAATGATCATCAAGTGAAGATCAACGGCTATCGAATTGAGTTAGGGGAAGTGGAAAATACCCTTGTCTATTGCCAATCAGCGGATTA 10620
 R N D H Q V K I N G Y R I E L G E V E N T L R H C P I S G L

GAGGAGCGTCTTCAAAGCGTGATCGCTGCGCCGATTAACCGTTGAAGATGGAAGCGCGGCTTGGTGCCTACACTGTCTGCTCCAGCGC 10710
 E E R L Q S V I A A P I T V E D G S A R L V A Y T V C S Q R

CAAGCTCAAGACACAGAGCAGCTACTCCAATATGCAAGGCAGACTCTGCCGACCTATATGTGTCAGTACAGATAGTCCACTTGACTCC 10800
 Q A Q D T E Q L L Q Y A R Q T L P T Y M C P V Q I V P L D S

ATCCCATTAACAATAAAGCGCAAGTAGATCGAAAAGCGCTGCGCTGCGCCTAAGATTGAGATCAGTGTGACGCGCGCCCTCCATTAACC 10890
 I P L T I N G K V D R K A L P A P K I E I S V D A R P P L T

AGCACCGAACAGCAGATTGCTCAGATCTGGGATGATTGTTTCAACAGTCTGCCACCCCGGCCAACCAAGCTTCTTTGAGCTAGGAGGC 10980
 S T E Q Q I A Q I W D D C L Q Q S A T P A N Q S F F E L G G

AACTCATTGGCGGCAGTACGTGTGATTAGTCAATCAATACAGAGTTAGGCGCGCAACTGACTGTTGGGCAAGCTCCAGTCTCATGACACC 11070
 N S L A A V R V I S R I N T E L G A Q L T V G Q L Q S H D T

ATTGAACGCTTAGCCTCTATTCTTGAAGCAATTTCGGTGATGATGGCTCAAGCCAGTGTCTCTTACCTCGGCTGAGCACCAGCTCCCT 11160
 I E R L A S I L E Q Q F G D D G S S P V L L T S A E H Q L P

GCTCTATTTATCGTCCATCCAATAGGGGGGCACCTTACTCAGTTACCGACCTCTCGCCCAACCTTGAATCAGGTTAGCTTATACGGATTA 11250
 A L F I V H P I G G H L L S Y Q P L A Q H L S Q V S L Y G L

GCCTTCCCGAATATGGAGACAGACCAAGAGTCATGGGATGTGCGAGCAGCTAGCCAGTACTATATCGAGCAAATTAGAGCATTTCAGCCA 11340
 A F P N M E T D Q E S W D V Q Q L A Q Y Y I E Q I R D I Q P

CACGGGCCGTATCGCCTTGTGTTGGTCAATTCGTTGGTATCGTCTGTTATGAGATGGCCTATCAACTCACCCAACAGAGCCTAGAGGTT 11430
 H G P Y R L A G W S F G G I V A Y E M A Y Q L T Q Q S L E V

GAAGCGTGATCTTAATTGACAGTTACAAGCCAAAGACTCGAAAGGAGGCGATGTCTGCTCAAGAGATACGTCAACCATTTCTATGCTGAT 11520
 E A C I L I D S Y K P T T R K E A M S A Q E I R H H F Y A D

GTTATTGGCCGTTTCCGCAACTTACTCAAGCGGATACCCAGATCTATCGACAGATTTCATCGCTTTGTGCCCATCTTTCCGCGCGCTTT 11610
 V I G R F P Q L T Q A D T P D L S T D S S L C A H L S A A F

AGCCAAATCGCCGTATCGATGATGTCACTACTGATAGCGTTTCAGCGATTACTCGACATATATCGCCACAACCTATCAGCCATGCTGTCA 11700
 S Q I A A I D D V T T D S V Q R L L D I Y R H N L S A M L S

TATGTGGTGCCAAACTTACACTCAGTTCCCACTACGCTGATAGCCGCAAGTCACAACAATCACTTGGACTTTATGAGTTATCAAGATCCT 11790
 Y V V P N L H S V P T T L I A A S H N N H L D F M S Y Q D P

```

AAGATTGCACGCTGCGCTCATCATGGCTGGAAGACTATTGCGATCTAACCCCTTCATCAGTCAGTGGCGATCACTATACCTTGCTGCAA 11880
K I A R C A H H G W K D Y C D L T L H H V S G D H Y T L L Q

GAACCCACGTGAATCAACTGGCTAACACACTTGGTTCCCTTGCTTCAGTTGCGACCCAAGCAAGATTGGAGTTCGCAACCATCTACTACG 11970
E P H V N Q L A N T L G S L L Q F A P K Q D W S S Q P S T T

GAAACCCTAGAAAATGAATAG 11991
E T L E N E *

```

Figura VI.13.-Secuencias del gen *irp1* y la proteína Irp1 de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Se señala con un asterisco el codón de parada de la transcripción.

6.3.4. Caracterización de un sistema de biosíntesis de sideróforos mediada por NRPS en *P. damsela* subsp. *piscicida*

De acuerdo con las homologías que presentan las proteínas Irp2 e Irp1 de *P. damsela* subsp. *piscicida* pertenecen a la familia de las péptido-sintetasas no ribosómicas (NRPS) por lo que a continuación se procedió a identificar los diferentes dominios catalíticos mediante la localización de regiones similares a cada una de las subregiones de los dominios catalíticos descritos hasta la fecha en proteínas homólogas (Schwarzer *et al.*, 2003).

La biosíntesis no ribosómica de péptidos es un mecanismo en el que se forman enlaces peptídicos entre aminoácidos cuando éstos se hallan unidos al complejo multienzimático mediante enlaces tioéster. Dichos complejos forman líneas de ensamblaje multimodulares. Los módulos, a su vez, constan de regiones catalíticas cooperantes, funcional y estructuralmente semiautónomas, denominadas dominios. Los módulos de iniciación, elongación y terminación se diferencian, según su posición dentro de la cadena de ensamblaje y en función de su composición, en dominios catalíticos (Quadri, 2000).

El módulo de elongación es el responsable de la adición de un aminoácido a la cadena peptídica creciente. El dominio de adenilación del Módulo 2 (A2) selecciona y activa el sustrato aminoacídico, que posteriormente será fijado al dominio de tiolación del Módulo 2 (PCP2) que lo colocará en el sitio catalítico del módulo de condensación precedente C1. Un módulo de iniciación ha de tener como mínimo siempre los dominios A-PCP y uno de elongación C-A-PCP.

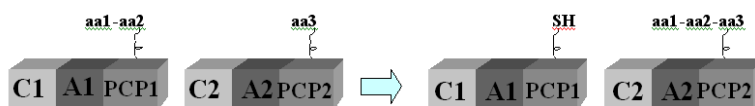
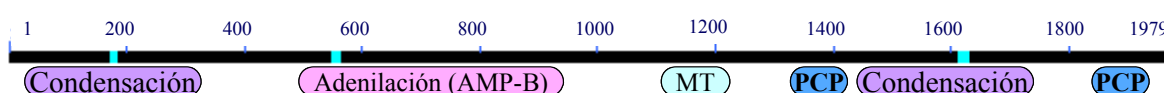


Figura VI.14.-Esquema que ilustra la biosíntesis del esqueleto peptídico de los sideróforos mediante NRPS. C, dominio de condensación; A, dominio de adenilación; PCP, dominio de tiolación.

Tras los ciclos de elongación necesarios, el proceso termina con la liberación del producto peptídico final (módulo de finalización). El orden de los dominios de adenilación, embebidos en las líneas de ensamblaje, acostumbra a ser colineal con el orden de aminoácidos del producto peptídico final. Los dominios se podrían describir como la caja de herramientas de los sistemas de síntesis peptídica no ribosómica y son fácilmente identificables mediante alineamientos de secuencia primaria, por la presencia de secuencias señal o núcleo, que imparten a cada dominio un patrón característico (Moffitt y Neilan, 2000).

Las proteínas Irp1 e Irp2 presentaron un elevado porcentaje de similitud con varios enzimas implicados en la biosíntesis de sideróforos y de antibióticos peptídicos, pero en la mayoría de los casos no se encontró similitud con la totalidad de la secuencia aminoacídica de éstos. En realidad, se observó que las diferentes proteínas homólogas se alineaban con Irp1 e Irp2 en función de su composición en dominios catalíticos.

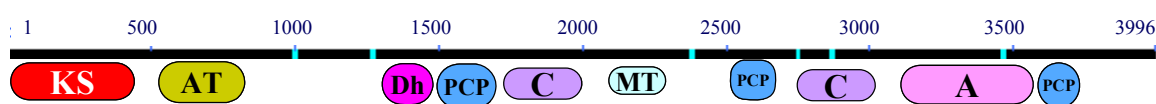
Irp2 resultó ser un enzima compuesto por seis dominios catalíticos (Figura VI.15). Dos dominios de condensación de casi 300 aminoácidos, uno en el extremo N-terminal y el otro próximo al extremo C-terminal de la proteína. Tras el primer dominio de condensación se sitúa un dominio de adenilación de unión de ATP de 404 aminoácidos seguido de un pequeño dominio de metilación de 96 aminoácidos, un dominio transportador de 63 aminoácidos del subgrupo de dominios transportadores, que precede al segundo dominio de condensación de 296 aminoácidos, y un último dominio transportador de 62 aminoácidos:



Dominio	Inicio	Fin	Long.
Condensación 1	30	329	299
Adenilación	512	916	404
Metil-transferasa	1112	1208	96
Transportador de Peptidil 1	1338	1401	63
Condensación 2	1420	1716	296
Transportador de Peptidil 2	1885	1947	62

Figura VI.15.—Predicción de los dominios catalíticos de la proteína Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida* realizada con el programa PFAM.

Irp1 es un enzima multimodular compuesto por 10 dominios catalíticos (Figura VI.16): un dominio amino-terminal cetoacil-sintetasa de 424 aminoácidos, seguido de un dominio acil-transferasa de 308 aminoácidos, un dominio deshidrogenasa de 163 aminoácidos, un dominio transportador de 67 aminoácidos precediendo otro de condensación de 299 aminoácidos, un dominio metil transferasa de 102 aminoácidos, un segundo dominio transportador de 63 aminoácidos seguido de otro de 43 aminoácidos, un dominio de condensación, un dominio de adenilación de 401 aminoácidos, un último dominio transportador de 64 aminoácidos, y un dominio tioesterasa de 255 aminoácidos (TE).



Dominio	Inicio	Fin
Cetoacil sintetasa	13	437
Acil Transferasa	538	846
Deshidrogenasa	1314	1477
Transportador de Peptidil 1	1571	1638
Condensación 1	1669	1959
Metil-transferasa	2291	2393
Transportador de Peptidil 2	2505	2631
Condensación 2	2665	2962
Adenilación	3147	3548
Transportador de peptidil 3	3634	3698
Tioesterasa	3720	3975

Figura VI.16.-Predicción informática de los dominios catalíticos de la proteína Irp1 de *P. damsela* subsp. *piscicida* realizada con el programa PFAM.

6.3.4.1. Dominios de activación del carboxilo o de adenilación

Los dominios de adenilación activadores de aminoácidos *AMP-binding* (A) de las proteínas Irp1 e Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida*, muestran 10 regiones consenso con un elevado grado de conservación en su secuencia respecto a los dominios A de otras NRPS, tal y como se refleja en las Tablas VI.2, VI.3 y VI.4.

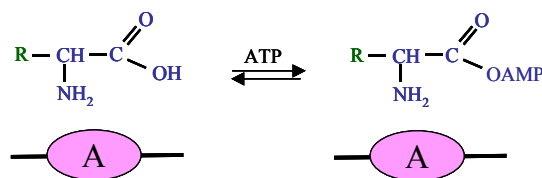
Tablas VI.2-VI.4.- Regiones conservadas en los dominios de adenilación de las proteínas Irp1 e Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida* identificadas según las secuencias consenso descritas por Schwarzer *et al.* (2003) y de otras NRPS de *V. anguillarum* (AngR), *E. coli* (EntF), *Pseudomonas aeruginosa* (PvdI), *Yersinia enterocolitica* (HMWP2), *Bacillus subtilis* (DhbF M1). ACVS (δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetasa) hace referencia al grupo de sintetasa no ribosómicas involucradas en la síntesis de diversos antibióticos.

	Región A1	Región A2	Región A3	Región A4
Irp1		LMAGKAYLPID	LAYVIFTSGSTGQPKG	FDLS
Irp2		LYAGGIYVPIA	TAYIIYTSGSTGTPKG	FDLS
EntF	FSYREM	VEAGAAWLPLD	TAYIIFTSGSTGVPKG	FDVS
PvdIM1	LDY AEL	LKAGGAYVPVD	LAYVIYTSGSTGKPKG	FDVS
PvdIM3	LDYITL	LKAGGAYVPVD	LAYVIYTSGSTGKPKG	FDVS
AngR	LDYITL	LYAGAIYVPVS	PAYIIYTSGSTGTPKG	FDLS
HMWP2	WNYHEL	LLAGAVYVPVS	PAYIIYTSGSTGTPKG	FDLS
DhbF M1	VNYRKL	LKTGAAYLPLD	PAYIIYTSGSTGRPKG	FDIS
ACVS	LSYTEL	LKSGAAYVPID	LAYVTYTS GTTGFPKG	FDFS
Consenso	LS/TYXEL	LKAGXAYL/VPI/LD	LAYXXYTS GT/STGXPKG	FDXS

	Región A5	Región A6 (15)	Región A7
Irp1	SLGGATE	GELYIGGLGLSLGYW	YKTGDL
Irp2	AMGGATE	GELWIGGVGVAQSYW	YRTGDM
EntF	NLYGPTE	GDLYLTGIQLAQGYL	YRTGDL
PvdIM1	NLYGPTE	GELYLAGRGLARGYH	YRTGDL
PvdIM3	NLYGPTE	GELYLAGRGLARGYH	YRTGDL
AngR	AMGGATE	GELWIGGDGIALGYF	YRTGDM
HMWP2	AMGGATE	GELWIGGIGVAEGYF	YRTGDM
DhbF M1	NLYGPTE	GELYIAGTGLARGYF	YRTGDQ
ACVS	NGYGPTE	GELHIGGLGISKGYL	YRTGDL
Consenso	NXYGPTE	GELX/VIXGXGLARGY/KL	YRTGDL

	Región A8	Región A9	Región A10
Irp1	GRNDHQVKINGYRIELGEVE	LPTYMCP	NGKVDR
Irp2	GRQDTQVKVGGYRIELGDID	LPPYMLP	NGKVDR
EntF	GRSDDQLKIRGQRIELGEID	LPPHMVP	NGKLDR
PvdIM1	GRIDHQVKLRGLRIELGEIE	LPEYMVP	NGKLDR
PvdIM3	GRIDHQVKLRGLRIELGEIE	LPEYMVP	NGKLDR
AngR	GRRDKQVKVGGYRIELGEIE	LPNYMVP	NGKVDH
HMWP2	GRRDKQVKVGGYRIELGEIE	LPNYMVP	NGKIDY
DhbF M1	GRADHQIKIRGFRIELGEID	LPDYMVP	NGKLDR
ACVS	GRNDFQVKIRGLRIELGEIE	LPAYMVP	NGKVDR
Consenso	GRXDXQVKIRGXRIELGEIE	LPXYMV/IP	NGKV/LDR

Los dominios de adenilación (A) reconocen selectivamente una gran variedad de sustratos (aminoácidos proteinogénicos, no proteinogénicos, grupos aril) y los activan mediante la transferencia de un grupo AMP formando el aminoaciladenilato o ariladenilato:



El estudio de la estructura de los dominios A ha permitido dilucidar el mecanismo de selección de sustrato. Se han definido 10 regiones núcleo conservadas (A1-A10) en todos los dominios A conocidos. Nueve residuos esparcidos entre las regiones A4 y A5 interaccionan con la cadena lateral del aminoácido incorporado. Las secuencias formadas por estos nueve residuos se agrupan en concordancia con la especificidad de sustrato del dominio de adenilación, permitiendo la predicción de selección de sustrato a partir de la secuencia primaria de un dominio de adenilación (Stachelhaus *et al.*, 1999; Challis y Ravel, 2000;).

Los dominios de adenilación y sus secuencias código desarrollan respectivamente una función análoga a las aminoacil-tRNA sintetasas y a los codones de la síntesis ribosómica (von Dohren *et al.*, 1997). Una diferencia crucial entre la biosíntesis de péptidos ribosómica y la no ribosómica es que ésta última tiene en general una menor especificidad en la selección de sustrato (Moffitt y Neilan, 2000).

La mayoría de los dominios de adenilación están inmersos en los módulos de las sintetasas, a excepción de los dominios de adenilación de los enzimas de arilación de péptidos, que son autónomos y catalizan específicamente la activación de grupos aril (por ejemplo EntE de *E. coli*).

Hasta hace poco no era posible asignar la estructura de un péptido sintetizado vía NRPS si únicamente se contaba con la secuencia de esta proteína. Recientemente, Challis y Ravel (2000), describieron un método que permite predecir teóricamente la elección de sustrato que realizará el dominio de adenilación de la NRPS, la cual vendrá dada en función de la secuencia de unas posiciones clave localizadas entre las regiones A4 y A5. Se procedió así a analizar la especificidad de selección de sustrato de los dominios de adenilación localizados en las proteínas Irp1 e Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Para ello, se llevó a cabo un alineamiento parcial entre las proteínas Irp2 e Irp1 de *P. damsela* subsp. *piscicida* y HMWP2 y HMWP1 de *Y. enterocolitica* (en las cuales se conocen, por estudios previos, los nueve aminoácidos que forman el sitio de unión al sustrato), de la zona comprendida entre las regiones A4 y A5 de los dominios de adenilación. Se incluyeron también en este alineamiento la proteína AngR de *V. anguillarum* y la homóloga de HMWP2 de *P. profundum* (Figuras VI.17 y VI.18).

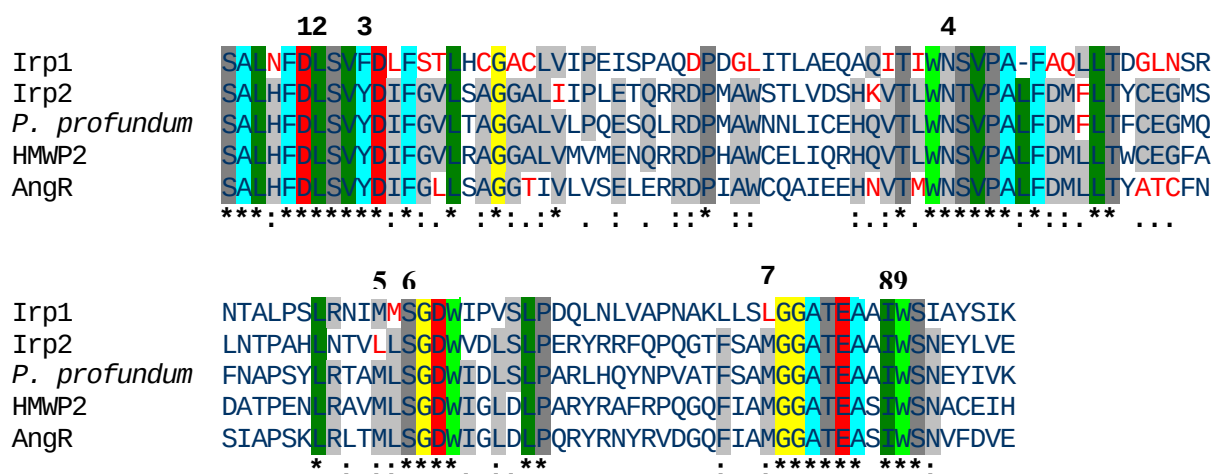


Figura VI.17.—Predicción de la especificidad de los dominios de adenilación activadores de aminoácidos basada en la estructura de HMWP2 de *Y. enterocolitica* (Stachelhaus *et al.*, 1999). La región mostrada es un alineamiento parcial de dominios de adenilación pertenecientes a las proteínas Irp1 e Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida*, Irp2 de *P. profundum*, HMWP2 de *Y. enterocolitica*, y AngR de *V. anguillarum*.

La identificación de estas nueve posiciones y su comparación con el código no ribosómico para los dominios de activación de los diferentes aminoácidos, nos permite predecir la especificidad del sustrato de los dominios de adenilación como se refleja en la Tabla VI.5.

Tabla VI.5.—Predicción de la especificidad del sustrato de los dominios de adenilación de Irp1 e Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida*, HMWP2 de *Y. enterocolitica*, AngR de *V. anguillarum*, GrsA (Gramicidina S sintetasa) de *B. brevis* y EntE y EntF de *E. coli*. Se muestra la variabilidad estimada de cada posición.

Número	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Dominio
Irp2	135	236	239	278	299	301	322	330	331	517	Cys
Irp1	D	L	Y	N	L	S	M	I	W	K	Cys
HMWP2	D	L	F	N	M	S	L	I	W	K	Cys
<i>P. profundum</i>	D	L	Y	N	N	S	M	I	W	K	Cys
GrsA	D	A	W	T	I	A	A	V	C	K	Phe
AngR	D	L	Y	N	M	S	M	I	W	K	Cys
EntE	D	L	E	H	N	T	Y	V	S	K	Ser
EntF	D	V	W	H	L	S	L	I	D	K	Dhb/Sal
Variabilidad	3%	16%	16%	39%	52%	13%	26%	23%	26%	0%	

Como se muestra en la Figura VI.17 el código no ribosómico de ambas proteínas presenta un elevado grado de similitud con la secuencia consenso de los residuos aminoacídicos que forman el sitio de unión específico para la cisteína (Cys), presente en diferentes dominios de adenilación que seleccionan y activan este aminoácido. En las Figuras VI.18 y VI.19 se marcan las posiciones inferidas de estos aminoácidos en Irp2 e Irp1 de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

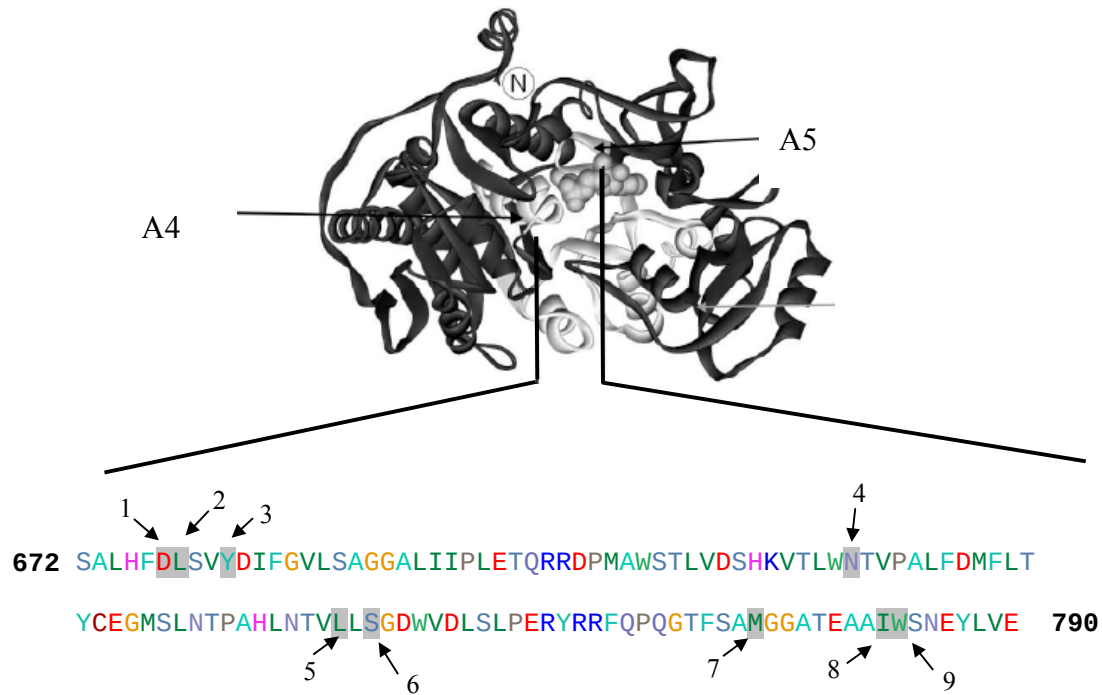


Figura VI.18.-Predicción de la especificidad de los dominios de adenilación activadores de aminoácidos de la proteína Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Se señalan con números del 1 al 9 los aminoácidos que forman parte del bolsillo de unión al sustrato (“binding pocket”) que se corresponden con las posiciones citadas en la Figura VI.17.

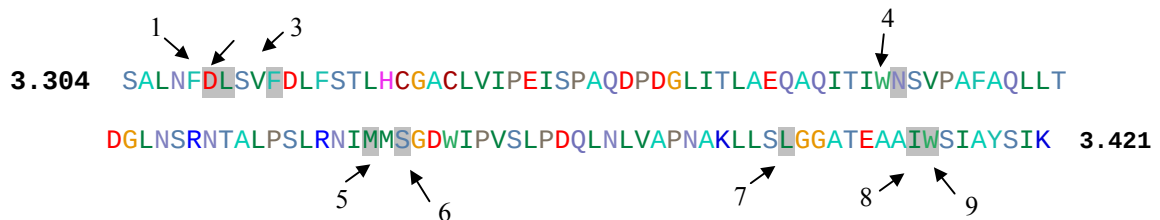
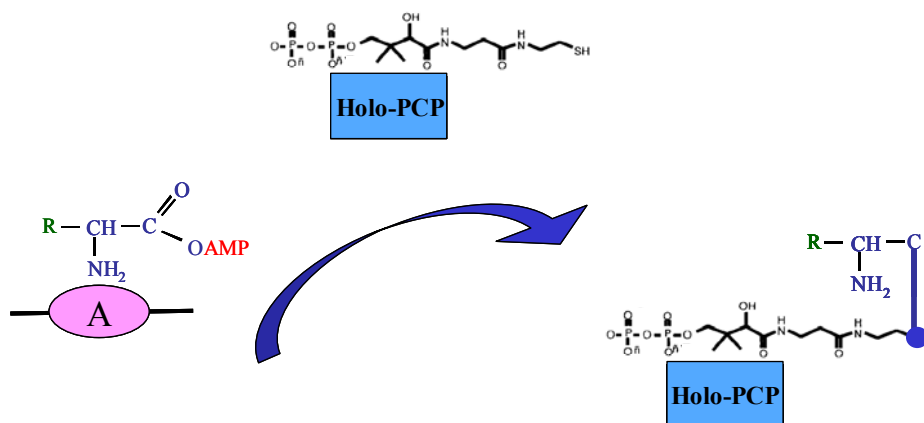


Figura VI.19.-Predicción de la especificidad de los dominios de adenilación activadores de aminoácidos de la proteína Irp1 de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

6.3.4.2. Dominios transportadores o de tiolación

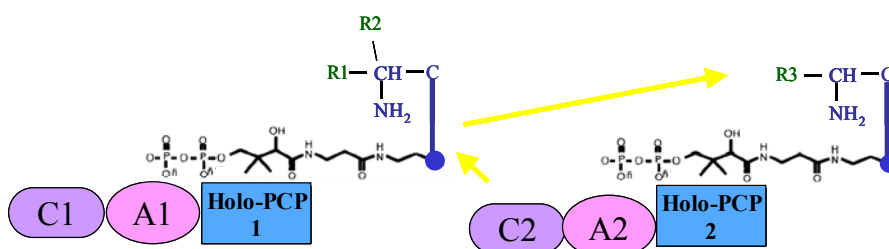
Para que los dominios de tiolación o transportadores del complejo multienzimático de síntesis sean funcionales es necesaria una modificación postraduccional previa: la adición de un grupo fosfopanteteínico a una serina del entorno F(F,Y)XLGG(H,D)S(L,I) *Phosphopantetheinyl binding* (PP) presente en dichos dominios. Esta reacción la cataliza una fosfopanteteinil transferasa (por ejemplo, la proteína EntD de *E. coli*) (Gehring *et al.*, 1998), que aparece frecuentemente codificada en las agrupaciones génicas de biosíntesis y transporte de sideróforos (von Dohren *et al.*, 1997).

En las proteínas Irp1 e Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida*, se localizó en cada dominio transportador la secuencia consenso descrita, que constituye el presunto sitio de adición del grupo fosfopanteteinil (Figuras VI.23 y VI.24). Los dominios transportadores son los encargados de fijar los intermediarios biosintéticos activados, ya sean anillos aril, aminoácidos/intermediarios peptídicos, o ácidos carboxílicos, (y, según eso, se les denomina dominios transportadores de aril (ArCP), peptidil (PCP), o acil (ACP)) y después posicionarlos en el locus aceptor del dominio de condensación, tal y como se describe a continuación:



6.3.4.3. Dominios de condensación

Los dominios de condensación (C) se localizan generalmente en el extremo amino-terminal de los módulos y es el sitio donde se cataliza la formación del enlace peptídico y la translocación de la cadena creciente:



El dominio C es sustituido en ocasiones por el dominio de ciclación Cy, que además de catalizar la formación del enlace peptídico tiene la función de heterociclar el aminoácido correspondiente, formando así el anillo de tiazolina o de oxazolina, y el aminoácido ciclado puede ser una cisteína, una serina o una treonina. En el caso de Irp1 e Irp2 se localizaron algunos de los dominios de ciclación realizando alineamientos con las secuencias consenso descritas para éstos que se muestran en las Figuras VI.23 y VI.24 (Crosa and Walsh, 2002).

6.3.4.4. Módulo PKS

La actividad β -cetoacil-sintetasa está relacionada con la producción de diversos compuestos heterocíclicos en los microorganismos, como antibióticos o compuestos antitumorales, mediante sucesivas condensaciones de grupos, generalmente acetato y propionato, previamente activados por las llamadas policétido-sintetasas (PKS) (Donadio *et al.*, 1991).

En la proteína Irp1 de *P. damsela* subsp. *piscicida* se localizó un dominio cetoacil-sintetasa (KS) en el extremo N terminal seguido de un dominio acil-transferasa (AT), un dominio deshidrogenasa (Dh) y un dominio de transporte probablemente de grupos acilo (ACP). Todos estos dominios posiblemente constituyan un módulo PKS típico ya descrito en otras bacterias (Crosa y Walsh, 2002).

En Irp1, se localizaron residuos conservados con respecto a otras proteínas con actividad β -cetoacil-sintetasa, como los que forman parte del sitio catalítico conocido como “bolsillo de unión al sustrato” que se muestran en las Figuras VI.20 y VI.24.

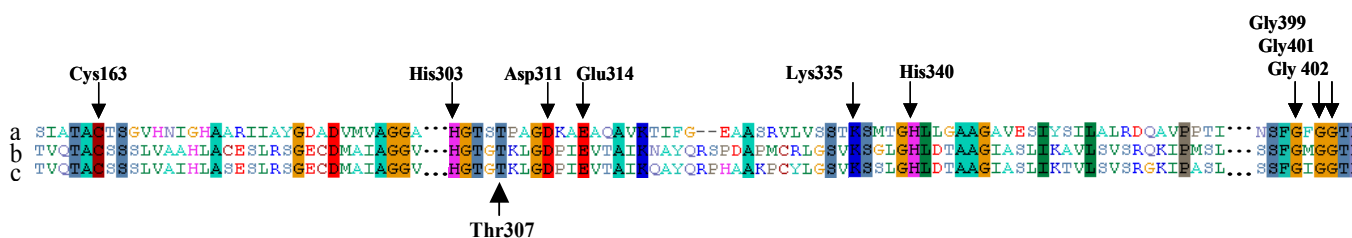


Figura VI.20.-Alineamiento de los dominios cetoacil-sintetasa de las proteínas EntF de *E. coli* (a), Irp1 de *P. damsela* subsp. *piscicida* (b) y PKS (Irp1) de *Photobacterium profundum* (c).

El sitio activo de este dominio se ha asignado en varias cetoacil-sintetasas a la denominada cisteína 163 (Cys 163) que se ha propuesto como residuo nucleófilo de la reacción catalítica. La histidina 303 (His 303) parece tener importancia guiando el sustrato hacia la Cys 163, y por su localización podría estar implicada en la

decarboxilación y estabilización del malonil-ACP. Dos residuos ácidos (Asp 311 y Glu 314), y un residuo básico (Lys 335) parecen tener importancia a la hora de garantizar la correcta geometría del sitio activo. La Hys340 aparece conservada de modo muy estricto en las secuencias de estas enzimas, y parece incrementar la actividad nucleofílica atribuida a la Cys163. La flexibilidad de la proteína estaría asegurada por los residuos invariables Gly 399, 401 y 402 (Huang *et al.*, 1998). La Thr 307 podría formar una zona de unión para los grupos hidroxilo y fosfato del grupo fosfopanteteinil de los sustratos del dominio PCP.

6.3.4.5. Otras reacciones de modificación

Además de la gran variedad de aminoácidos seleccionados por los dominios de adenilación, las líneas de ensamblaje de péptidos no ribosómicos tienen la capacidad de aumentar la diversidad del producto final modificando dichos sustratos durante, o una vez finalizado, el proceso de elongación. Dichas modificaciones son posibles gracias a la acción de una gama de dominios de modificación que pueden actuar en *cis* si están insertados en los módulos, o en *trans* si actúan como subunidades separadas (Walsh *et al.*, 2001).

Dominios metil-transferasa

Se identificaron dos regiones con homología a dominios de la familia metil-transferasa dependientes de SAM (S-adenosil-metionina), uno en la proteína Irp1 y otro en la proteína Irp2 que se señalan en las Figuras VI.23 y VI.24. Este hecho sugiere que en algún paso de la ruta de biosíntesis del sideróforo de *P. damsela* subsp. *piscicida* se produce la metilación de la molécula nascente, probablemente de modo similar a lo que ocurre en la formación de la yersiniabactina y la pioquelina (Crosa y Walsh, 2002).

6.3.4.6. Dominio tioesterasa (TE)

La proteína Irp1 de *P. damsela* subsp. *piscicida* presenta en su extremo C terminal (Figura VI.24) una región altamente homóloga a proteínas del tipo de las tioesterasas, presentes en prácticamente todos los operones descritos que codifican NRPS. Estas proteínas suelen tener una masa molecular de unos 25-29 kDa, poseen una secuencia GX SXG, que presumiblemente constituye su sitio activo, y están involucradas en la terminación y liberación de la cadena peptídica. La liberación de la

cadena implica la transferencia entre dominios, concretamente desde el dominio PCP hasta la cadena lateral hidroxilo de la serina del sitio activo de los dominios tioesterasa, para generar un intermediario enzimático acil-O-TE. Dicho intermediario puede tener dos destinos: la hidrólisis intermolecular que liberará un sideróforo lineal con un grupo carboxílico en el extremo carboxilo-terminal (yersiniabactina, pioquelina), o la captura intramolecular mediada por un nucleófilo hidroxilo o amina de la cadena peptídica que liberará un sideróforo cíclico (enterobactina, bacilibactina) (Figura VI.21) (Crosa y Walsh, 2002).

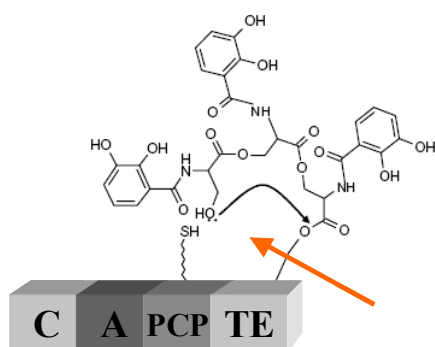


Figura VI.21.-Ensamblaje del sideróforo Enterobactina. Macro ciclación y liberación de la molécula mediante la formación del enlace éster. C-dominio de condensación; A-dominio de adenilación; PCP-dominio de tiorilación; TE-dominio tioesterasa (Quadri, 2000).

Como se muestra en la Figura VI.22, la zona GX SXG, se localizó en la proteína Irp1, mediante alineación con tioesterasas procedentes de diversos organismos.

Irp1	<i>P. damsela</i> ssp. <i>piscicida</i>	3787	LAGWSFGGI
SrfA-TE	<i>Bacillus subtilis</i>	79	LFGHSMGGM
GrST	<i>Bacillus brevis</i>	88	FLGHSMGAL
Tyc-TE	<i>Bacillus brevis</i>	73	FFGHSMGGL
CmaT	<i>Pseudomonas syringae</i>	89	FYGHSFAG
Bap1	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	84	LFGDCMGAL
Bap2	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	96	LFGHSMGAV
DFAT	<i>Anas platyrhynchos</i>	83	LFGHSGSF
RFAT	<i>Ratus norvegicus</i>	94	FFGHSGSY
SrfA-C	<i>Bacillus subtilis</i>	1112	KNGGSDGLQ
GrSB	<i>Bacillus brevis</i>	4263	LIGYSSGN
TycC	<i>Bacillus brevis</i>	6313	LMGYSSGN
AcvA	<i>Penicillium chrysogenum</i>	3624	FIGWSFGGI
PvdD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2238	LAGWSLGN
EntF	<i>Escherichia coli</i>	1131	LLGYSLGGT
DEBS3	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	3032	VAGHSAGAL

Figura VI.22.-Alineación de los motivos GxSxG de diversas tioesterasas (Schneider y Marahiel, 1998), y su análisis comparativo con la secuencia respectiva de la proteína Irp1 de *P. damsela* subsp. *piscicida*.



MCELYSVH I PQRATLLS QKRPLH PFCMT [DGQ PFPMPVQH AYYVGRSPNQPLGGNGCHL 60
 RD1-Cy1
 YQEFD AEKLD PDHLEQALNT LLERHPMLR VAFQNDGMQRWLAPTAPLKVIRHNLTNATEE 120
 Cy2
 EVENTLLDLRARLSHRPLNVQDGGQTIEFHCSLLPQNR CRVHASIDLLVMDAASFSLFFNE 180
 LLLLLQGMQLPPLTKHYDFCSYLAQEKIELSASRRAAATFWAEQIDSLPTAPKLP LAQEP 240
 RD2-Cy3
 NQIGKPQFHRRSHILSQQQWATFQHHA STNQITPTMMLATAYS AVLSRWSGQTDLL LNLTL 300
 Cy4
 LFDCHSFND DVQHLLADFTNILL LDMHLEEK] SIVELAQA HQRFADIYEHRHHS GVEVLR 360
 RD3
 Cy5
 QLKKQGTHPHGAPIVFTSNLNRSLFGNDLASPLGQPGWGISQTPQVWLD FVASKHQEGIL 420
 RD4 RD5
 LQWDSVDTLFPAGFIDTLFTAFIHCIEHLVSDDANWAQPLDLLPEQQKQQRKRTPAPT 480
 TLPEGLLHERIFAYADHYPARLAMVHNEQMF [SFESLIYRAKCLANTLINAGLEKDERVAI 540
 A2
 SMEKGPGQVIAALAILYAGGIYVPIAPDQPI LRRQAIIDSANIRFVLR CQTTL SHYEWS 600
 H1
 A3
 ATHFEWQDASHSPLQSSPHQCAPTDTAYIIYTGGSTGTGKV VVISHLSALNTCIDINQRH 660
 Bucle-P
 A4
 QINENDRVLSLSALHFDLSVYDIFGVLSAGGALIIPLETQRRDPMAWSTLVD SHKVTLWN 720
 A5
 TVPALFDMFLTYCEGMSLNTPAHLNTVL LLSGDWVDLSLPERYRRFQPQGTFSSAMGGATEA 780
 A6
 AIWSNEYLV EQVAEHWRSIPYGYPLSNQAYRVVDSAGRDCPDWVVGELWIGGVGVAQSYW 840
 A7 A8
 NDPERTA AHFVEDNDSITGQHQRWYRTGDMGCYWPDGTLEFLGRQDTQVKVGGYRIELGD 900
 hth
 IDAALNRIEGVRHGVS] LALSTQGGKDRQLEAFVVTEGYSLCEVATPAANLPNSYKDLFPT 960
 NSTAADQLETDQVARFLQNH LFATISANQEP CSPETLSHSYGVIEVYQPLFSQWWSLLCQ 1020

MT	HDLATQLESAYQLKAPVTAYPNEFETAADFTQASELLKAIMTGDTSANALLDSPLSPEAL	1080
	LTQNPAFQDQIIAISNAVSQQLSSQLGRPVIL [TEFDSRSGRVAEALLEVCGSKTVEYHAID	1140
	ASLSLVQSATDRLSRFSHAHVHHWDGNDQPPLCAKCDIVLINNVLHRVTKPQNVLSNAQK	1200
	LATSQGLM]IVLEISTLEDGALISAQVIQPELSTLPTQSELLSLFENNALRVEQILDHSPF	1260
PCP1	IGYVLRNQSPVLIANSERLKAKLSEHLPPYMLPKRIHFLSSLPLSANGKVDRKQLSQHGA	1320
	PADEKSSLDSPQLTDNE [RIVAQVWRSLFPKQAINRASDFFLLGGDSL MATRCIGELKKLG	1380
	YIGDLTDLFTHTSLESFALKL]SPTKVQQQIEELIPNPEE [RYRPFPMNEVQAYWIQRQSG	1440
	FALGETSAQFFVEFRVAKFDASRFNHAINCLIERH DALRTVIRNHLQQVLIYVPAFSIRC	1500
C1	HSFADIDCDKANQLCTELSHRVNDPAFWPLFTA EAIVSPNQSDARLCIGLDNMMLDGLSM	1560
	QIFFSELEALYLNQVTLPELELTFRDVIQWQQAHRSPHAEQQAQSYWQTQLKAL PAAPA	1620
	LPLQADPATLSRTRFIRASETLSADEWQALKAQASQYQLTPSLVLMGAYAATLAAWGRQS	1680
	SLTLNLTLFDRPDVHPQIGQVLGDFTTLLLLLAWHSD]SSWLD SLKRLQNQLAQDLKH NKVS	1740
PCP2	AVWVMRELAKQQQLSSASM PVVFTSALGTSDGNFLSNKGWLK PVWGISQTPQVWLDHQVY	1800
	ESEGQLCLNWDAVEALLPQTLLEQMFGQYVELLKT LASQPQSWSTIDKLLSGDTPSLPS	1860
	PASYPTAQR LVP SIRQGEPEKI [QRIQAAFQQIVSAPIGENDNFFDAGASSLQLVQLHG	1920
	RLTQQGDTLSVTDLFTYPSPALLASSYLTSVE]QAKPNTDREQRQRQALRKLVRKRNVN	1976

Figura VI.23.-Proteína Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Se resaltan en amarillo los tramos altamente conservados de las zonas amino y carboxi-terminal de la proteína como RD₁₋₅. Se subrayan en rojo las zonas SBS predichas de unión de la fosfopanteteinil transferasa. H1 y H2, dominios hidrofóbicos. A1-A10, dominios de adenilación. Se señalan entre los dominios A4 y A5 en gris los aminoácidos que posiblemente seleccionen el sustrato a unir. Cy1-Cy5, probables dominios de ciclación. Los dominios A y Cy se buscaron siguiendo las secuencias consenso establecidas para éstos (Crosa y Walsh, 2002).

KS	MIMDNNNLYDNC [DPIAVIGMACRFPKAPNIDAFWHNLSNGLSGQSFFSDEELKTAGVDADVHQREHFVPS	70
	GAVIDNPEYFDASLFGYSPA EATSIDPQQRFLQNVWHALEHAGYAPTQAPSKTG VFGAVRSSTYPSFKA	140
	FDVTQVGQVKGLQALLGNDKDYLATRVAHKFNF TGP AFTVQTA C SSSLVAAHLACESLRSGECDMAIAGG	210
	VAVSFPQVSGYEQPGMIFSPDGLCRPF DQQANGTFGGHGVGSVVLKRLDDALNAGDTILAVLRGSAINN	280
	DGKEKVGFTAPSVNGQSQVLTEALHLADIRPDDVEMIEAHGTG TKLG D P I E V T A I K N A Y Q R S P D A P M C R L	350
AT	GSVKSGGLH L D T A A G I A S L I K A V L S V R Q K I P M S L N I S Q P N P E L Q L E G S G F T L A T Q T V D W L T P L R T A A A S	420
	SFGMGGTNC H M L V Q S S P] Q Q A R P E Q P A K K E R T Y I P L L L S A N S S K S L R Q L A Q S Y S S Y L N Q H P A A D N I A Y S A L	490
	SSRALDLPYRLAVTNMAHAESTLSAFAQSGEASSELTGVAQSRARL [AWTFTGQGSQFGGMGETWYHTSD	560
	AFRQSIDLSQSYCRDKLTAPLTEIMFGSNRDKLAHTDGAQVAIVAFELALAAHWQAKGLTPDVVLGHVSG	630
	EISACVVAGYLSHQAIELVIERGQQMHQCAQQHNGAMLAVFAPLGLTGIPALAKLDIAAHNGTAHWVF	700
Dh	SGDIQDKEQACHELEQANLTYRQLEVP C A A H S R H L D S M L D S Y T N F T R Q L T P T Q G R I T L I S G V T G K T I N S V	770
	NELNPDYWARHVRESVQFRPAIGQALALECQVFMEMGP K S H L T S I G R R E E W T S P S A W F H A E E D N I G C A L Y]	840
	TLGVDAPWKQVFNL TGQRCDLPLYVFDEQAYWVETE Q P I K A P Q L A D S E T T I I P P V D P M T L R C A V I Q D F L T	910
	SCVKQAPLSLINILRGGRILPRHRHHIRALLDLLVTQGYHKKGDVWLPSQSLLLPSADVVTQRWLAERS	980
	ADDMANVEQHCQQLLSLPQLPNLLRQLNHVATLEAQLAPLLTGQSFE SLPTQSNSSWQDLHANLTYQDW	1050
Dh	SLLSEQQDLPTAIHHQCSQLLPISQNV D L S V S D T Y P V K E L S R V A I C R L S K M W G Q D I Y D L R A Q A P Q G H W Q W	1120
	LARIQPQTANNDDSP E L L P S P H N R Y Q W Q A T P V E S D H Q I N S V T A E Q V T L A L T S T G T V H K I T P E Q G V I V L P A	1190
	TSLSEANTSESITQLAQTLSHSPDNLRIVVCGAIKVSANDDIAPLATALHSLIRVARTEYPNKQFFVLD T	1260
	NVSQPQQLAELLAAAPFSCYHDLAYRDSQYWAYQLKHAQTHGDSIPPWFNAQ [GAHLITGAMGGIGRLVI	1330
	RWLALSGVKHILALGRRQHADWTRFCCQMAEIGCQVETHLVDLAVDDELTRLLDQLAGKQPIAGAIHAAG	1400
Dh	NPHHGLIEQWDSSEAERLTRVKAQSFVTLYQWLEAQRKYLI GFSSVATLGAPQGGLYAAANAFIDGFAQ	1470
	SHQANRQ] C H V M S L A W G A W D R I G T T S S D S L I A Q L G Q Q G M H T I S P A E G L W H L S Q S L I M G T E H A F A M N V S P N P	1540

ACP	AQFAKHFRLESQSSNKPSTQPLPVEKIEIT [SWLQDRVRYQLGLAKNYRLEPQQD <u>LLQLGMD</u> SLQFLDLNA	1610
	AIQKQFNIKLTAEAYQTMTHGLEALI]NAKSQDSKPQSTLAFVQPDQ [KHQPFPLTPIQHAYWVGRESW	1680
Cy1	VPYGGIACNVVFEWDLSLAHFDIERLEAAWNALVQRHDMRLMSVLPTGEQIISAEVPSYSFTRHDLSDLT	1750
	DDAKANALEETRQIISKQVRPASQWPLFDVRISELTPCEYRLHMSLDLLQFDVQSFKIMMDDLSTRAYQGE	1820
	ALPALSLSFRDYVVEHESLKDQPEWQASWNYWNLIPSI <u>PKAPMLPLE</u> ENVADSHPTPTFVTRKGRLAKSHW	1890
	TKLKAHWQHAGITPSAGLLTLFSRLLAKWSQSAFTLNVTFNRPFFHHDVQDLI <u>GDFTSVLLMDFDWS</u>]Q	1960
MT	GLDLKQMSRTQETLWARLSHSQVNGVEVMRELAKYRKAQNQLTEQEALPMTPVVFTSVLGMMDGMDI	2030
	EKAMTHLFGDPVYVLSQTPQVWLHQIMEVDGELKYHWYCMDGVIAPDVIDEMFAQYQWLDEIAQAPDN	2100
	FQRNLLISPVETSAAATLPEITPAVEKEVTSAWSYLEHQALAGLWATLRQHQLFTQPEQRFSSHSHVVQA	2170
	LSAAPKHHKLVLWLQDLVREGLLQVEDNLYAWQGNELAASLVLPNKNWCQQLSHYLATSLQAHSELLG	2240
	GHMSALEILFKDHHVTDALYKTNPSLTLLNQGAANLITRLGEQKGAALKV [LEVAGAGTAATSTVILDHGAS	2310
	HIEHYRFTDISHAFLNEAKQSLAKYSQVNLGWLIDINLIEPELHVADGYDVIVAVNVLDATDLPKTLAR	2380
PCP	LKRALAANGHLLL]IEATDQYSSMQLATVGFIEGINAFSDFRCQTGSAMLNATDWQSLLDQQGFATQCRYP	2450
	DSDSSVLRQHLFLAQAKNSQALVAKPSLSLSIENDEVHATTAELKSIPEQDQRL [SLITQIWSSILQQEVV	2520
	LDTDFEQSGGDSMATKMIVEVVKQPPDQVSLQQIFEHPTLKQFCQALAESGEANPCDAATERQNEIREI	2590
	EHIWQQLLDQTINPDTEFFQSGGDSMATKLIVQLQQVGFE]SVTLQHIFEHPVFTNFCQQLFKQDIDSTN	2660
Cy2	QQYE [ASRDYPLTPLQNAYWLGESRLFSLGGIAHFYAELEIKDLDCALVDGWNRLVSHHDQLRGEVREG	2730
	HYCILQQVPHYEPSYVDLSSSESDDTQYLAQARNRIATQGVSTDRWPLFDINIIRIDEETHLLHLVIDL	2800
	VVADGKSLNLLFQQWQQLYQDPATHLDTPAITVAQYLENKAEQSADEDGLAAQQYWNQRLPTLPDAPALP	2870
	LAETRQDVLQDQGVFTHSLSAERWNQLQHQAESHNVLPAMMLATFCLVLRWSETKHFSNLVHGNRPAS	2940
	SPEIANLVGNLSTTSMLEVDVC]EEPALLTLIQIQQRMSDDLAAHQFDGQDVLTEKNRLNRNFSAGMPVV	3010
	FNDTTSVGQHSSLTGLTRDFGAQTPHVYLDAMLSSTCGGVDIKWTQVHGHLKSGVFDAMFHAYINAVE	3080

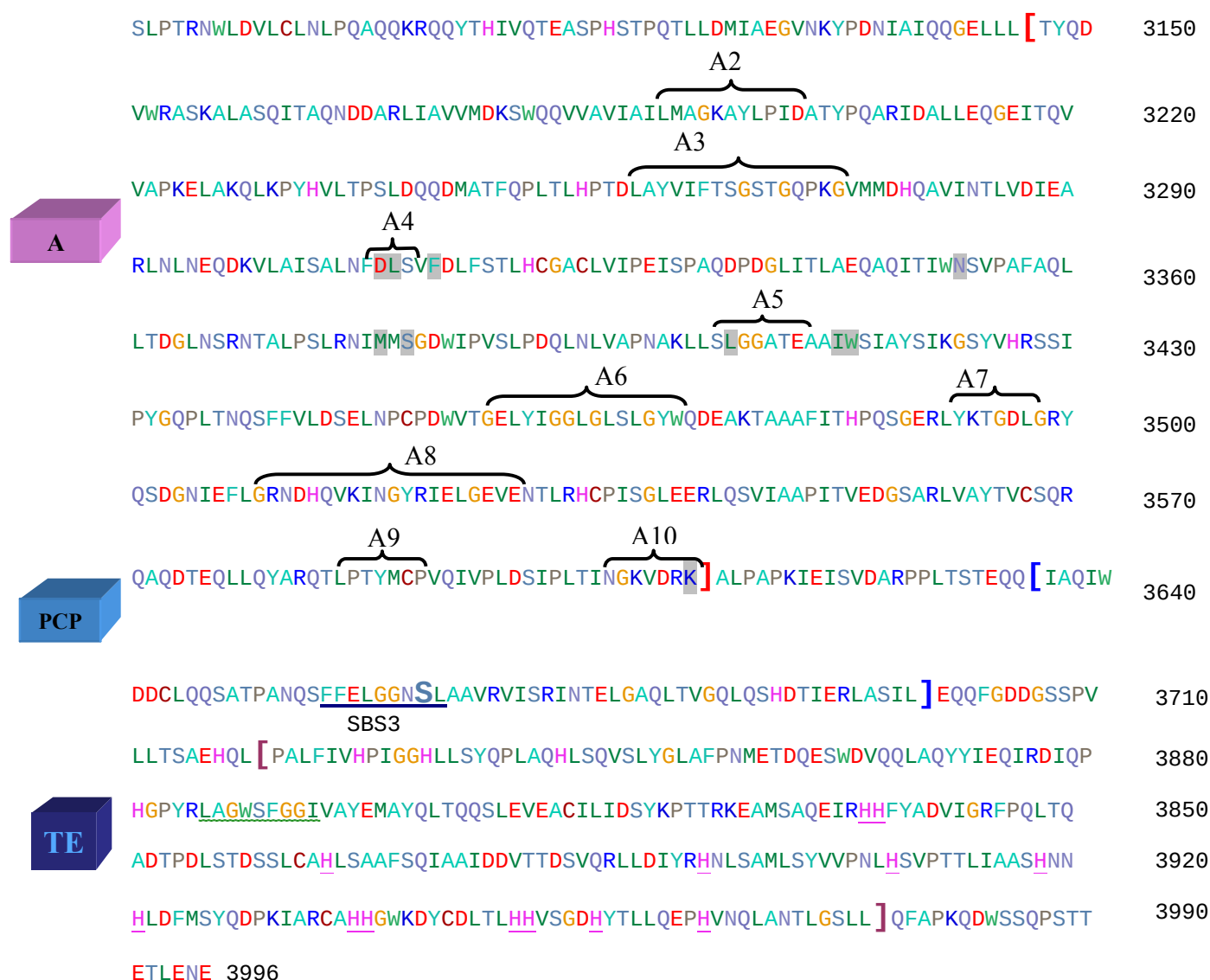


Figura VI.24.-Proteína Irp1 de *P. damsela subsp. piscicida*. Se subrayan las zonas SBS predichas de unión de la fosfopanteteinil transferasa. A1-A10, dominios de adenilación. Se señalan entre los dominios A4 y A5 en gris los aminoácidos que posiblemente seleccionen el sustrato a unir. Cy1-Cy5, probables dominios de ciclación. Los dominios A y Cy se buscaron siguiendo las secuencias consenso establecidas para éstos (Crosa y Walsh, 2002).

6.3.5. Generación y estudio del mutante *irp1*⁻

Construcción y análisis del perfil proteico del mutante *irp1*⁻

El plásmido suicida pSJR52 contiene un fragmento *NotI-SalI* que engloba la región 3' del gen *irp2* y 5' del gen *irp1*. Este plásmido se transfirió a la cepa DI21 resistente a rifampicina, y posteriormente se seleccionó una colonia que expresase el gen de resistencia a kanamicina contenido en pSJR52, lo cual es indicativo de que pSJR52 se ha integrado en el cromosoma bacteriano generando un mutante por inserción en el gen *irp1*. La nueva cepa mutante se denominó CS31. Para comprobar si el gen *irp1* mutado realmente codificaba una de las proteínas de alto peso molecular visualizadas previamente, se llevó a cabo un estudio del perfil de proteínas de membrana totales del mutante crecido en condiciones de exceso y de limitación de hierro. En el gel de poliacrilamida se pudo observar como ya se describió anteriormente, la presencia en la cepa salvaje DI21 de dos proteínas de elevado peso molecular cuya expresión está inducida por las condiciones de limitación de hierro (Figura VI.25).

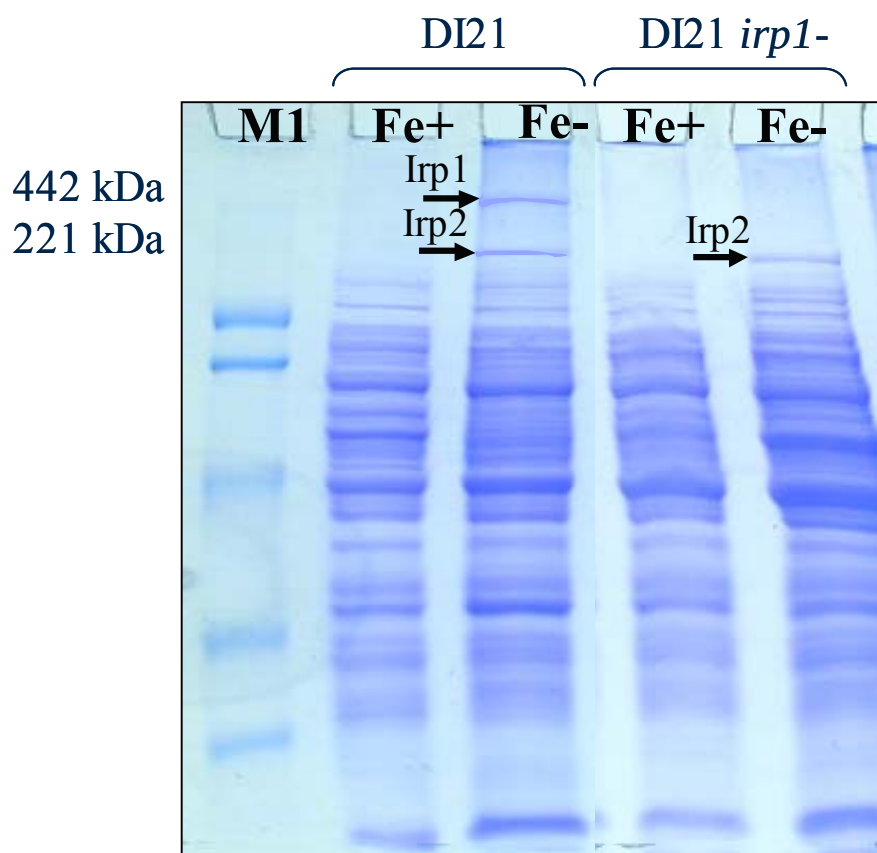


Figura VI.25.-Comparación del perfil de las proteínas de membranas totales de la cepa salvaje DI21 y la cepa mutante CS31-*irp1*⁻. (Fe+) condiciones de exceso de hierro; (Fe-) condiciones de déficit de hierro. M1 es el marcador de masas moleculares.

Comparando el perfil electroforético del mutante *irp1*⁻ respecto a la cepa salvaje, ambas crecidas en condiciones de limitación de hierro, se observa la pérdida en aquel de una banda que presentaba un peso molecular muy por encima de los 200 kDa. Esto indica que el gen *irp1* realmente codifica esta proteína de alto peso molecular regulada por la disponibilidad de hierro. Ello está de acuerdo con el tamaño predicho para el producto del gen *irp1*, además de con el hecho de que *irp1* parece formar parte de un operón cuya transcripción estaría regulada por los niveles de hierro a través de la proteína Fur.

Determinación del fenotipo de producción de sideróforos del mutante *irp1*⁻

Para determinar el efecto que la mutación del gen *irp1* causaba en relación a la biosíntesis de sideróforos en la cepa mutante CS31-*irp1*⁻, con respecto a la cepa parental DI21, se realizó el test CAS con ambas cepas (Figura VI.26).

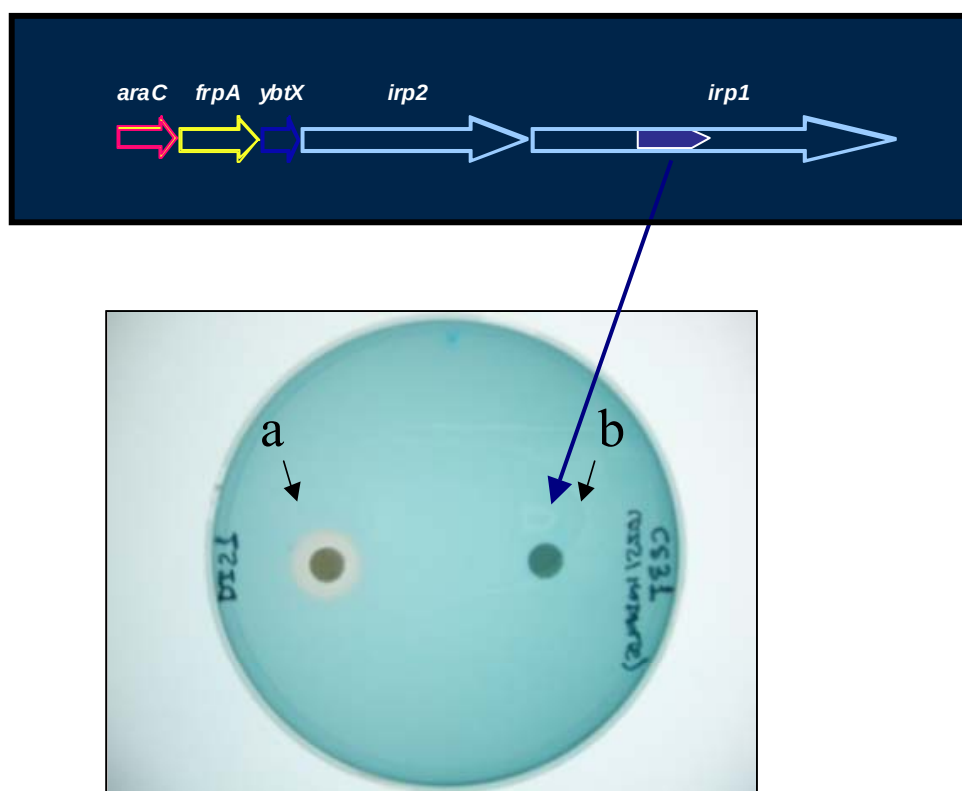


Figura VI.26.-Análisis de la producción de sideróforos de la cepa salvaje DI21 (a), y la cepa mutante CS31 (*irp1*⁻) mediante el test CAS.

Como se observa en la Figura VI.26, la cepa salvaje DI21 presentó el fenotipo esperado, es decir, produjo un claro halo anaranjado en torno al disco con sobrenadante del cultivo, indicando que existe producción de sideróforos. En cambio, en el mutante CS31-*irp1*⁻, no se observó producción alguna de sideróforos. Ello demuestra que la inactivación del gen *irp1* inhabilita a *P. damsela* DI21 para producir sideróforos. Al tratarse de una mutación por inserción, es posible que existan efectos polares en genes localizados corriente abajo de *irp1* y que formen parte de un mismo operón. En cualquier caso, lo que sí se puede afirmar es que, o bien *irp1*, o bien algún gen localizado corriente debajo de éste y que se transcribe conjuntamente con *irp1*, es fundamental para la producción de sideróforos en *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21.

Análisis de la curva de crecimiento del mutante *irp1*⁻

Se procedió a valorar la capacidad de crecimiento en condiciones de limitación de hierro de la cepa mutante *irp1*⁻ con respecto a la cepa DI21 salvaje, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura VI.27.

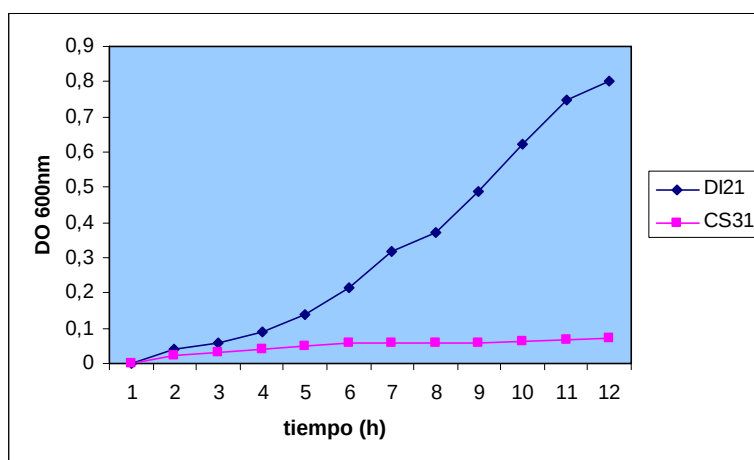


Figura VI.27.-Curva de crecimiento de las cepas DI21 y CS31 de *P. damsela* subsp. *piscicida* en medio CM9 con 2,2'-dipyridyl a una concentración final de 60 μ M. En el eje de abscisas figuran las densidades ópticas a 600 nm, y en el de ordenadas el tiempo en horas.

En el mutante CS31-*irp1*⁻ se observó una clara dificultad de crecimiento en presencia del quelante 2,2'-dipyridyl. Estos resultados, conjuntamente con los obtenidos en el test CAS, demuestran que el gen *irp1* forma parte de un operón que es esencial

para la producción de sideróforos en la cepa DI21 de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Asimismo se demuestra que la producción de sideróforos por parte de dicho operón es fundamental para que la bacteria pueda crecer en condiciones en las que el hierro está quelado, y sugiere que esta bacteria no posee un mecanismo extra para captar hierro en dichas condiciones.

Evaluación de la virulencia para peces del mutante *irp1*-

Puesto que generalmente los sistemas de transporte de hierro basados en la síntesis de sideróforos suelen estar relacionados con su virulencia, nos planteamos comprobar si sucede lo mismo en *P. damsela*. Los resultados del experimento de determinación del grado de virulencia para peces de la cepa parental (DI21-Rif) y de la cepa mutante *irp1*- (CS31), se muestran en la Tabla VI.6.

Tabla VI.6.-Determinación del grado de virulencia de la cepa CS31 (mutante) con respecto a la DI21 (salvaje).

Cepa	LD ₅₀
DI21	8 x 10 ⁵
CS31	≥ 2,6 10 ⁷

A una dosis de 4,8 x 10⁶ células bacterianas inoculadas intraperitonealmente, la cepa parental causó la mortalidad casi el 80% de los peces infectados. La cepa inoculada se aisló en cultivo puro a partir de muestras de bazo y riñón de todos los peces muertos. La dosis equivalente de la cepa mutante CS31 (2,6 x 10⁶), no produjo mortalidad alguna. Las dosis inferiores ensayadas, consistentes en un logaritmo menos de cada cepa, no produjeron mortalidad ni en la cepa parental ni en la cepa mutante. De este modo, la LD₅₀ de la cepa parental puede establecerse en 8 x 10⁵, mientras que la de la cepa CS31 es superior a 2.6 x 10⁷. Estos datos indican que la mutación en el gen *irp1*, que conlleva la incapacidad de producir sideróforos y, por tanto, de utilizar el mecanismo de captación de hierro basado en los mismos, supone una disminución en la virulencia de esta bacteria para los peces. La LD₅₀ de la cepa mutante es prácticamente

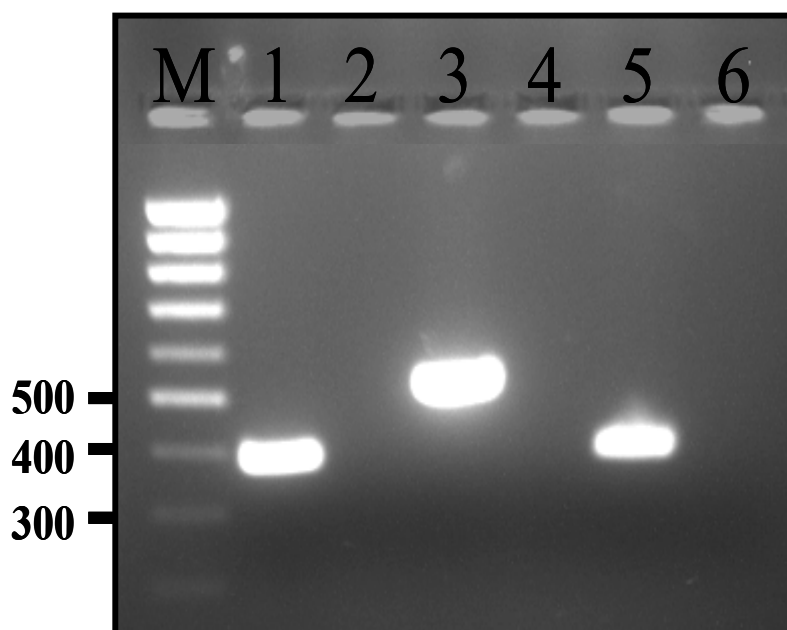


Figura VI.29.-Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR resultantes de las reacciones llevadas a cabo utilizando como DNA molde los cDNAs de las RT-I y II. (1) RT-I con los cebadores F15-in-5'2 y F-44-in-3'4; (3) RT-I con los cebadores AngR-like-5'3 y AngR-like-3'8; (5) RT-II con los cebadores F15-in-5'2 y F-44-in-3'4. (2, 4 y 6) controles negativos de las PCRs 1, 3 y 5 respectivamente. Los números a la izquierda indican los pares de bases.

Las PCRs realizadas con los cebadores F15-in-5'2-F y F-44-in-3'4 rindieron un producto de PCR de aproximadamente 386 pb, y la realizada con los cebadores AngR-like-5'3 y AngR-like-3'8 de alrededor de 518 pb según se esperaba. En los controles negativos no se observó ningún producto de PCR garantizando la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Este resultado corrobora la hipótesis de que los cinco genes *araC-frpA-ybtX-irp2-irp1* se cotranscriben a partir del promotor del gen *araC*, si bien no excluye la posibilidad de que existan promotores adicionales en otros puntos del operón. En este promotor se encuentra una secuencia que guarda una gran similitud con la secuencia consenso establecida para la caja Fur de *E. coli* (Escolar *et al.*, 1999) (Figura VI.30). Por lo tanto los resultados apoyan la hipótesis de que estos cinco genes se cotranscriben juntos a partir de un único promotor localizado en posición 5' respecto al gen *araC*, y que dicho promotor está regulado por hierro a través de la proteína Fur.

A. GATAATGAT A ATCATTATC
 B. GATAATGTT T CTCATTATC
 ***** * . . *****

Figura VI.30.-Comparación de la secuencia consenso establecida para la caja Fur (A) y la localizada en la región promotora del gen *araC* (B).

6.3.7. Presencia de los genes del operón de síntesis de sideróforos en cepas de las dos subespecies de *P. damsela*.

Para estudiar la distribución de los genes *irp1* e *irp2* en distintas cepas de *P. damsela* se procedió a realizar una hibridación de DNA utilizando para ello dos sondas internas de ambos genes. Se utilizaron distintas cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* y *P. damsela* subsp. *damsela*, y los resultados obtenidos fueron idénticos tanto con la sonda *irp1* como con la sonda *irp2*, por lo que se resumen en una única Figura (Figura VI.31).

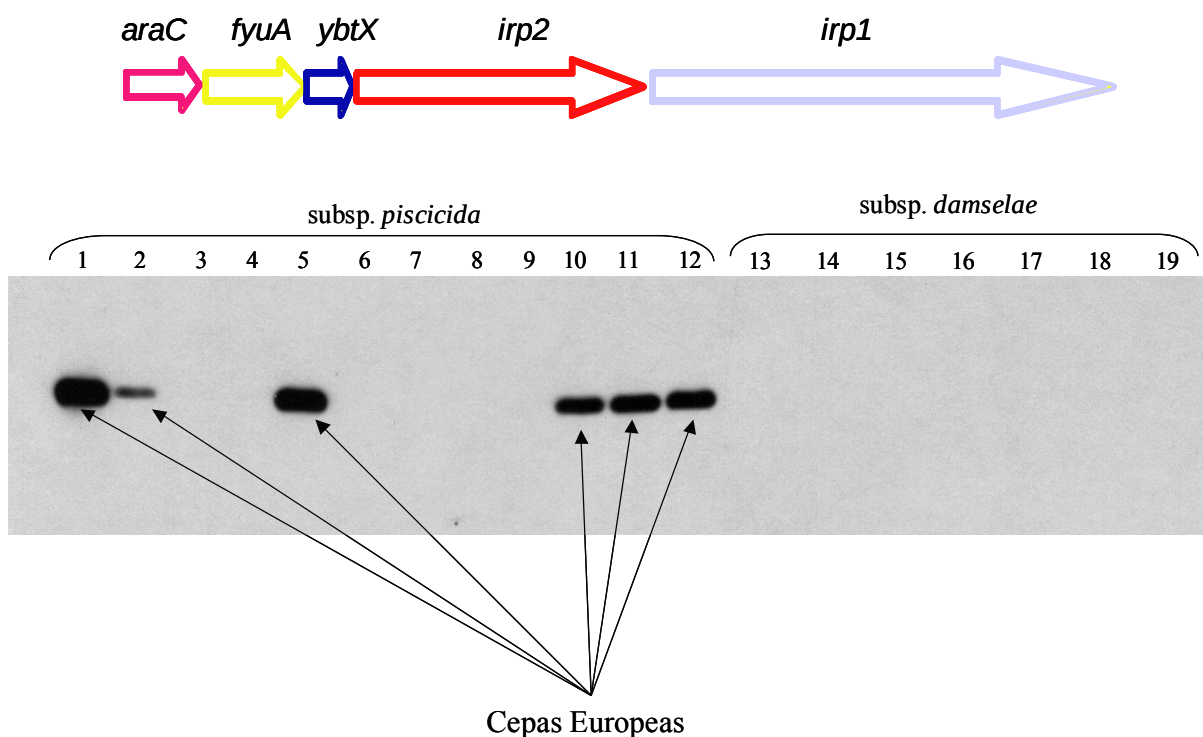


Figura VI.31.-Hibridación DNA-DNA realizada con distintas cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* y subsp. *damsela* utilizando como sonda fragmentos de los genes *irp1* e *irp2*. Cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida*: (1) DI21, (2) B51, (3) ATCC 17911, (4) ATCC 29690, (5) 666.1, (6) 10831, (7) MP7801, (8) EPOY-8803-II, (9) MZS 8001, (10) PC554.2, (11) PC435.1 y (12) ATLIT-2. Cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*: (13) RM-71, (14) ATCC 33539, (15) ATCC 35083, (16) CDC 2227-81, (17) RG-214, (18) LD07 y (19) 158.

En ella se puede observar que los genes *irp1* e *irp2* están ausentes en todas las cepas de la subsp. *damselae* estudiadas. En cuanto a las cepas de la subsp. *piscicida*, estos dos genes mostraron estar presentes únicamente en 6 de las 12 cepas analizadas, demostrando que existe una variabilidad inter e intrasubespecífica en los dos genes codificadores de las péptido-sintetasas no ribosómicas involucradas en la síntesis de sideróforos. Especialmente interesante es el origen geográfico de las seis cepas de subsp. *piscicida* que hibridan con las dos sondas: Las cepas DI21, B51, PC554.2 y PC435.1 son aislados de España; la cepa 666.1 es un aislado de Portugal, y finalmente la cepa ATLIT 2 es un aislado procedente de Israel. En términos generales, estas cepas tienen en común un origen europeo, si incluimos la cepa de Israel como dentro del ámbito de la piscicultura mediterránea.

En cambio, todas las cepas japonesas y la cepa americana demostraron carecer de estos dos genes. Estos resultados coinciden, además, con lo obtenido en el capítulo V para el gen que codifica de activador transcripcional de la familia AraC, y que forma parte de un mismo operón con *irp2* e *irp1*.

6.3.8. Similitud del sistema de biosíntesis de sideróforos de *P. damselae* subsp. *piscicida* con otras especies bacterianas

La distribución de los genes implicados en la biosíntesis de sideróforos en *P. damselae* subsp. *piscicida* se comparó con la descrita en otras especies bacterianas en las cuales se han descrito genes homólogos a los analizados en el presente estudio. La mayor similitud se encontró, tal y como ya se mencionó anteriormente, con genes de *Photobacterium profundum*, así como con genes de diferentes especies de *Yersinia* patógenas para el ser humano, *Y. enterocolitica*, *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis*. Un esquema comparativo de las equivalencias de los genes homólogos entre *P. damselae* subsp. *piscicida*, *P. profundum* y *Y. enterocolitica* se muestra en la Figura VI.32.

Como puede observarse, la distribución de los genes es muy similar en ambas especies de *Photobacterium*, aunque se observan diferencias respecto al tamaño del gen *irp1*. Mientras que en *P. damselae* subsp. *piscicida* la proteína Irp1 finaliza con una región de 828 aminoácidos que contiene tres dominios catalíticos (A-PCP-TE), estos tres dominios se recogen en una proteína codificada por el gen situado a continuación del gen *irp1* en *P. profundum* (anotada como *AMP-binding enzyme*).

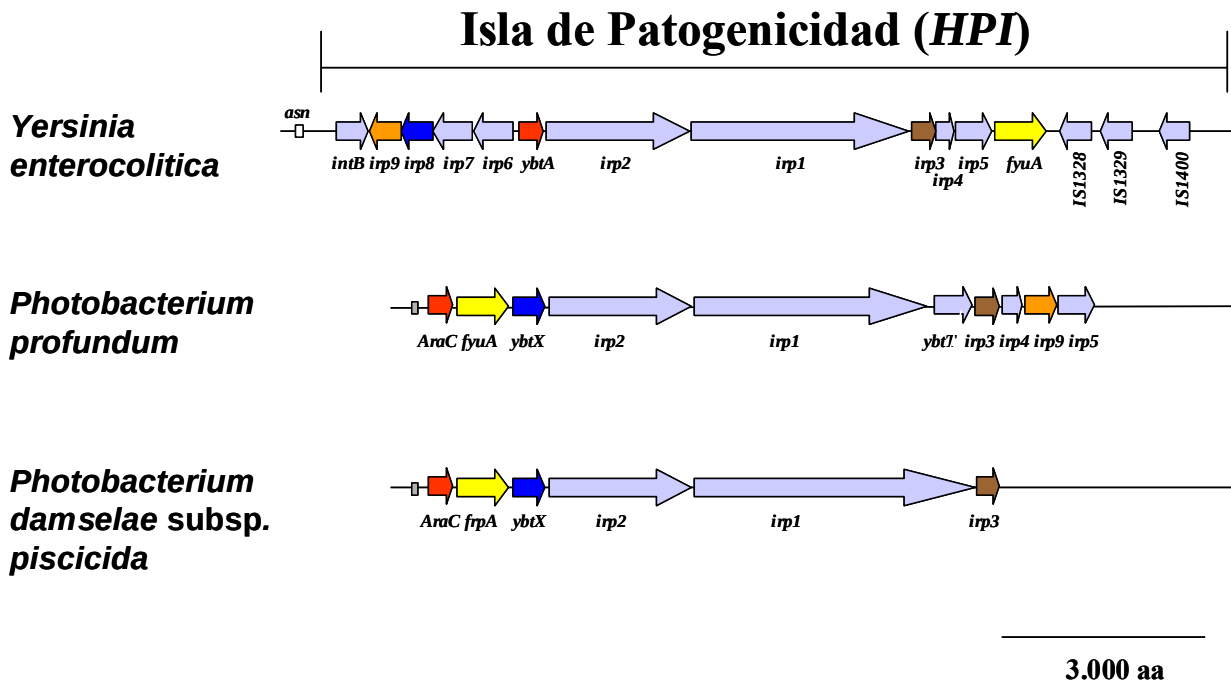


Figura VI.32.-Comparación de la distribución de los genes del sistema de biosíntesis de sideróforos de *P. damsela* subsp. *piscicida* y genes homólogos de *Y. enterocolitica* y *P. profundum*.

Si se admite un origen evolutivo común del gen *irp1* de ambas especies de *Photobacterium*, esto podría explicarse por la existencia de una mutación en el gen *irp1* de *P. profundum* que conllevó la ruptura de la ORF inicial mayor en dos ORFs, o bien que en *P. damsela* subsp. *piscicida* se produjo alguna mutación puntual que conllevó al agrupamiento de dos ORFs en una.

Lo más destacado de la similitud en la organización de estos genes entre *P. damsela* subsp. *piscicida* y *Y. enterocolitica* estriba en el hecho de que, en las especies de *Yersinia*, todos estos genes del operón de síntesis y transporte de yersiniabactina forman parte de una isla patogénica denominada HPI (de *High Pathogenicity Island*), que se integra en el genoma bacteriano en el locus de un gen del ARN transferente para la asparragina (Asn tRNA). En esta HPI se puede encontrar un homólogo del activador de la familia AraC que en *P. damsela* subsp. *piscicida* es el primer gen del operón: este gen se localiza en la HPI inmediatamente antes de *irp2*. También existen diferencias con respecto a la organización génica en *Y. enterocolitica* por ejemplo en la localización del gen *fyuA* que codifica el receptor de sideróforos de membrana externa, que en el caso de esta bacteria se sitúa tres ORFs a continuación del gen *irp1*, mientras que en las

dos especies de *Photobacterium* se ubica dos ORFs antes del inicio de este gen. El gen *ybtX*, que codifica una proteína de función desconocida, se localiza en *Y. enterocolitica* en la hebra opuesta a *irp1* e *irp2*, mientras que en las dos especies de *Photobacterium* este gen se transcribe en la misma hebra que los genes de las dos péptido sintetisas no ribosómicas, y además, al menos en *P. damsela* subsp. *piscicida*, hemos demostrado que *ybtX* e *irp2-irp1* se transcriben conjuntamente.

No se puede aventurar por el momento si este grupo de genes en *P. damsela* subsp. *piscicida* constituyen una isla patogénica. Para ello será necesario clonar y secuenciar en un futuro las regiones de DNA adyacentes a los genes hasta ahora descritos.

6.4. Discusión

La limitación de hierro es una condición que se da *in vivo*, cuando una bacteria entra en el hospedador. Se puede postular pues que la expresión de las proteínas relacionadas con la síntesis y el transporte de sideróforos se produzca durante el proceso infectivo (Bakopoulos *et al.*, 1997) y, por tanto, el conocimiento de estas proteínas (en especial las de membrana externa), es de gran interés para estudios de patogenicidad, diagnóstico y para el desarrollo de vacunas (Magariños *et al.*, 1992).

Estudios anteriores habían demostrado que *P. damsela* subsp. *piscicida* es capaz de producir sideróforos para captar hierro del medio externo. Sin embargo, el tipo de molécula que funciona como sideróforo es todavía una incógnita, aunque sí se sabe que no es del tipo catecol ni hidroxamato (Bakopoulos *et al.*, 1997; Magariños *et al.*, 1994c). Asimismo, estudios llevados a cabo en *P. damsela* subsp. *damsela* (Fouz *et al.*, 1997) demostraron que las cepas de esta subespecie producen y utilizan un sideróforo de tipo hidroxamato.

El objetivo de este capítulo, enmarcado en la caracterización genética de los mecanismos de captación de hierro en *P. damsela*, consistió en determinar la base genética de la captación de hierro mediada por sideróforos en *P. damsela* subsp. *piscicida*, y en determinar si los genes involucrados en este mecanismo de captación de hierro diferían entre cepas de las dos subespecies de *P. damsela*. Por tanto, nos

planteamos una hipótesis de trabajo basada en que si cepas de las dos subespecies de *P. damsela* producían un sideróforo de estructura química marcadamente diferente, también deberían encontrarse diferencias en el genoma y, por tanto, en las proteínas correspondientes.

Para validar esta hipótesis, se estudió el patrón de proteínas de membranas totales, en condiciones de exceso y defecto de hierro, en una cepa representativa de cada una de las dos subespecies. Los resultados fueron notablemente esclarecedores, ya que se observó que la privación de hierro conllevaba la inducción de la síntesis de al menos dos proteínas de alto peso molecular en la cepa DI21 (subsp. *piscicida*), pero no en la RM71 (subsp. *damsela*). Este hallazgo supuso la primera evidencia clara y rotunda de la presencia diferencial de proteínas reguladas por hierro entre cepas de las dos subespecies. Hasta la fecha, no solamente no se habían nunca comparado entre sí las proteínas reguladas por hierro en cepas de *damsela* y *piscicida*, sino que en la literatura no existían estudios de las proteínas de membranas totales inducidas en limitación de este metal. Los trabajos publicados hasta la fecha, describían únicamente los patrones de proteínas de la membrana externa reguladas por la disponibilidad de hierro, y no las proteínas de membranas totales.

Las dos proteínas inducidas en condiciones de limitación de hierro en la cepa DI21 de la subsp. *piscicida* mostraron un tamaño molecular lo suficientemente grande como para que todos los indicios apuntasen a que se trataba de probables péptido-sintetasas no ribosómicas, enzimas de elevado peso molecular ampliamente distribuidas en los microorganismos y que, entre otras múltiples funciones, son responsables de la biosíntesis de muchos de los sideróforos bacterianos descritos hasta el momento. Su purificación en la fracción de membranas totales podría explicarse por la presencia de dominios de unión a la parte interna de la membrana plasmática, como se ha descrito en la proteína Irp2 de *Yersinia* spp. (Guilvout *et al.*, 1993).

Para localizar los genes codificadores de las dos proteínas inducidas por limitación de hierro en la cepa DI21, se aplicó la técnica de la hibridación sustractiva, que ya había demostrado su utilidad en la comparación de genomas completos en *P. damsela*, tal y como se describió en el capítulo anterior. Como resultado de la aplicación de esta técnica, se aisló un fragmento de una péptido-sintetasa no ribosómica, que supuso el punto de partida para, finalmente, determinar la organización genética de una región de DNA que abarca aproximadamente 23 kb y que incluye un grupo de seis genes implicados en la biosíntesis de sideróforos en la cepa DI21 de *P. damsela* subsp.

piscicida, y que está ausente en la cepa *tester*. De este modo, y apoyando los resultados obtenidos en el capítulo anterior, se demuestra una vez más que la hibridación sustractiva es una técnica que presenta una gran especificidad para el aislamiento de secuencias génicas específicas de un genoma dado.

Las secuencias de las proteínas deducidas a partir de los genes de este *cluster* identificado en la cepa DI21, mostraron una alta similitud con componentes de los sistemas de síntesis y transporte de yersiniabactina, sideróforo producido por varias especies del género *Yersinia*. Las dos primeras ORFs del sistema demostraron ser homólogas a proteínas de la familia de los reguladores transcripcionales AraC como ya se describió en el capítulo anterior. Según lo descrito en la literatura (Osorio *et al.*, 2004b) la ORF2 (AraC) podría constituir un regulador positivo de los genes que constituyen el operón. La caja Fur localizada en la región promotora de esta ORF2 es casi idéntica (16 de 19 pb) a la secuencia consenso de la caja Fur descrita en *E. coli*. Como ya se ha comentado anteriormente, se ha demostrado que en *E. coli* y muchos otros microorganismos, entre ellos *P. damsela*, la expresión de los genes que intervienen en los mecanismos de captación de hierro está sometida al control de la proteína Fur (Escolar *et al.*, 1999).

La ORF3 codifica una proteína homóloga a algunos receptores de sideróforos descritos en varias especies, como *Photorhabdus luminescens* y *Pseudomonas fluorescens*, si bien no mostró identidad significativa con ningún receptor de sideróforos de los descritos hasta la fecha en la familia *Vibrionaceae*, exceptuando a *Photobacterium profundum*. Este dato también nos sugiere que el tipo de sideróforo que transporta este receptor debe ser diferente desde el punto de vista químico a otros sideróforos de *Vibrio*.

La ORF 4 codifica una proteína cuyos homólogos más similares no tienen un función biológica asignada. Como ya se indicó en los resultados, ORF4 mostró una elevada similitud con la proteína YbtX de *Yersinia pestis*. Si bien inicialmente se creía que esta proteína estaba involucrada en la biosíntesis del sideróforo yersiniabactina, estudios más recientes han demostrado que la mutación del gen *ybtX* no afecta en modo alguno a la síntesis ni a la utilización de la yersiniabactina (Fetherston *et al.*, 1999). Estos mismos autores demostraron que YbtX es una proteína altamente hidrofóbica localizada en la membrana citoplasmática. Si bien su función y la de sus homólogos más próximos es totalmente desconocida, un análisis comparativo en la base de datos COG (www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/) evidencia una cierta similitud con permeasas del

grupo de la *major facilitator superfamily* (MFS), implicadas en el transporte activo de sustancias desde el citoplasma bacteriano al exterior, lo cual sugiere que esta proteína pueda jugar un papel en la exportación del sideróforo desde el citoplasma al espacio periplásmico.

Irp2 e Irp1, dos miembros del grupo de las Péptido-Sintetasas no Ribosómicas

Irp1 e Irp2, comparten algunos dominios altamente conservados. La presencia de tales motivos seguramente sea la explicación del alto grado de reactividad inmunológica cruzada observada entre las proteínas HMWP1 y HMWP2 de *Yersinia* spp. (Kooi y Sokol, 1995).

La proteína Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida* mostró una elevada similitud con proteínas homólogas descritas en especies patógenas del género *Yersinia*, como por ejemplo la Irp2 de *Y. enterocolitica*, enzima implicado en la ciclación inicial y en reacciones de condensación que incluyen al salicilato y a dos moléculas de cisteína dentro de la ruta de biosíntesis del sideróforo yersiniabactina (Ybt) (Bobrov *et al.*, 2002). El análisis pormenorizado de los dominios de esta proteína demuestra que es un miembro de la familia de las péptido-sintetasas no ribosómicas, y aporta datos muy interesantes acerca de la posible función y la especificidad de sus sitios activos. Las cinco repeticiones directas (RD₁₋₅) localizadas en la secuencia de la proteína Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida* muestran un alto grado de conservación con las encontradas en proteínas homólogas de diversas especies del género *Yersinia* y probablemente cada una de estas repeticiones sean importantes para la función, conformación o localización de la molécula. Estas repeticiones, unidas a la presencia de un bucle de aproximadamente 300 aminoácidos ausente en otras proteínas relacionadas como AngR (*V. anguillarum*), EntF (*E. coli*), o proteínas tipo ACVS (por ejemplo las sintetasas de gramicidina de *Bacillus brevis*) son peculiaridades únicas de la proteína Irp2, y quizá esta organización le confiera características específicas (Guilvout *et al.*, 1993).

En la proteína Irp2 también se identificaron dos largas regiones hidrofóbicas (H1 y H2) que podrían corresponder a dominios de anclaje de la proteína Irp2 a la membrana. Sin embargo, la localización subcelular de este enzima sigue siendo un aspecto en estudio (Guilvout *et al.*, 1993).

La secuencia SGSTGTPKG presente en la proteína Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida* se encuentra reproducida de manera muy fidedigna en diversas ACVSs. Se ha

sugerido que esta región tan conservada podría constituir una nueva clase de bucle de unión de fosfato (*phosphate binding loop*) (Hori *et al.*, 1991). Esta secuencia está también presente prácticamente en la misma posición en la proteína AngR de *V. anguillarum* (Guilvout *et al.*, 1993).

La proteína Irp1 de *P. damsela* subsp. *piscicida* quedó definida como una proteína de 3.996 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 442 kDa. Esta proteína mostró la similitud más elevada con una hipotética β -cetoacil sintetasa de *P. profundum*, donde la mayor homología se encontró en la región N-terminal, correspondiente al dominio PKS (policétido-sintetasa). La similitud más elevada con una proteína cuya función haya sido bien caracterizada, se obtuvo con la HMWP1 de *Y. enterocolitica*.

Tal y como se ha descrito en los resultados, Irp1 comparte con Irp2 la posesión de dominios de Adenilación, Condensación y dominios de Transporte (PCP). Sin embargo, Irp1 tiene la peculiaridad de poseer un dominio Tioesterasa (TE) en su extremo C-terminal, dominio que está relacionado con la posible ciclación y liberación del sideróforo. Así, por ejemplo, en *Yersinia* spp. la proteína Irp1 es la encargada de ir añadiendo residuos de alcohol-isobutírico a la última tiazolina de la estructura nascente y se ha hipotetizado que, gracias a su dominio tioesterasa C-terminal, sea capaz de liberar el sideróforo del complejo multienzimático donde se formó (Geoffroy *et al.*, 2000). De forma similar, encontramos en la literatura más referencias a la función de estos dominios tioesterasa. Así, en *E. coli* se ha descrito la proteína EntF (Rusnak *et al.*, 1991) como parte de la ruta de biosíntesis del sideróforo enterobactina. EntF posee un dominio tioesterasa que participa en la transferencia de cadena entre dominios y cataliza la formación del enlace éster necesario para la ciclación intramolecular y liberación de la enterobactina. Se ha demostrado además, que mutaciones en el dominio TE de las proteínas HMWP1 (Irp1 y sus homólogos) de *Yersinia* spp. implican la pérdida de la capacidad de producción de sideróforos, por lo que éste parece ser esencial para su biosíntesis (Bobrov *et al.*, 2002).

Dominios de Adenilación: especificidad de sustrato

La especificidad de sustrato de los dominios de adenilación de Irp2 e Irp1 inferida a partir del método de Challis y Ravel (2000), (basado en el “código no ribosómico”) se correspondió con el aminoácido cisteína como ya se comentó en los

resultados. Ello sugiere, por tanto, que el sideróforo producido por *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 contiene, entre sus elementos constituyentes, al menos dos moléculas de cisteína. Ello lo asemejaría estructuralmente a la yersiniabactina, sideróforo producido por especies patógenas de *Yersinia*, y que contiene tres cisteínas en su estructura (Crosa y Walsh, 2002). Todo esto, además, está en concordancia con la elevada similitud en la secuencia aminoacídica entre las proteínas Irp1 e Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida* y las proteínas homólogas en *Yersinia* spp.

Las proteínas Irp1 e Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida* presentan además en la zona C-terminal un residuo de serina conservado, que podría guardar relación con la unión al cofactor 4'-fosfopanteteína, el cual posee un grupo sulfidrilo que podría estar implicado en la formación de un enlace tipo tioéster con los sustratos aminoacídicos y en la transferencia peptídica (Schlumbohm *et al.*, 1991).

Esta reacción de unión entre el grupo 4'-fosfopanteteína y la serina, la cataliza una fosfopanteteinil transferasa (por ejemplo EntD en *E. coli*) (Gehring *et al.*, 1998), enzimas frecuentemente codificadas en las agrupaciones génicas de biosíntesis y transporte de sideróforos (von Dohren *et al.*, 1997). Así, la fosfopanteteinilación del dominio PCP3 de HMWP1 en *Y. pestis* ha sido demostrada *in vitro* usando la enzima EntD de *E. coli* (Gehring *et al.*, 1998). La fijación de los dominios de las NRPS a los intermediarios biosintéticos se produce mediante un enlace tioéster con el grupo tiol terminal del cofactor 4'-fosfopanteteínico (4'-PP).

Como ya se comentó en el capítulo V, mediante la utilización de la técnica de hibridación sustractiva se identificó una ORF (en el clon pRDA31) de *P. damsela* subsp. *piscicida* PC 554.2 con elevada homología con una fosfopanteteinil transferasa de *Vibrio anguillarum* (AJ749799). El DNA contenido en este clon pRDA31 se utilizó como sonda para estudiar la presencia de este gen en otras cepas de *P. damsela* (ver Capítulo V). Puesto que este clon mostró hibridación positiva con el DNA de la cepa DI21, se demuestra que esta cepa posee un homólogo de la familia de las fosfopanteteinil transferasas, y dicha proteína podría ser la que actuase en concierto con las demás proteínas descritas en el cluster *irp*, para sintetizar el sideróforo de *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21.

Los resultados del análisis comparativo de secuencias llevados a cabo en este estudio, sugieren que la ruta de biosíntesis del sideróforo de *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 debe producirse mediante un proceso de ensamblaje multicatalítico mediado por sintetasas no ribosómicas (NRPS) y que podría tener puntos en común con

la ruta biosintética descrita para la síntesis del sideróforo yersiniabactina de *Yersinia* spp. y de la pioquelina de *Pseudomonas* spp.

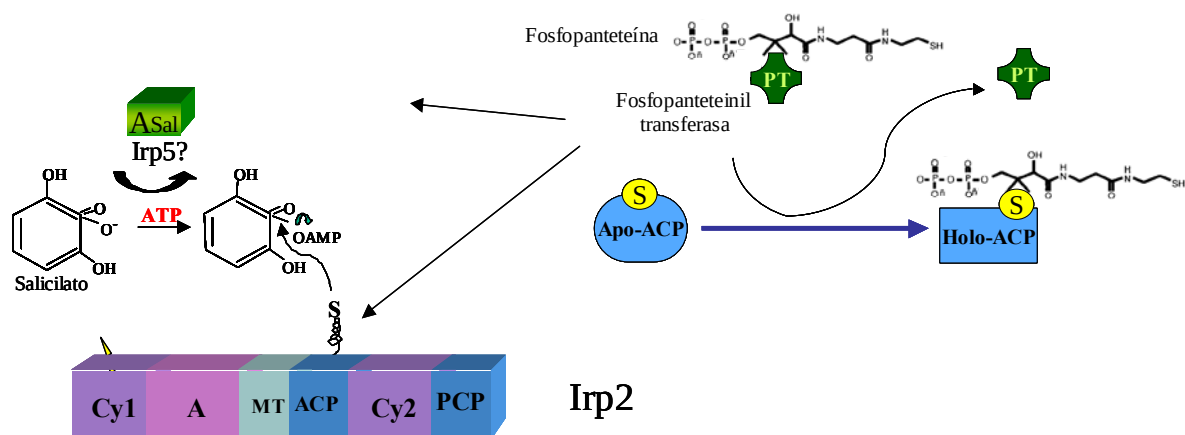
A pesar de que todavía no se han secuenciado los genes que se encuentran a continuación del gen *irp1* en *P. damsela* subsp. *piscicida*, en *P. profundum* sí se conoce la distribución de los mismos. Sobre la base del paralelismo existente entre *P. profundum* y *P. damsela* subsp. *piscicida* con respecto a los genes del *cluster*, parece probable que a continuación del gen *irp1* en DI21 se encuentren el resto de genes presentes en *P. profundum*. De ser así, *P. damsela* subsp. *piscicida* poseería también el gen *irp5*, que codifica para una hipotética AMP-ligasa de ácido salicílico. Los sideróforos pioquelina y yersiniabactina se forman básicamente a partir de dos y tres cisteínas respectivamente, ácido salicílico y sucesivas metilaciones con grupos metilo donados por una SAM (S-adenosilmetionina). La diferencia entre ambas reside fundamentalmente en la presencia de un grupo adicional en la yersiniabactina donado por el malonil-CoA.

Dado que en las proteínas Irp1 e Irp2 de *P. damsela* subsp. *piscicida* se han localizado dominios de adenilación (A) que seleccionan el aminoácido cisteína, y dominios de metilación (MT), el hecho de que también existiera un dominio de selección de salicilato reforzaría la hipótesis de la similitud del sideróforo de *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 con la yersiniabactina y la pioquelina de *Yersinia* spp. y *Pseudomonas* spp.

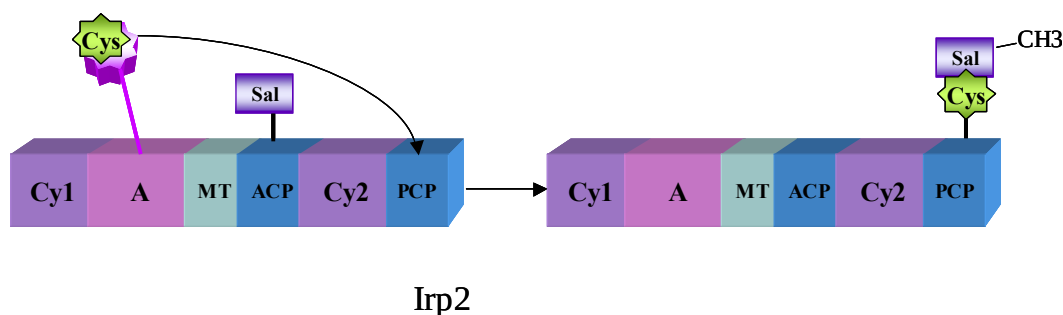
Este es el primer estudio en términos de biología molecular que describe los genes que median la formación del sideróforo de *P. damsela* subsp. *piscicida*. A continuación, realizamos una predicción de la posible ruta de biosíntesis de este sideróforo sobre la base de lo ya descrito en *Yersinia* spp. (Crosa y Walsh, 2002). La funcionalidad de Irp1 e Irp2 se asignó, a la espera de un estudio bioquímico, en función de su composición en dominios y de su homología con otras especies.

El primer paso de la ruta de biosíntesis se ha hipotetizado asumiendo que *P. damsela* subsp. *piscicida* posee el gen *irp5* al igual que *P. profundum*. Así, en primer lugar la AMP-ligasa de salicilato (ASal) (Irp5) sería la encargada de seleccionar esta molécula, activarla y transferírsela a un dominio ArCP, previamente activado por una fosfopanteteinil transferasa, para que este lo aproximara a un dominio de condensación, probablemente el primero de la proteína Irp2 (Cy1). Este dominio transportador (ArCP) se ubicaría en la misma Irp5 o estaría codificada por otro gen del sistema que podría ser similar a EntB de *E. coli*. En esta bacteria EntB desarrolla un doble papel, ya que

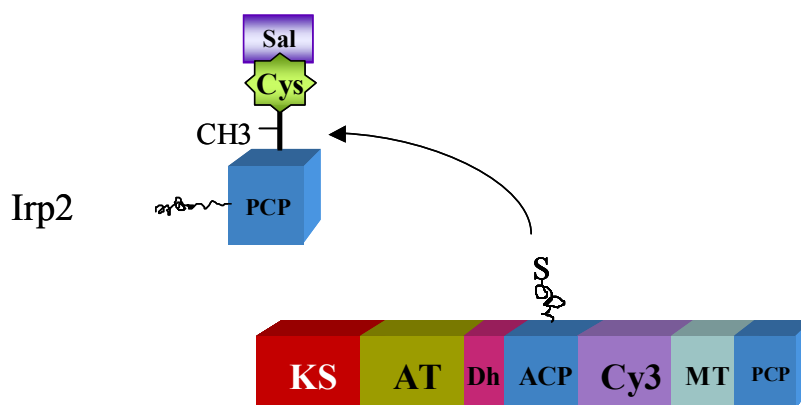
participa en la síntesis de 2,3-DHBA y además tiene función transportadora de grupos aril (Earhart, 1996).



A continuación, la proteína Irp2 seleccionaría con su dominio A (Adenilación) una molécula de cisteína, que pasaría a transferirse al dominio PCP terminal. El PCP-S-cisteína y el sustrato fijado al cofactor 4'-PP (4'-fosfopanteteínico) del módulo precedente (ACP-S-Salicilato) serían colocados entonces en los dominios Cy para que se catalice la formación de los enlaces peptídicos:

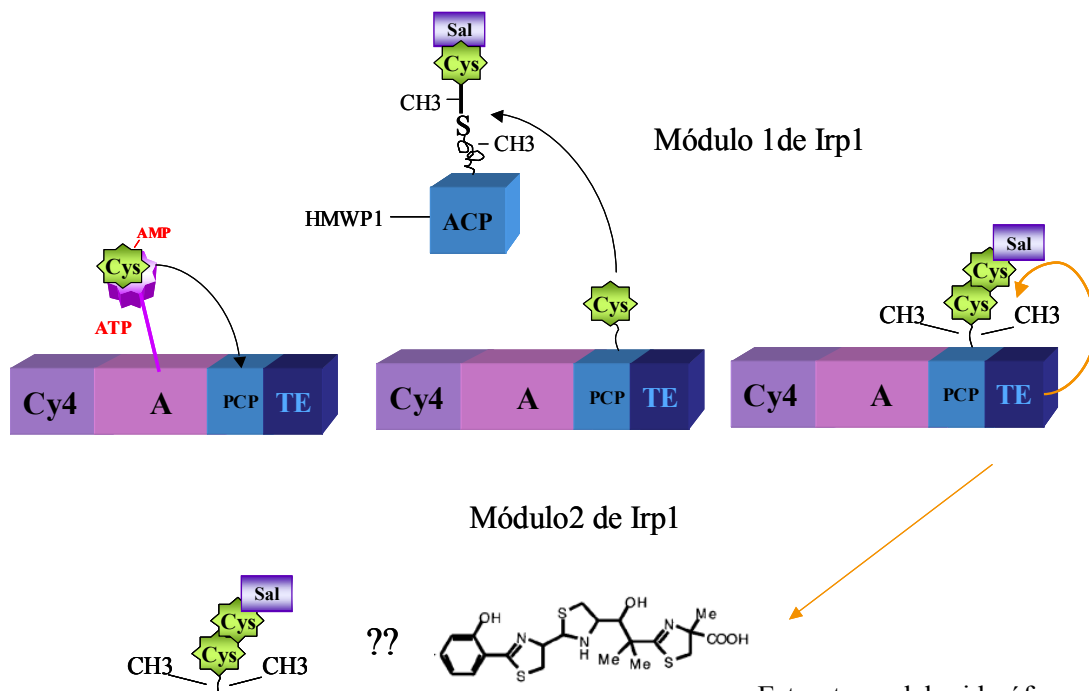


Entonces, el dominio PCP de Irp2 se acercaría al dominio ACP del módulo I de la proteína Irp1 para cederle el grupo S-Cys-Sal, y el proceso descrito anteriormente se repetiría. La proteína Irp1 cuenta con un dominio de adenilación de cuyo código no ribosómico se infirió que sería responsable de la activación y cesión de una segunda Cys, que pasaría constituir el grupo S-Cys-Cys-Sal en el dominio PCP terminal de Irp1:



Durante este proceso se producirían al igual que en la biosíntesis de la yersiniobactina y la pioquelina, al menos dos metilaciones, dado que las proteínas Irp2 e Irp1 cuentan con un dominio catalítico MT cada una. Otra modificación que presumiblemente se iría produciendo es la ciclación de las moléculas por parte de los dominios Cy. Además, se ha descrito un dominio deshidrogenasa que podría participar en el reajuste redox de los anillos heterocíclicos, como sucede en la pioquelina.

La terminación y liberación de la cadena peptídica sería catalizada por el dominio tioesterasa C-terminal. Se produciría la transferencia del último dominio Irp1-PCP hacia la cadena lateral de la serina del sitio activo del dominio tioesterasa y a continuación se liberaría el sideróforo, probablemente por hidrólisis intermolecular (de modo similar a lo que ocurre con los sideróforos yersiniabactina y pioquelina):



Posible estructura del sideróforo de *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 deducida a raíz de este estudio.

Estructura del sideróforo yersiniabactina producido por *Yersinia* sp.

El mutante *irp1* no produjo reacción alguna sobre medio CAS, a diferencia de la cepa parental. Este hecho sugiere una alteración en los pasos iniciales de la biosíntesis del sideróforo ya que los quelantes de iones relativamente débiles como el 2'-DHBA (un posible precursor del sideróforo de *piscicida* DI21) son detectables en el test. En concordancia con este resultado, se observó también una disminución radical de la capacidad de crecimiento del mutante en medios con baja disponibilidad de hierro, situación simulada en el laboratorio adicionando un quelante de hierro al medio de cultivo.

El grado de virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* podría estar correlacionado con la presencia de este sistema de biosíntesis de sideróforos. En cepas altamente patógenas de *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, y *Y. enterocolitica*, se ha detectado la presencia de HMWP1 (o Irp1) y HMWP2 (o Irp2), proteínas que estaban ausentes en cepas no virulentas de *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia* (Carniel *et al.*, 1987).

Utilizando el rodaballo como modelo experimental, se llevó a cabo un estudio de la repercusión que una mutación en el sistema de síntesis de sideróforos podría tener en la virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* para peces. Los resultados evidenciaron un aumento de la LD₅₀ en la cepa mutante CS31 (*irp1*-) con respecto a la cepa parental DI21-Rif. Esto indica claramente que la captación de hierro mediada por sideróforos contribuye significativamente a la virulencia de este microorganismo. Es de esperar que cuando la bacteria se encuentra en los tejidos del pez, la baja disponibilidad de hierro favorezca la expresión de los genes de biosíntesis del sideróforo descritos en este trabajo, que de otra manera se encontrarían reprimidos por la proteína Fur en condiciones de exceso de hierro. Si bien *P. damsela* subsp. *piscicida* posee otros mecanismos de captación de hierro, por ejemplo a partir de los grupos hemo, es posible que el mecanismo basado en la utilización de sideróforos sea el preponderante en las condiciones de infección del hospedador. Siendo así, se explicaría cómo la inactivación de dicho sistema conlleva el aumento de la LD₅₀ en dos órdenes de magnitud. Existen numerosos ejemplos de la importancia de los mecanismos de captación de hierro mediada por sideróforos en la virulencia bacteriana, muchos de los cuales ya han sido enumerados con anterioridad. Un ejemplo similar al de nuestro estudio, dadas las similitudes en los genes involucrados, es el descrito en *Yersinia pestis*, especie en la cual la inactivación del gen *irp2* conlleva una importante atenuación en la virulencia (Bearden *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos en el análisis de la organización transcripcional del grupo de genes *araC-frpA-ybtX-irp2-irp1* demuestran que la transcripción de los genes *irp2* e *irp1* se produce de manera simultánea a la del resto del operón *irp*, a partir del promotor situado antes del codón de inicio del segundo gen *araC*. Este promotor ya había sido identificado en *P. damsela* subsp. *piscicida* previamente y contiene una secuencia que guarda una gran homología con la secuencia consenso de la caja Fur descrita en *E. coli* (Osorio *et al.*, 2004b). Esta proteína AraC, además, muestra una elevada homología con la proteína YbtA de *Yersinia* spp. que es un activador transcripcional de los genes de síntesis de yersiniabactina. Así, todo parece apuntar a que esta proteína AraC por un lado regula la transcripción del resto de genes, probablemente como activador transcripcional, como se describió en *Y. pestis* (Fetherston *et al.*, 1996), y por otro está sometida a una autorregulación dependiente de las concentraciones de hierro del medio.

En el caso de *Yersinia* se ha llegado a la conclusión además de que el operón de biosíntesis de sideróforos está sujeto a regulación mediada por su propio producto ya que la adición de yersiniabactina al medio implica un aumento en los niveles de expresión del mutante *irp1*⁻, mientras que la mutación en este gen hace que los niveles de HMWP2 decrezcan bruscamente (Pelludat *et al.*, 1998). Resulta curioso el alto grado de similitud hallado entre las proteínas Irp de *P. damsela* subsp. *piscicida* y las correspondientes en distintas especies del género *Yersinia* teniendo en cuenta las alejadas posiciones filogenéticas de ambos microorganismos. En cambio estos datos sustentan la hipótesis de una transferencia lateral de genes desde una especie donadora a *P. damsela* subsp. *piscicida*. Se ha visto que los genes del sistema de transporte de hierro mediado por el plásmido pJM1 de *V. anguillarum* (Koster *et al.*, 1991) comparten una homología significativa con los encontrados en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Dorsey *et al.* (2004) describieron en *Acinetobacter baumannii* un sideróforo (acinetobactina) muy parecido al de *V. anguillarum* (anguibactina). Ambas bacterias patógenas están en principio poco relacionadas entre sí, pero según estos autores comparten un sistema de síntesis y utilización de sideróforos muy semejante. De forma similar, Koebnik *et al.*, (1993) destacaron la similitud entre el receptor de ferricromos de *Y. enterocolitica* (FcuA) y el de anguibactina de *V. anguillarum*.

Variabilidad génica en *P. damsela* subsp. *piscicida*

P. damsela subsp. *piscicida* se había definido inicialmente como un grupo bioquímica y antigénicamente homogéneo independientemente de su origen geográfico (Magariños *et al.*, 1996c; Bakopoulos *et al.*, 1995). Sin embargo en este trabajo se ha demostrado que algunas de las cepas de origen europeo poseen un operón génico que codifica para proteínas implicadas en la biosíntesis de sideróforos que no están presentes en el resto de cepas analizadas, es decir, que sí existen diferencias en función de la procedencia de la cepa de *P. damsela* subsp. *piscicida* y que por lo tanto se puede afirmar que no estamos ante un grupo homogéneo, como ya se discutió en el capítulo anterior de este trabajo. Bakopoulos *et al.* (1997) atribuyeron esta heterogeneidad detectada en sus experimentos al efecto de los continuos pases que las cepas experimentan en el laboratorio. Sin embargo, a la luz de los resultados obtenidos en la presente tesis, se puede afirmar que existe una gran variabilidad genética entre cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* en función de su origen geográfico: así, el operón *irp* está presente exclusivamente en algunos aislados europeos de la subsp. *piscicida*, mientras que está ausente en todos los aislados japoneses y americanos, así como en todas las cepas de la subsp. *damsela* analizadas.

Estos resultados concuerdan también con los descritos por Magariños *et al.*, (2000) donde se determinó por la técnica de RAPD la existencia de dos linajes clonales dentro de *P. damsela* subsp. *piscicida* según su procedencia: uno que incluiría a las cepas de origen europeo, y otro que englobaría las cepas de origen japonés y norteamericano.

De especial interés es el hecho de que las cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* que no poseen los genes *irp2* e *irp1*, sí producen y utilizan sideróforos, tal y como ya se conoce por trabajos previos (Magariños *et al.*, 1994c). Esto indica que dichas cepas deben poseer otro sistema o sistemas diferentes de producción y transporte de sideróforos, con lo cual la diversidad genética de las cepas de esta subespecie podría todavía ser mucho mayor de lo esperado.

Los estudios de distribución de los genes *irp1* e *irp2* mediante sondas de ADN, mostraron que ninguna de las cepas analizadas de *P. damsela* subsp. *damsela* contenían dichos genes. Esto constituye un indicio más de la existencia de sideróforos diferentes entre la subespecie *damsela* (Fouz *et al.*, 1997) y la subespecie *piscicida*.

En un trabajo previo, se describió un pseudogen de un receptor de sideróforos en *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21, y que está ligado al sistema TonB2 (Osorio *et al.*, 2004b). Estudios en nuestro laboratorio, todavía no publicados, han demostrado que este pseudogen está presente como tal en cepas de la subsp. *piscicida* aisladas tanto de países europeos, como de Norteamérica y de Japón. Sin embargo, en cepas de la subsp. *damsela* no constituye un pseudogen sino un gen teóricamente funcional, que hemos denominado *frdA* (*ferrisiderophore receptor of damsela*). Este gen de la subsp. *damsela* muestra una notable homología con el receptor de la vibrioferrina de *V. parahaemolyticus*. Por tanto, analizando esta información en conjunto, parece que las cepas de la subsp. *damsela* poseen un sistema de síntesis y transporte de sideróforos más similar a lo descrito en otras especies de la familia *Vibrionaceae*, mientras que en cepas de la subsp. *piscicida* ese sistema no sería funcional, dado que el receptor es un pseudogen. De alguna manera, el operón de genes de síntesis y transporte descrito en este capítulo en la cepa DI21 pudo haberse ganado por transferencia horizontal, originando una línea clonal dentro de esta subespecie y otorgándosele con ello la capacidad de producir un sideróforo que es probablemente similar a la yersiniabactina en su estructura química. Este posible origen por transferencia horizontal desde una especie quizá no muy relacionada genéticamente con *P. damsela*, podría explicar por qué en los proyectos genoma finalizados en varias especies de Vibrionáceas no se encuentran homólogos claros de los genes descritos en el presente trabajo.

La inactivación de un receptor de sideróforos en una célula de subsp. *piscicida* pudo originar una presión selectiva que conllevara la ganancia de un nuevo sistema de síntesis y transporte de sideróforos, y esa es la situación que se observa actualmente. O bien, al contrario, una célula de subsp. *piscicida* pudo haber ganado en algún momento este sistema por transferencia horizontal, y la coexistencia de dos sistemas redundantes pudo abocar a una relajación de la presión selectiva, provocando la acumulación de mutaciones que finalmente llevarían a la generación de un pseudogen para el receptor primitivo. Quedaría por explicar, qué sistema de síntesis de sideróforos poseen las cepas de *piscicida* *irp1-/irp2-*, ya que éstas también poseen el pseudogén (por tanto, inactivo) del receptor *frdA* de la subsp. *damsela*.

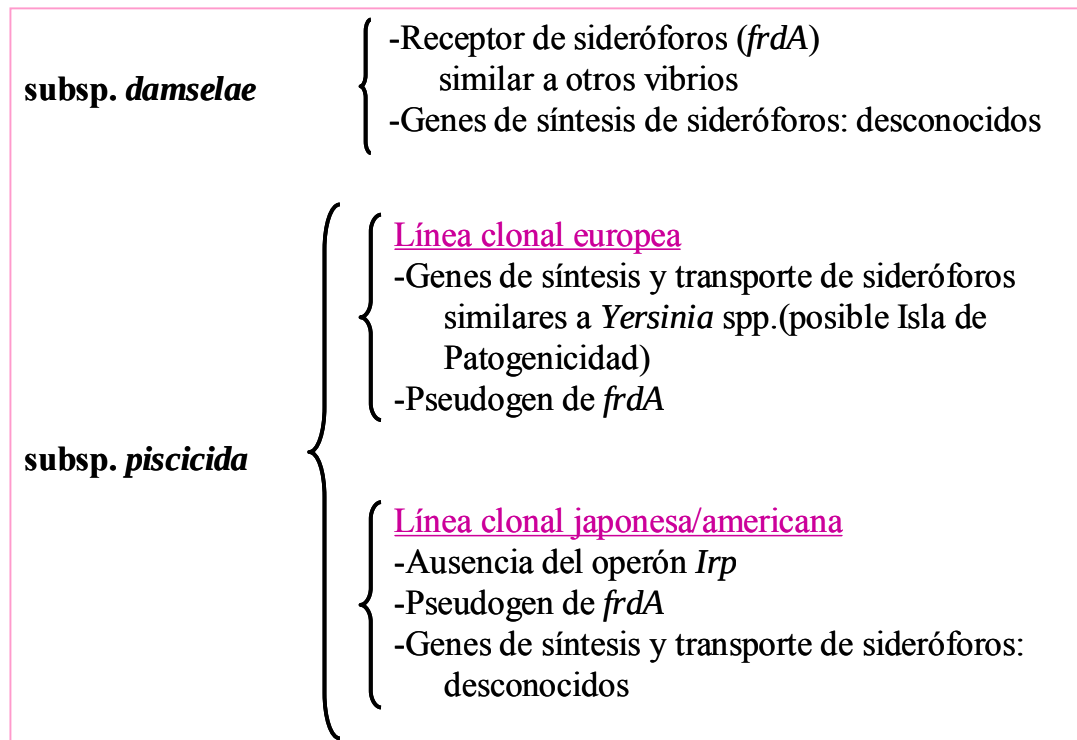


Figura VI.33.-Resumen de la diversidad genética existente en cepas de las dos subespecies de *P. damsela*, con especial atención a la presencia diferencial de genes relacionados con la captación de hierro.

En la Figura VI.33 se esquematizan las diferencias genéticas, en cuanto a los genes de captación de hemo y sideróforos, en las dos subespecies de *P. damsela*. La acumulación de pseudogenes en *P. damsela* subsp. *piscicida*, junto con la adquisición de genes por transferencia horizontal y elementos transponibles del tipo de los descritos en capítulos anteriores, constituyen mecanismos que podrían explicar los procesos de especiación de este patógeno de peces acelerando su divergencia respecto a *P. damsela* subsp. *damsela*, y favoreciendo la generación de nuevas líneas clonales en *P. damsela* subsp. *piscicida*.

6.5.-Anexos

Tabla VI.7.- Cebadores utilizados en el capítulo VI de este estudio.

Oligonucleótido	Secuencia
AngRlike 5'3	CCTTAAGCGTTTGCAAAACC
AngRlike 3'2	CCAATATTATCCTCTTCTGC
AngRlike 3'6	CGTATCCCGATACTTGCGGA
AngRlike 3'7	AAGTGTTTCGCGTTGGTGAC
AngR-like 3'8	CAATCTGCTGAAATGCTGCC
F-15-in-3'4	TTTGGCTCAAGAGCGTTGCC
AngR-like 5'6	GTGATGAAGAGCTCAAAACC
IP-Furta-15-1	GCGAATTCATTAATCAACGCCGG
IP-Furta-15-2	GCGAATTCCTCGACGTGAAGCTGAAAGTTTCG
F15-in-5'2	CTACTATCGTCTTCCATTCC
F-44-in-3'4	ATTCCATCAAGACGGCTCTC
IP-irp1-in-3'1	GCATCCGTCACGTGATGATC
IP-irp1-like-5'	AGCTACACGTTGCTGATGGC
IPHMWP1-3'1	CTGACGACATGGCCAATGTT

Tabla VI.8.- Plásmidos contruidos a lo largo del presente capítulo.

Plásmido	Vector de clonación	Construcción
pSJR186	pGEM-T Easy	Fragmento de PCR Inversa que engloba el extremo 3' del gen <i>irp2</i> y el 5' del gen <i>irp1</i>
pCAR 219	pWKS30	Fragmento del plásmido pSJR186, escindido con <i>EcoRI</i> y <i>XbaI</i> y que contiene una parte del gen <i>irp1</i> de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> .
pSJR52	pNidKan	Fragmento del plásmido pCAR219, escindido con <i>NotI</i> y <i>Sall</i> y que contiene una parte del gen <i>irp1</i> de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> .
pCAR187	pGEM-T Easy	Producto de PCR inversa que contiene un fragmento interno del gen <i>irp1</i> .
pCAR 217	pGEM-T Easy	Producto de PCR inversa que contiene un fragmento de 5 kb <i>ApaLI</i>
pSSH1	pGEM-T Easy	Producto resultante de la hibridación sustractiva que contiene un fragmento del gen <i>irp2</i> de la cepa DI21 de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> .

Capítulo VII

Conclusions

Capítulo VII: Conclusiones

1.- El agente causal de la pasteurelosis, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, así como *P. damsela* subsp. *damsela*, poseen un mecanismo para la utilización de grupos hemo (hemina y hemoglobina) como fuente de hierro. Este sistema está codificado por al menos diez genes, cuya secuencia nucleotídica muestra una similitud del 97% entre cepas de ambas subespecies, las cuales comparten además una misma organización génica. Los componentes de este sistema son: un receptor de membrana externa (HutA), un sistema TonB generador de energía (TonB, ExbB y ExbD), una proteína periplásmica de unión de hemina (HutB), una permeasa (HutC) y una ATPasa (HutD) ancladas en la membrana interna celular formando el denominado transportador ABC, una coproporfirinógeno oxidasa (HutW) y dos proteínas de función desconocida (HutZ y HutX).

No parecen existir sistemas redundantes para cumplir la función biológica de captación de grupos hemo, dado que la inactivación de algunos genes del sistema ya descrito imposibilita a la bacteria para utilizar los grupos hemo como única fuente de hierro.

2.- El gen *hutA* que codifica el receptor de membrana externa para grupos hemo se encuentra inactivado, constituyendo un pseudogen, en varias cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* aisladas en la zona europea. Puesto que las cepas *hutA*- son capaces de utilizar los grupos hemo como fuente de hierro, debe existir un receptor de membrana alternativo, que todavía está por descubrir.

3.- El sistema de genes de transporte de hemo se expresa *in vivo*, durante la infección de *P. damsela* subsp. *piscicida* en rodaballo, indicando que este mecanismo de asimilación de hierro puede ser de utilidad para el patógeno durante el proceso infeccioso.

4.- La base genética de los sistemas de captación de hierro mediada por sideróforos en la especie *P. damsela* muestra una patente diversidad. Algunas cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* poseen un mecanismo para la síntesis y utilización de sideróforos, que muestra similitudes estructurales con el sistema de

síntesis y utilización de yersiniabactina, sideróforo producido por especies patógenas de *Yersinia*. Dicho sistema es exclusivo de algunas cepas europeas de la subespecie *piscicida*, y está ausente en el resto de cepas de *piscicida*, así como en todas las de la subsp. *damselae* analizadas.

5.- La captación de hierro mediada por sideróforos constituye un factor de virulencia para *P. damselae* subsp. *piscicida*, puesto que la inactivación de los genes responsables de la biosíntesis de sideróforos conlleva una disminución del grado de virulencia de al menos 2 órdenes de magnitud.

6.- Los sistemas de transporte de hierro basados tanto en la utilización de hemo, como en la utilización de sideróforos, están regulados a nivel de la transcripción por el producto del gen *fur* que está presente en las dos subespecies de *P. damselae*, compartiendo una identidad en su secuencia de aminoácidos del 99,3%. La proteína Fur actúa como un represor transcripcional sensible a la concentración de hierro del medio. La construcción de árboles filogenéticos basados en la proteína Fur sugiere una mayor proximidad evolutiva entre *P. damselae* y el grupo formado por *V. fischeri*, *V. logei* y *V. salmonicida* (Vibrios de agua fría) que con el resto de Vibrios.

7.- *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* es un microorganismo altamente heterogéneo desde el punto de vista genético. Los análisis de presencia/ausencia de diferentes genes demuestran que, en esta subespecie, prácticamente no existen dos cepas que sean idénticas en su composición genética.

8.- Los elementos genéticos móviles parecen haber contribuido notablemente a la generación de la diversidad en *P. damselae* subsp. *piscicida*. La presencia de un elemento integrativo y conjugativo, similar al SXT de *V. cholerae*, en una cepa de *P. damselae* subsp. *piscicida* demuestra la elevada plasticidad del genoma de esta bacteria y las continuas alteraciones a las que se ve sometido.

9.- Parece claro a la vista de los resultados expuestos, que las dos subespecies de *P. damselae* se encuentran en un proceso de especiación. Asimismo, existen claras evidencias de que *P. damselae* subsp. *piscicida* está sufriendo un continuo proceso de diversificación.

10.- La adquisición por transferencia horizontal de grupos de genes y/o elementos móviles, y la inactivación de genes (acumulación de pseudogenes), son procesos que probablemente han contribuido a la separación de *P. damsela* subsp. *piscicida* y *P. damsela* subsp. *damsela* a partir de un ancestro común, así como a la génesis de nuevas líneas clonales dentro de cada subespecie.

Anexo

1. Preparación de medio agar de soja tripticasa con un 1% de NaCl (TSA-1)

Se utilizó el medio de cultivo comercial de Cultimed, que integra los siguientes componentes:

Componente del medio TSA	g/L de medio
Peptona de soja	5
Peptona de caseína	15
Agar	15
NaCl	5

Para preparar 1 L de medio de cultivo TSA-1 se pesaron 40 g del medio comercial TSA y se le añadieron 5 g de NaCl para llevarlo a una concentración final del 1%. A la mezcla se le añadió 1 L de agua destilada, se agitó y se autoclavó a 121 °C durante 20 min.

2. Preparación de medio caldo de soja tripticasa con un 1% de NaCl (TSC-1)

Se utilizó el medio de cultivo comercial de Cultimed, que integra los siguientes componentes:

Componente del medio TSC	g/L de medio
Peptona de soja	5
Peptona de caseína	15
NaCl	5

Para preparar 1 L de medio de cultivo TSC-1 se pesaron 40 g del medio comercial TSA y se le añadieron 5 g de NaCl para llevarlo a una concentración final del 1%. A la mezcla se le añadió 1 L de agua destilada, se agitó y se autoclavó durante 20 min a 121 °C.

3. Preparación de medio Luria Bertani (LB)

Se utilizó el medio de cultivo comercial de Pronadisa, que integra los siguientes componentes:

Componente del medio LB	g/L de medio
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Agar	15
NaCl	5

Para preparar 1 L de medio de cultivo LB se pesaron 35 g del medio comercial LB y se les añadió 1 L de agua destilada, esterilizándolo en autoclave a 121 °C durante 20 min.

4. Preparación de medio de cultivo CAS sólido (500 mL):

Disolución 1:

1. 50 mL de MM9 10X
2. 400 mL H₂O (d)
3. pH a 6,8 (con NaOH 5N)
4. 7,5 g de agarosa

Para preparar 1 litro de MM9 10X

3 g KH₂PO₄

50 g NaCl

10 g NH₄Cl

209 g MOPS

Disolución 2:

1. 25 mL CAS (de una disolución stock de 1,2 mg mL⁻¹)
2. 5 mL HDMTA (Sigma) (de una disolución stock de 7,2 mg mL⁻¹)
3. 500 µL FeCl₃ 10 mM preparado en 10 mM HCl
4. 2 mL de H₂O

Se autoclavan las dos disoluciones a 121 °C durante 15 min, se mezclan y se les añaden:

1. Sales CaCl₂ 0,1 M 500 µL, MgSO₄ 500µL
2. 10 mL de una solución de glucosa al 25%
3. 10 mL de casaminoácidos al 10%

5. Preparación del medio de cultivo mínimo CM9

Para preparar un litro de medio CM9 se esterilizaron en un autoclave 879 mL de agua destilada, y a continuación se añadieron las siguientes disoluciones: 100 mL de sales M9 10X*, 10 mL de glucosa al 50%, 10 mL de casaminoácidos (Difco) al 20% y 1 mL de CaCl₂ 0,01M- MgSO₄ 0,1 M. Las sales M9 y la disolución de CaCl₂-MgSO₄ se esterilizaron en el autoclave; los casaminoácidos y la glucosa se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,2 µm (Milipore).

*Sales M9 10X: 60 g de Na₂PO₄H, 30 g de KPO₄H₂, 50 g de NaCl, y 10 g de NH₄Cl.

6. Preparación de un medio con gradiente de antibiótico en placa.

El gradiente de antibiótico en placa se obtuvo extendiendo una capa inicial de 10 mL de medio LB en una placa petri, permitiendo que se enfriara con uno de sus extremos elevados. Una vez frío, se volvió a nivelar la placa y se le añadió una segunda capa de 10 mL de medio LB con rifampicina a una concentración final de 100 µg mL⁻¹. De este modo, se consiguió un gradiente de antibiótico de 0 a 100 µg mL⁻¹ de un extremo a otro de la placa.

7. Preparación de medio agar cerebro corazón con un 1% de NaCl (BHIA-1).

Se utilizó el medio de cultivo comercial de Pronadisa, que integra los siguientes componentes:

Componente del medio BHIA	g/L de medio
Infusión de cerebro de ternera	20
Infusión de corazón de res	25
K ₂ PO ₄ H	2,5
D-Glucosa	2,0
NaCl	5
Agar	15

Para preparar 1 L de medio de cultivo BHIA se pesaron 52 g del medio comercial y se le añadieron 5 g de NaCl para llevarlo a una concentración final del 1%.

A la mezcla se le añadió 1 L de agua destilada, se agitó y se autoclavó durante 20 min a 121 °C.

8. Preparación de medio infusión cerebro corazón con un 1% de ClNa (BHI-1).

Se utilizó el medio de cultivo comercial de Pronadisa, que integra los siguientes componentes:

Componente del medio BHIA	g/L de medio
Infusión de cerebro de ternera	20
Infusión de corazón de res	25
K ₂ PO ₄ H	2,5
D-Glucosa	2,0
NaCl	5

Para preparar 1 L de medio de cultivo BHIA se pesaron 37 g del medio comercial, y se le añadieron 5 g de NaCl para llevarlo a una concentración final del 1%. A la mezcla se le añadió 1 L de agua destilada, se agitó y se autoclavó durante 20 min a 121 °C.

Bibliografía

- Abdul-Tehrani, H., Hudson, A.J., Chang, Y.S., Timms, A.R., Hawkins, C., Williams, J.M., Harrison, P.M., Guest, J.R. and Andrews, S.C. (1999) Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J Bacteriol* **181**: 1415-1428.
- Achenbach, L.A. and Yang, W. (1997) The *fur* gene from *Klebsiella pneumoniae*: characterization, genomic organization and phylogenetic analysis. *Gene* **185**: 201-207.
- Adams, T.J., Vartivarian, S., and Cowart, R.E. (1990) Iron acquisition systems of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **58**: 2715-2718.
- Agarwal, S., King, C.A., Klein, E.K., Soper, D.E., Rice, P.A., Wetzler, L.M., and Genco, C.A. (2005) The gonococcal Fur-regulated *tbpA* and *tbpB* genes are expressed during natural mucosal gonococcal infection. *Infect Immun* **73**: 4281-4287.
- Ahmed, A.M., Shinoda, S., and Shimamoto, T. (2005) A variant type of *Vibrio cholerae* SXT element in a multidrug-resistant strain of *Vibrio fluvialis*. *FEMS Microbiol Lett* **242**: 241-247.
- Akopyants, N.S., Fradkov, A., Diatchenko, L., Hill, J.E., Siebert, P.D., Lukyanov, S.A., Sverdlov, E.D., and Berg, D.E. (1998) PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13108-13113.
- Albrecht-Gary, A.M., and Crumbliss, A.L. (1998) Coordination chemistry of siderophores: thermodynamics and kinetics of iron chelation and release. *Met Ions Biol Syst* **35**: 239-327.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodriguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 215-237.
- Aoki, T., Ikeda, T., T., K., and Hirono, I. (1997) Rapid detection of the fish pathogenic bacterium *Pasteurella piscicida* by polymerase chain reaction targeting nucleotide sequences of the species-specific plasmid pZP1. *Fish Pathol.* **32**: 143-151.
- Archibald, F.S., and DeVoe, I.W. (1979) Removal of iron from human transferrin by *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Lett* **6**: 159-162.
- Archibald, F.S. (1983) *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiol Lett* **19**: 29-32.
- Arnold, F.H., and Haymore, B.L. (1991) Engineered metal-binding proteins: purification to protein folding. *Science* **252**: 1796-1797.
- Asato, J., and Kanaya, F. (2004) Fatal infection of the hand due to *Photobacterium damsela*: a case report. *Clin Infect Dis* **38**: 23.

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1995) *Current Protocols in Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K., and Hiramatsu, K. (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* **359**: 1819-1827.
- Bachmann, B.J. (1990) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol Rev* **54**: 130-197.
- Bagg, A., and Neilands, J.B. (1985) Mapping of a mutation affecting regulation of iron uptake systems in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **161**: 450-453.
- Bagg, A., and Neilands, J.B. (1987) Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol Rev* **51**: 509-518.
- Baichoo, N., and Helmann, J.D. (2002) Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* **184**: 5826-5832.
- Bakopoulos, V., Adams, A., and Richards, R.H. (1995) Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece, and comparison with strains from Japan, France and Italy. *J Fish Dis* **18**: 1-7.
- Bakopoulos, V., Adams, A., and Richards, R.H. (1997) The effect of iron limitation growth conditions on the cell and extracellular components of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *J Fish Dis* **20**: 297-305.
- Bakopoulos, V., Hanif, A., Poulos, K., Galeotti, M., Adams, A., and Dimitriadis, G.J. (2004) The effect of in vivo growth on the cellular and extracellular components of the marine bacterial pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J Fish Dis* **27**: 1-13.
- Balebona, M.C., Morinigo, M.A., Sedano, J., Martínez-Manzanares, E., Vidaurreta, A., Borrego, J.J., and Toranzo, A.E. (1992) Isolation of *Pasteurella piscicida* from sea bass in southwestern Spain. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* **12**: 1-3.
- Baptista, T., Romalde, J.L., and Toranzo, A.E. (1996) First epizootic of pasteurellosis in Portugal affecting cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **16**: 92-95.
- Bates, G.W., Billups, C., and Saltman, P. (1967) The kinetics and mechanism of iron (3) exchange between chelates and transferrin. I. The complexes of citrate and nitrilotriacetic acid. *J Biol Chem* **242**: 2810-2815.
- Baudin Laurencin, F., J.F., P., and J.C., R. (1991) First observation of an epizootic of pasteurellosis in farmed and wild fish on the french mediterranean coasts. Abstr. 5th Int. Conf. Eur. Assoc. Fish Pathol. Budapest. Hungria pp:17.

- Beaber, J.W., Burrus, V., Hochhut, B., and Waldor, M.K. (2002a) Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements: definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants. *Cell Mol Life Sci* **59**: 2065-2070.
- Beaber, J.W., Hochhut, B., and Waldor, M.K. (2002b) Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **184**: 4259-4269.
- Bearden, S.W., Fetherston, J.D., and Perry, R.D. (1997) Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. *Infect Immun* **65**: 1659-1668.
- Bearson, S., Bearson, B., and Foster, J.W. (1997) Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **147**: 173-180.
- Behr, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S., and Small, P.M. (1999) Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* **284**: 1520-1523.
- Belanger, M., Begin, C., and Jacques, M. (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect Immun* **63**: 656-662.
- Bereswill, S., Greiner, S., van Vliet, A.H., Waidner, B., Fassbinder, F., Schiltz, E., Kusters, J.G., and Kist, M. (2000) Regulation of ferritin-mediated cytoplasmic iron storage by the ferric uptake regulator homolog (Fur) of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **182**: 5948-5953.
- Bezkorovainy, A., Solberg, L., Poch, M., and Miller-Catchpole, R. (1987) Ferrous iron uptake by *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*: the effect of metals and metabolic inhibitors. *Int J Biochem* **19**: 517-522.
- Bijlsma, J.J., Waidner, B., Vliet, A.H., Hughes, N.J., Hag, S., Bereswill, S., Kelly, D.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Kist, M., and Kusters, J.G. (2002) The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance. *Infect Immun* **70**: 606-611.
- Bitter, W., Tommassen, J., and Weisbeek, P.J. (1993) Identification and characterization of the *exbB*, *exbD* and *tonB* genes of *Pseudomonas putida* WCS358: their involvement in ferric-pseudobactin transport. *Mol Microbiol* **7**: 117-130.
- Bjourson, A.J., Stone, C.E., and Cooper, J.E. (1992) Combined subtraction hybridization and polymerase chain reaction amplification procedure for isolation of strain-specific *Rhizobium* DNA sequences. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2296-2301.
- Bobrov, A.G., Geoffroy, V.A., and Perry, R.D. (2002) Yersiniabactin production requires the thioesterase domain of HMWP2 and YbtD, a putative phosphopantetheinylate transferase. *Infect Immun* **70**: 4204-4214.

- Bohnsack, J.F., Takahashi, S., Detrick, S.R., Pelinka, L.R., Hammitt, L.L., Aly, A.A., Whiting, A.A., and Adderson, E.E. (2001) Phylogenetic classification of serotype III group B *streptococci* on the basis of *hylB* gene analysis and DNA sequences specific to restriction digest pattern type III-3. *J Infect Dis* **183**: 1694-1697.
- Boltner, D., MacMahon, C., Pembroke, J.T., Strike, P., and Osborn, A.M. (2002) R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements. *J Bacteriol* **184**: 5158-5169.
- Boltner, D., and Osborn, A.M. (2004) Structural comparison of the integrative and conjugative elements R391, pMERPH, R997, and SXT. *Plasmid* **51**: 12-23.
- Bosch, M., Garrido, E., Llagostera, M., Perez de Rozas, A.M., Badiola, I., and Barbe, J. (2002) *Pasteurella multocida* *exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. *FEMS Microbiol Lett* **210**: 201-208.
- Bosch, M., Garrido, M.E., Perez de Rozas, A.M., Badiola, I., Barbe, J., and Llagostera, M. (2004) *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin- and haemoglobin-binding proteins. *Vet Microbiol* **99**: 103-112.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Braun, V. (1995) Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol Rev* **16**: 295-307.
- Braun, V., and Killmann, H. (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci* **24**: 104-109.
- Braun, V., and Braun, M. (2002) Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **529**: 78-85.
- Brown, N.F., Lew, A.E., and Beacham, I.R. (2000) Identification of new transposable genetic elements in *Burkholderia pseudomallei* using subtractive hybridisation. *FEMS Microbiol Lett* **183**: 73-79.
- Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P., and Helmann, J.D. (1998) *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol* **29**: 189-198.
- Buck, J.D., Overstrom, N.A., Patton, G.W., yerson, H.F., and Gorzelany, J.F. (1991) Bacteria associated with stranded cetaceans from the northeast USA and southwest Florida Gulf Coasts. *Dis Aquat Organ* **10**: 147-152.

- Bullen, J.J. (1981) The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis* **3**: 1127-1138.
- Bullen, J.J., Rogers, H.J., Spalding, P.B., and Ward, C.G. (2005) Iron and infection: the heart of the matter. *FEMS Immunol Med Microbiol* **43**: 325-330.
- Burrus, V., and Waldor, M.K. (2004) Formation of SXT tandem arrays and SXT-R391 hybrids. *J Bacteriol* **186**: 2636-2645.
- Butterton, J.R., Stoeber, J.A., Payne, S.M., and Calderwood, S.B. (1992) Cloning, sequencing, and transcriptional regulation of *viuA*, the gene encoding the ferric vibriobactin receptor of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **174**: 3729-3738.
- Byers, B.R., and Arceneaux, J.E. (1994) Iron acquisition and virulence of the bacterial genus *Aeromonas*. In *Biochemistry of metal micronutrients in the rhizosphere*. Manthey, J.A., Crowley, D.E. and Luster, D.G. (eds). Boca Raton, Fla: Lewis.
- Calderwood, S.B., and Mekalanos, J.J. (1987) Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *J Bacteriol* **169**: 4759-4764.
- Calderwood, S.B., and Mekalanos, J.J. (1988) Confirmation of the Fur operator site by insertion of a synthetic oligonucleotide into an operon fusion plasmid. *J Bacteriol* **170**: 1015-1017.
- Calia, K.E., Waldor, M.K., and Calderwood, S.B. (1998) Use of representational difference analysis to identify genomic differences between pathogenic strains of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **66**: 849-852.
- Camejo, G., Halberg, C., Manschik-Lundin, A., Hurt-Camejo, E., Rosengren, B., Olsson, H., Hansson, G.I., Forsberg, G.B., and Ylhen, B. (1998) Hemin binding and oxidation of lipoproteins in serum: mechanisms and effect on the interaction of LDL with human macrophages. *J Lipid Res* **39**: 755-766.
- Campoy, S., Jara, M., Busquets, N., de Rozas, A.M., Badiola, I., and Barbe, J. (2002) Intracellular cyclic AMP concentration is decreased in *Salmonella typhimurium* *fur* mutants. *Microbiology* **148**: 1039-1048.
- Carlsson, J., Hofling, J.F., and Sundqvist, G.K. (1984) Degradation of albumin, haemopexin, haptoglobin and transferrin, by black-pigmented *Bacteroides* species. *J Med Microbiol* **18**: 39-46.
- Carniel, E., Mazigh, D., and Mollaret, H.H. (1987) Correlation between the presence of two high molecular weight iron-regulated proteins and the virulence of *Yersinia*. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 259-265.
- Carniel, E., Guilvout, I., and Prentice, M. (1996) Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **178**: 6743-6751.

- Castro, C., Craig, S.P., and Castaneda, M. (1981) Genome organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **4**: 273-282.
- Ceschia, G., Quaglio, F., Giorgetti, G., Bertoja, G., and Bovo, G. (1991) Serious outbreak of pasteurellosis (*Pasteurella piscicida*) in euryhaline species along the Italian coasts. Abstr. 5th Int. Conf. Eur. Assoc. Fish Pathol. Budapest. Hungria pp:26.
- Chai, S., Welch, T.J., and Crosa, J.H. (1998) Characterization of the interaction between Fur and the iron transport promoter of the virulence plasmid in *Vibrio anguillarum*. *J Biol Chem* **273**: 33841-33847.
- Challis, G.L., and Ravel, J. (2000) Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. *FEMS Microbiol Lett* **187**: 111-114.
- Challis, G.L. (2005) A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* **6**: 601-611.
- Chasteen, N.D., and Harrison, P.M. (1999) Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J Struct Biol* **126**: 182-194.
- Chen, C.Y., Wu, K.M., Chang, Y.C., Chang, C.H., Tsai, H.C., Liao, T.L., Liu, Y.M., Chen, H.J., Shen, A.B., Li, J.C., Su, T.L., Shao, C.P., Lee, C.T., Hor, L.I., and Tsai, S.F. (2003) Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res* **13**: 2577-2587.
- Choi, J.Y., Sifri, C.D., Goumnerov, B.C., Rahme, L.G., Ausubel, F.M., and Calderwood, S.B. (2002) Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. *J Bacteriol* **184**: 952-961.
- Clarke, T.E., Tari, L.W., and Vogel, H.J. (2001) Structural biology of bacterial iron uptake systems. *Curr Top Med Chem* **1**: 7-30.
- Clarridge, J.E., and Zigelboim-Daum, S. (1985) Isolation and characterization of two hemolytic phenotypes of *Vibrio damsela* associated with a fatal wound infection. *J Clin Microbiol* **21**: 302-306.
- Colquhoun, D.J., and Sorum, H. (2002) Cloning, characterisation and phylogenetic analysis of the *fur* gene in *Vibrio salmonicida* and *Vibrio logei*. *Gene* **296**: 213-220.
- Cowart, R.E., and Foster, B.G. (1985) Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes*: minimum requirements and mechanism of acquisition. *J Infect Dis* **151**: 721-730.
- Coy, M., and Neilands, J.B. (1991) Structural dynamics and functional domains of the Fur protein. *Biochemistry* **30**: 8201-8210.

- Creelan, J.L., Bjourson, A.J., Meehan, B.M., and McCullough, S.J. (1999) Characterisation of strain-specific sequences from an abortifacient strain of ovine *Chlamydia psittaci* using subtraction hybridisation. *FEMS Microbiol Lett* **171**: 17-25.
- Cronje, L., and Bornman, L. (2005) Iron overload and tuberculosis: a case for iron chelation therapy. *Int J Tuberc Lung Dis* **9**: 2-9.
- Crosa, J.H., Hodges, L.L., and Schiewe, M.H. (1980) Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect Immun* **27**: 897-902.
- Crosa, J.H. (1997) Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 319-336.
- Crosa, J.H., and Walsh, C.T. (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 223-249.
- Davies, J. (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**: 375-382.
- De Ley, J. (1990) Inter- and intrafamilial similarities of rRNA cistrons of the *Pasteurellaceae*. *Int J Syst Bacteriol* **40**: 126-137.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Giovannini, F., and Neilands, J.B. (1988) Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of *fur* gene in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **173**: 537-546.
- De Saizieu, A., Certa, U., Warrington, J., Gray, C., Keck, W., and Mous, J. (1998) Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* **16**: 45-48.
- Deneer, H.G., Healey, V., and Boychuk, I. (1995) Reduction of exogenous ferric iron by a surface-associated ferric reductase of *Listeria* spp. *Microbiology* **141**: 1985-1992.
- DeShazer, D. (2004) Genomic Diversity of *Burkholderia pseudomallei* Clinical Isolates: Subtractive Hybridization Reveals a *Burkholderia mallei*-Specific Prophage in *B. pseudomallei* 1026b. *J Bacteriol* **186**: 3938-3950.
- Di Lorenzo, M., Stork, M., Tolmasky, M.E., Actis, L.A., Farrell, D., Welch, T.J., Crosa, L.M., Wertheimer, A.M., Chen, Q., Salinas, P., Waldbeser, L., and Crosa, J.H. (2003) Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain 775. *J Bacteriol* **185**: 5822-5830.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., and Siebert, P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6025-6030.

- Do Vale, A., Ellis, A.E., and Silva, M.T. (2001) Electron microscopic evidence that expression of capsular polysaccharide by *Photobacterium damsela* subsp. piscicida is dependent on iron availability and growth phase. *Dis Aquat Organ* **44**: 237-240.
- Do Vale, A., Magariños, B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Ellis, A.E., and Toranzo, A.E. (2002) Binding of haemin by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. piscicida. *Dis Aquat Organ* **48**: 109-115.
- Do Vale, A., Silva, M.T., dos Santos, N.M., Nascimento, D.S., Reis-Rodrigues, P., Costa-Ramos, C., Ellis, A.E., and Azevedo, J.E. (2005) AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. piscicida with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Mol Microbiol* **58**: 1025-1038.
- Donadio, S., Staver, M.J., McAlpine, J.B., Swanson, S.J., and Katz, L. (1991) Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* **252**: 675-679.
- Donell Mc, M.T., and Colwell, R.R. (1985) Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst Appl Microbiol* **6**: 171-182.
- Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1991) Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* **59**: 4310-4317.
- Dorsey, C.W., Tomaras, A.P., Connerly, P.L., Tolmasky, M.E., Crosa, J.H., and Actis, L.A. (2004) The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology* **150**: 3657-3667.
- Drechsel, H., and Winkelmann, G. (1997) Transition Metals in Microbial Systems. Winkelmann, G. and Carrano, C.J. (eds). Amsterdam: Harwood Academic.
- Dubrac, S., and Touati, D. (2000) Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J Bacteriol* **182**: 3802-3808.
- Dubrac, S., and Touati, D. (2002) Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**: 147-156.
- Earhart, C.F. (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*: celular and molecular biology. Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. and Umhaeager, H.E. (eds). Washington D.C, 1075.
- Eberspächer, B., and Braun, V. (1980) The involvement of cytochromes in the uptake of ferrichrome by *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* **7**: 61-64.

- Economou, A., Pogliano, J.A., Beckwith, J., Oliver, D.B., and Wickner, W. (1995) SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* **83**: 1171-1181.
- El-Adhami, W. (1999) Expression of a clone specific DNA sequence from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **73**: 181-184.
- El-Adhami, W.A., Stewart, P.R., and Matthaei, K.I. (1997) The isolation and cloning of chromosomal DNA specific for a clonal population of *Staphylococcus aureus* by subtractive hybridisation. *J Med Microbiol* **46**: 987-997.
- Elkins, C., Chen, C.J., and Thomas, C.E. (1995) Characterization of the hgbA locus encoding a hemoglobin receptor from *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun* **63**: 2194-2200.
- Elkins, C., Totten, P.A., Olsen, B., and Thomas, C.E. (1998) Role of the *Haemophilus ducreyi* Ton system in internalization of heme from hemoglobin. *Infect Immun* **66**: 151-160.
- Ernst, J.F., Bennett, R.L., and Rothfield, L.I. (1978) Constitutive expression of the iron-enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **135**: 928-934.
- Escolar, L., Perez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (1998) Binding of the Fur (Ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol* **283**: 537-547.
- Escolar, L., Perez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**: 6223-6229.
- Evans, E.W., Crawley, J.B., Joannou, C., and Sharma, N. (1999) Iron proteins in iron infection. Bullen, J.J. and Griffiths, E. (eds). Chichester: John Wiley & Sons.
- Faraldo-Gomez, J.D., and Sansom, M.S. (2003) Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 105-116.
- Farrell, D.H., Mikesell, P., Actis, L.A., and Crosa, J.H. (1990) A regulatory gene, *angR*, of the iron uptake system of *Vibrio anguillarum*: similarity with phage P22 *cro* and regulation by iron. *Gene* **86**: 45-51.
- Fath, M.J., and Kolter, R. (1993) ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev* **57**: 995-1017.
- Fetherston, J.D., Bearden, S.W., and Perry, R.D. (1996) YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. *Mol Microbiol* **22**: 315-325.
- Fetherston, J.D., Bertolino, V.J., and Perry, R.D. (1999) YbtP and YbtQ: two ABC transporters required for iron uptake in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol* **32**: 289-299.

- Finlay, B.B., and Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 136-169.
- Fouz, B., Larsen, B., Nielsen, J.L., Barja, J.I., and Toranzo, A.E. (1992) Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from *Scophthalmus maximus* in Spain. *Dis Aquat Organ* **12**: 155-166.
- Fouz, B., Toranzo, A.E., Biosca, E.G., Mazoy, R., and Amaro, C. (1994) Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. *FEMS Microbiol Lett* **121**: 181-188.
- Fouz, B., Mazoy, R., Lemos, M.L., del Olmo, M.J., and Amaro, C. (1996) Utilization of hemin and hemoglobin by *Vibrio vulnificus* biotype 2. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2806-2810.
- Fouz, B., Biosca, E.G., and Amaro, C. (1997) High affinity iron-uptake systems in *Vibrio damsela*: role in the acquisition of iron from transferrin. *J Appl Microbiol* **82**: 157-167.
- Franza, T., Sauvage, C., and Expert, D. (1999) Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937: role of the Fur repressor protein. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 119-128.
- Fraser, C.M. (2000) Microbial genome sequencing: new insights into physiology and evolution. *Novartis Found Symp* **229**: 54-58.
- Frechon, D., and Le Cam, E. (1994) Fur (ferric uptake regulation) protein interaction with target DNA: comparison of gel retardation, footprinting and electron microscopy analyses. *Biochem Biophys Res Commun* **201**: 346-355.
- Frerichs, G.N., and Roberts, R.J. (1989) The bacteriology of teleosts. In *Fish Pathology*. Roberts, R.J. (ed). London: Bailliere Tindall, pp. 289-319.
- Frost, G.E., and Rosenberg, H. (1973) The inducible citrate-dependent iron transport system in *Escherichia coli* K12. *Biochim Biophys Acta* **330**: 90-101.
- Fryer, J.L., and Rohovec, J.S. (1984) Principal bacterial diseases of cultured marine fish. *Helgoländer Meeresunters* **37**: 533-545.
- Fuangthong, M., and Helmann, J.D. (2003) Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**: 6348-6357.
- Fukuda, Y., and Kusuda, R. (1981) Efficacy of vaccination for pseudotuberculosis in cultured yellowtail by various routes of administration. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **47**: 147-150.
- Furano, K., and Campagnari, A.A. (2003) Inactivation of the *Moraxella catarrhalis* 7169 ferric uptake regulator increases susceptibility to the bactericidal activity of normal human sera. *Infect Immun* **71**: 1843-1848.

- Furrer, J.L., Sanders, D.N., Hook-Barnard, I.G., and McIntosh, M.A. (2002) Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter. *Mol Microbiol* **44**: 1225-1234.
- Galbraith, E.A., Antonopoulos, D.A., and White, B.A. (2004) Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model. *Environ Microbiol* **6**: 928-937.
- Gallegos, M.T., Michan, C., and Ramos, J.L. (1993) The XylS/AraC family of regulators. *Nucleic Acids Res* **21**: 807-810.
- Gaudu, P., and Weiss, B. (2000) Flavodoxin mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **182**: 1788-1793.
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J.L., Gauthier, M., and Christen, R. (1995) Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko *et al.*) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 139-144.
- Gehring, A.M., DeMoll, E., Fetherston, J.D., Mori, I., Mayhew, G.F., Blattner, F.R., Walsh, C.T., and Perry, R.D. (1998) Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chem Biol* **5**: 573-586.
- Genco, C.A., Chen, C.Y., Arko, R.J., Kapczynski, D.R., and Morse, S.A. (1991) Isolation and characterization of a mutant of *Neisseria gonorrhoeae* that is defective in the uptake of iron from transferrin and haemoglobin and is avirulent in mouse subcutaneous chambers. *J Gen Microbiol* **137**: 1313-1321.
- Genco, C.A., and Dixon, D.W. (2001) Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol* **39**: 1-11.
- Geoffroy, V.A., Fetherston, J.D., and Perry, R.D. (2000) *Yersinia pestis* YbtU and YbtT are involved in synthesis of the siderophore yersiniabactin but have different effects on regulation. *Infect Immun* **68**: 4452-4461.
- Goebel, B.M., and Stackebrandt, E. (1994) Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1614-1621.
- Goldberg, M.B., DiRita, V.J., and Calderwood, S.B. (1990) Identification of an iron-regulated virulence determinant in *Vibrio cholerae*, using TnphoA mutagenesis. *Infect Immun* **58**: 55-60.
- Gonzalez de Peredo, A., Saint-Pierre, C., Latour, J.M., Michaud-Soret, I., and Forest, E. (2001) Conformational changes of the ferric uptake regulation protein upon metal activation and DNA binding; first evidence of structural homologies with the diphtheria toxin repressor. *J Mol Biol* **310**: 83-91.

- Graham, M.R., and Lo, R.Y. (1997) Cloning and characterization of the *exbB-exbD-tonB* locus of *Pasteurella haemolytica* A1. *Gene* **186**: 201-205.
- Griffiths, B.B. (1989) Iron and glucose affecting growth and haemolysin production in human strains of group B *Streptococci*. *microbios* **58**: 135-146.
- Griffiths, E. (1983) Bacterial adaption to a low-iron environment. In *Microbiology*. schlessinger, D. (ed). Washington DC: American Society for Microbiology, pp. 329-333.
- Griffiths, E. (1987) Iron in biological systems. In *Iron and infection*. Vol. 1. Bullen, J.J. and Griffiths, E. (eds), pp. 1-25.
- Griffiths, E. (1999) Iron in biological systems. In *Iron and infection. Molecular, Physiological and Clinical Aspects*. Bullen, J.J. and Griffiths, E. (eds). Wiley, Chichester, pp. 1-26.
- Groisman, E.A., and Ochman, H. (1997) How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* **5**: 343-349.
- Guerinot, M.L., Meidl, E.J., and Plessner, O. (1990) Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **172**: 3298-3303.
- Guilvout, I., Mercereau-Puijalon, O., Bonnefoy, S., Pugsley, A.P., and Carniel, E. (1993) High-molecular-weight protein 2 of *Yersinia enterocolitica* is homologous to AngR of *Vibrio anguillarum* and belongs to a family of proteins involved in nonribosomal peptide synthesis. *J Bacteriol* **175**: 5488-5504.
- Gurskaya, N.G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P.D., Khaspekov, G.L., Lukyanov, K.A., Vagner, L.L., Ermolaeva, O.D., Lukyanov, S.A., and Sverdlov, E.D. (1996) Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* **240**: 90-97.
- Guyton, A.S. (1994) *Fisiología and Fisiopatología*: Interamericana Mc.Graw-Hill.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Hochhut, B., and Dobrindt, U. (2003) The molecular basis of infectious diseases: pathogenicity islands and other mobile genetic elements. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* **50**: 321-330.
- Hall, H.K., and Foster, J.W. (1996) The role of *fur* in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J Bacteriol* **178**: 5683-5691.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**: 1-14.

- Hamed, M.Y. (1993) Binding of the ferric uptake regulation repressor protein (Fur) to Mn(II), Fe(II), Co(II), and Cu(II) ions as co-repressors: electronic absorption, equilibrium, and ^{57}Fe Mossbauer studies. *J Inorg Biochem* **50**: 193-210.
- Hantke, K. (1984) Cloning of the repressor protein gene of iron-regulated systems in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **197**: 337-341.
- Hantke, K. (1987) Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K 12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol Gen Genet* **210**: 135-139.
- Hantke, K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**: 172-177.
- Hantke, K. (2003) Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends Microbiol* **11**: 192-195.
- Harding, R.A., and Royt, P.W. (1990) Acquisition of iron from citrate by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* **136**: 1859-1867.
- Harrison, P.M., and Arosio, P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* **31**: 161-203.
- Harvie, D.R., Vilchez, S., Steggles, J.R., and Ellar, D.J. (2005) *Bacillus cereus* Fur regulates iron metabolism and is required for full virulence. *Microbiology* **151**: 569-577.
- Hawke, J.P., Plakas, S.M., Minton, R.V., McPhearson, R.M., Snider, T.G., and Guarino, A.M. (1987) Fish pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal Alabama. *Aquaculture* **65**: 193-204.
- Heidrich, C., Hantke, K., Bierbaum, G., and Sahl, H.G. (1996) Identification and analysis of a gene encoding a Fur-like protein of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* **140**: 253-259.
- Held, K.G., and Postle, K. (2002) ExbB and ExbD do not function independently in TonB-dependent energy transduction. *J Bacteriol* **184**: 5170-5173.
- Heller, K.J., Kadner, R.J., and Gunther, K. (1988) Suppression of the *btuB451* mutation by mutations in the *tonB* gene suggests a direct interaction between TonB and TonB-dependent receptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Gene* **64**: 147-153.
- Henderson, D.P., and Payne, S.M. (1993) Cloning and characterization of the *Vibrio cholerae* genes encoding the utilization of iron from haemin and haemoglobin. *Mol Microbiol* **7**: 461-469.
- Henderson, D.P., and Payne, S.M. (1994a) *Vibrio cholerae* iron transport systems: roles of heme and siderophore iron transport in virulence and identification of a gene associated with multiple iron transport systems. *Infect Immun* **62**: 5120-5125.

- Henderson, D.P., and Payne, S.M. (1994b) Characterization of the *Vibrio cholerae* outer membrane heme transport protein HutA: sequence of the gene, regulation of expression, and homology to the family of TonB-dependent proteins. *J Bacteriol* **176**: 3269-3277.
- Henderson, D.P., Wyckoff, E.E., Rashidi, C.E., Verlei, H., and Oldham, A.L. (2001) Characterization of the *Plesiomonas shigelloides* genes encoding the heme iron utilization system. *J Bacteriol* **183**: 2715-2723.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**: 6557-6567.
- Higgs, P.I., Myers, P.S., and Postle, K. (1998) Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *J Bacteriol* **180**: 6031-6038.
- Hochhut, B., and Waldor, M.K. (1999) Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into prfC. *Mol Microbiol* **32**: 99-110.
- Hori, K., Yamamoto, Y., Tokita, K., Saito, F., Kurotsu, T., Kanda, M., Okamura, K., Furuyama, J., and Saito, Y. (1991) The nucleotide sequence for a proline-activating domain of gramicidin S synthetase 2 gene from *Bacillus brevis*. *J Biochem* **110**: 111-119.
- Horsburgh, M.J., Ingham, E., and Foster, S.J. (2001) In *Staphylococcus aureus*, fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J Bacteriol* **183**: 468-475.
- Huang, W., Jia, J., Edwards, P., Dehesh, K., Schneider, G., and Lindqvist, Y. (1998) Crystal structure of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *E.coli* reveals the molecular architecture of condensing enzymes. *Embo J* **17**: 1183-1191.
- Jacobsen, I., Gerstenberger, J., Gruber, A.D., Bosse, J.T., Langford, P.R., Hennig-Pauka, I., Meens, J., and Gerlach, G.F. (2005) Deletion of the ferric uptake regulator Fur impairs the in vitro growth and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **73**: 3740-3744.
- Janssen, W.A., and Surgalla, M.J. (1968) Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch. (*Roccus americanus*). *J Bacteriol* **96**: 1606-1610.
- Jarosik, G.P., Sanders, J.D., Cope, L.D., Muller-Eberhard, U., and Hansen, E.J. (1994) A functional tonB gene is required for both utilization of heme and virulence expression by *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun* **62**: 2470-2477.

- Jelinek, W.R., and Schmid, C.W. (1982) Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Annu Rev Biochem* **51**: 813-844.
- Jin, Q., Yuan, Z., Xu, J., Wang, Y., Shen, Y., Lu, W., Wang, J., Liu, H., Yang, J., Yang, F., Zhang, X., Zhang, J., Yang, G., Wu, H., Qu, D., Dong, J., Sun, L., Xue, Y., Zhao, A., Gao, Y., Zhu, J., Kan, B., Ding, K., Chen, S., Cheng, H., Yao, Z., He, B., Chen, R., Ma, D., Qiang, B., Wen, Y., Hou, Y., and Yu, J. (2002) Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Res* **30**: 4432-4441.
- Karjalainen, T.K., Evans, D.G., Evans, D.J., Jr., Graham, D.Y., and Lee, C.H. (1991) Iron represses the expression of CFA/I fimbriae of enterotoxigenic *E. coli*. *Microb Pathog* **11**: 317-323.
- Karlsson, M., Hannavy, K., and Higgins, C.F. (1993) ExbB acts as a chaperone-like protein to stabilize TonB in the cytoplasm. *Mol Microbiol* **8**: 389-396.
- Kato-Maeda, M., Rhee, J.T., Gingeras, T.R., Salamon, H., Drenkow, J., Smittipat, N., and Small, P.M. (2001) Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* **11**: 547-554.
- Kawakami, H., Suzukawa, K., Yamashita, H., Kohno, Y., Kono, T., and Sakai, M. (1999) Mass mortality of wild largescale blackfish *Girella punstata* caused by *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Fish Pathol.* **34**: 87-88.
- Kersulyte, D., Mukhopadhyay, A.K., Shirai, M., Nakazawa, T., and Berg, D.E. (2000) Functional organization and insertion specificity of IS607, a chimeric element of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **182**: 5300-5308.
- Kim, E., and Aoki, T. (1993) The structure of the chloramphenicol resistance gene on a transferable R plasmid from the fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiol Immunol* **37**: 705-712.
- Kim, E., and Aoki, T. (1996a) Sequence analysis of the florfenicol resistance gene encoded in the transferable R-plasmid of a fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiol Immunol* **40**: 665-669.
- Kim, E.H., and Aoki, T. (1994) The transposon-like structure of IS26-tetracycline, and kanamycin resistance determinant derived from transferable R plasmid of fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiol Immunol* **38**: 31-38.
- Kim, E.H., and Aoki, T. (1996b) Sulfonamide resistance gene in a transferable R plasmid of *Pasteurella piscicida*. *Microbiol Immunol* **40**: 397-399.
- Kimura, T., and Kitao, T. (1971) On the causative agent of tuberculosis of yellowtail. *Fish Pathol.* **6**: 8-14.
- King, G., and Murray, N.E. (1994) Restriction enzymes in cells, not eppendorfs. *Trends Microbiol* **2**: 465-469.

- King, N.D., Kirby, A.E., and Connell, T.D. (2005) Transcriptional control of the *rhuIR-bhuRSTUV* heme acquisition locus in *Bordetella avium*. *Infect Immun* **73**: 1613-1624.
- Kingsley, R., Rabsch, W., Stephens, P., Roberts, M., Reissbrodt, R., and Williams, P.H. (1995) Iron supplying systems of *Salmonella* in diagnostics, epidemiology and infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **11**: 257-264.
- Kitao, T., and kimura, M. (1974) Rapid diagnosis of pseudotuberculosis in yellowtail by means of the fluorescent antibody technique. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **40**: 889-893.
- Koebnik, R., Hantke, K., and Braun, V. (1993) The TonB-dependent ferrichrome receptor FcuA of *Yersinia enterocolitica*: evidence against a strict co-evolution of receptor structure and substrate specificity. *Mol Microbiol* **7**: 383-393.
- Kooi, C., and Sokol, P.A. (1995) Characterization of monoclonal antibodies to *Yersinia enterocolitica* iron-regulated proteins. *Can J Microbiol* **41**: 562-571.
- Koster, W. (2001) ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol* **152**: 291-301.
- Koster, W.L., Actis, L.A., Waldbeser, L.S., Tolmasky, M.E., and Crosa, J.H. (1991) Molecular characterization of the iron transport system mediated by the pJM1 plasmid in *Vibrio anguillarum* 775. *J Biol Chem* **266**: 23829-23833.
- Kusuda, R., Kawai, K., and Matsui, M. (1978) Etiological studies on bacterial pseudotuberculosis in cultured yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the causative agent. II. On the serological properties. *Fish Pathol.* **13**: 79-83.
- Kusuda, R., and Fukuda, Y. (1980) Agglutinating antibody titers and serum protein changes of yellowtail after immunization with *Pasteurella piscicida* cells. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **46**: 103-108.
- Kusuda, R., and Hamaguchi, M. (1988) The efficacy of attenuated live bacterin of *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in yellowtail. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **8**: 51-53.
- Kusuda, R., and Salati, F. (1993) Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Annual Review of Fish Diseases* **3**: 69-85.
- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132.
- Lai, Y.C., Yang, S.L., Peng, H.L., and Chang, H.Y. (2000) Identification of genes present specifically in a virulent strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* **68**: 7149-7151.

- Lam, M.S., Litwin, C.M., Carroll, P.A., and Calderwood, S.B. (1994) *Vibrio cholerae fur* mutations associated with loss of repressor activity: implications for the structural-functional relationships of fur. *J Bacteriol* **176**: 5108-5115.
- Larsen, R.A., Wood, G.E., and Postle, K. (1993) The conserved proline-rich motif is not essential for energy transduction by *Escherichia coli* TonB protein. *Mol Microbiol* **10**: 943-953.
- Lawrence, J.G., Dykhuizen, D.E., DuBose, R.F., and Hartl, D.L. (1989) Phylogenetic analysis using insertion sequence fingerprinting in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **6**: 1-14.
- Lee, B.C. (1995) Quelling the red menace: haem capture by bacteria. *Mol Microbiol* **18**: 383-390.
- Lerat, E., and Ochman, H. (2005) Recognizing the pseudogenes in bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **33**: 3125-3132.
- Letoffe, S., Ghigo, J.M., and Wandersman, C. (1994) Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 9876-9880.
- Letoffe, S., Deniau, C., Wolff, N., Dassa, E., Delepelaire, P., Lecroisey, A., and Wandersman, C. (2001) Haemophore-mediated bacterial haem transport: evidence for a common or overlapping site for haem-free and haem-loaded haemophore on its specific outer membrane receptor. *Mol Microbiol* **41**: 439-450.
- Lewis, D.H., Grumbles, L.C., and McConnell, S. (1970) *Pasteurella*-like bacteria from an epizootic in menhaden and mullet in Galveston bay. *Wildl Dis* **6**: 160-162.
- Light, P.A., and Clegg, R.A. (1974) Metabolism in iron-limited growth. In *Microbial iron metabolism*. Vol. 2. Neilands, J.B. (ed), pp. 35-64.
- Lillard, J.W., Jr., Bearden, S.W., Fetherston, J.D., and Perry, R.D. (1999) The haemin storage (Hms⁺) phenotype of *Yersinia pestis* is not essential for the pathogenesis of bubonic plague in mammals. *Microbiology* **145**: 197-209.
- Lindsay, J.A., Ruzin, A., Ross, H.F., Kurepina, N., and Novick, R.P. (1998) The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **29**: 527-543.
- Litwin, C.M., Boyko, S.A., and Calderwood, S.B. (1992) Cloning, sequencing, and transcriptional regulation of the *Vibrio cholerae fur* gene. *J Bacteriol* **174**: 1897-1903.
- Litwin, C.M., and Calderwood, S.B. (1993a) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **6**: 137-149.

- Litwin, C.M., and Calderwood, S.B. (1993b) Cloning and genetic analysis of the *Vibrio vulnificus fur* gene and construction of a *fur* mutant by in vivo marker exchange. *J Bacteriol* **175**: 706-715.
- Litwin, C.M., and Byrne, B.L. (1998) Cloning and characterization of an outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* required for heme utilization: regulation of expression and determination of the gene sequence. *Infect Immun* **66**: 3134-3141.
- Litwin, C.M., and Quackenbush, J. (2001) Characterization of a *Vibrio vulnificus* LysR homologue, HupR, which regulates expression of the haem uptake outer membrane protein, HupA. *Microb Pathog* **31**: 295-307.
- Love, M., Fisher, D.T., Hose, J.E., Farmer, J.J., Hickman, F.W., and Fanning, G.R. (1981) *Vibrio damsela* as a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science* **214**: 1140-1141.
- Lupski, J.R., and Weinstock, G.M. (1992) Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol* **174**: 4525-4529.
- Magariños, B., Romalde, J.L., Bandin, I., Fouz, B., and Toranzo, A.E. (1992a) Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Appl Environ Microbiol* **58**: 3316-3322.
- Magariños, B., Santos, Y., Romalde, J.L., Rivas, C., Barja, J.L., and Toranzo, A.E. (1992b) Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *J Gen Microbiol* **138**: 2491-2498.
- Magariños, B., Noya, M., Romalde, J.L., Perez, G., and Toranzo, A.E. (1994a) Influence of fish size and vaccine formulation on the protection of gilthead seabream against *Pasteurella piscicida*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **14**: 120-122.
- Magariños, B., Romalde, J.L., Barja, J.L., and Toranzo, A.E. (1994b) Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. *Appl Environ Microbiol* **60**: 180-186.
- Magariños, B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Barja, J.L., and Toranzo, A.E. (1994c) Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2990-2998.
- Magariños, B., Toranzo, A.E., and Romalde, J.L. (1995) Different susceptibility of gilthead seabream and turbot to *Pasteurella piscicida* infection by the water route. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **15**: 88-90.
- Magariños B. (1995), Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela.
- Magariños, B., Bonet, R., Romalde, J.L., Martinez, M.J., Congregado, F., and Toranzo, A.E. (1996a) Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microb Pathog* **21**: 289-297.

- Magariños, B., Romalde, J.L., Noya, M., Barja, J.L., and Toranzo, A.E. (1996b) Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiol Lett* **138**: 29-34.
- Magariños, B., Toranzo, A.E., and Romalde, J.L. (1996c) Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annu Rev Fish Dis* **6**: 41-46.
- Magariños, B., Osorio, C.R., Toranzo, A.E., and Romalde, J.L. (1997) Applicability of ribotyping for intraspecific classification and epidemiological studies of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Syst Appl Microbiol* **20**: 634-639.
- Magariños, B., Romalde, J.L., Barja, J.L., Nunez, S., and Toranzo, A.E. (1999) Protection of gilthead seabream against pasteurellosis at the larval stages. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **19**: 159-161.
- Magariños, B., Toranzo, A.E., Barja, J.L., and Romalde, J.L. (2000) Existence of two geographically-linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* evidenced by random amplified polymorphic DNA analysis. *Epidemiol Infect* **125**: 213-219.
- Magariños, B., Romalde, J.L., Lopez-Romalde, S., Moriñigo, M.A., and Toranzo, A.E. (2003) Pathobiological characterisation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **23**: 183-190.
- Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C., and Stover, C.K. (1996) Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* **178**: 1274-1282.
- Mahan, M.J., Slauch, J.M., and Mekalanos, J.J. (1993) Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* **259**: 686-688.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M., and Iida, T. (2003) Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* **361**: 743-749.
- Manting, E.H., and Driessen, A.J. (2000) *Escherichia coli* translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol Microbiol* **37**: 226-238.
- Masse, E., and Gottesman, S. (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4620-4625.
- Mazoy, R., Vazquez, F., and Lemos, M.L. (1996) Isolation of heme-binding proteins from *Vibrio anguillarum* using affinity chromatography. *FEMS Microbiol Lett* **141**: 19-23.

- Mazoy, R., Botana, L.M., and Lemos, M.L. (1997). Iron uptake from ferric citrate by *V. anguillarum*. *FEMS Microbiol Lett* **154**: 145-150.
- Mazoy, R., Osorio, C.R., Toranzo, A.E., and Lemos, M.L. (2003) Isolation of mutants of *Vibrio anguillarum* defective in haeme utilisation and cloning of *huvA*, a gene coding for an outer membrane protein involved in the use of haeme as iron source. *Arch Microbiol* **179**: 329-338.
- Mc Clintock, B. (1951) Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **16**: 13-47.
- McCandliss, R.J., and Hermann, K.M. (1978) Iron an essential element for biosynthesis of aromatic compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 4810-4813.
- McCarter, L., and Silverman, M. (1989) Iron regulation of swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **171**: 731-736.
- McGrath, B.M., and Pembroke, J.T. (2004) Detailed analysis of the insertion site of the mobile elements R997, pMERPH, R392, R705 and R391 in *E. coli* K12. *FEMS Microbiol Lett* **237**: 19-26.
- Messenger, A.J., and Ratledge, C. (1982) Iron transport in *Mycobacterium smegmatis*: Uptake of iron from ferric citrate. *J Bacteriol* **149**: 131-135.
- Mey, A.R., and Payne, S.M. (2001) Haem utilization in *Vibrio cholerae* involves multiple TonB-dependent haem receptors. *Mol Microbiol* **42**: 835-849.
- Miller, J.H. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*. Plainview.N.Y.: Cold Spring Laboratory Press.
- Mira, A., Klasson, L., and yersson, G.S. (2002) Microbial genome evolution: sources of variability. *Curr Opin Microbiol* **5**: 506-512.
- Moeck, G.S., and Coulton, J.W. (1998) TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol* **28**: 675-681.
- Moffitt, M.C., and Neilan, B.A. (2000) The expansion of mechanistic and organismic diversity associated with non-ribosomal peptides. *FEMS Microbiol Lett* **191**: 159-167.
- Moran, N.A., and Plague, G.R. (2004) Genomic changes following host restriction in bacteria. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 627-633.
- Morton, D.J., and Williams, P. (1990) Siderophore-independent acquisition of transferrin-bound iron by *Haemophilus influenzae* type b. *J Gen Microbiol* **136**: 927-933.

- Morton, D.J., Whitby, P.W., Jin, H., Ren, Z., and Stull, T.L. (1999) Effect of multiple mutations in the hemoglobin- and hemoglobin-haptoglobin-binding proteins, HgpA, HgpB, and HgpC, of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun* **67**: 2729-2739.
- Mouriño, S., Osorio, C.R., and Lemos, M.L. (2004) Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **186**: 6159-6167.
- Muroga, K., Sugiyama, T., and Ueki, N. (1977) Pasteurellosis in cultured black seabream, *Mylio macrocephalus*. *J. Fac. Fish. Anim. Hiroshima Univ.* **16**: 17-21.
- Murray, A.E., Lies, D., Li, G., Nealson, K., Zhou, J., and Tiedje, J.M. (2001) DNA/DNA hybridization to microarrays reveals gene-specific differences between closely related microbial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9853-9858.
- Nau, C.D., and Konisky, J. (1989) Evolutionary relationship between the TonB-dependent outer membrane transport proteins: nucleotide and amino acid sequences of the *Escherichia coli* colicin I receptor gene. *J Bacteriol* **171**: 1041-1047.
- Nearhos, S.P., and Fuerst, J.A. (1987) Reanalysis of 5S rRNA sequence data for the *Vibrionaceae*, with the clustan program suite. *Curr Microbiol* **15**: 329-335.
- Neilands, J.B. (1973) Chemistry of iron in biological systems. *Adv Exp Med Biol* **40**: 13-42.
- Neilands, J.B., Konopka, K., Schwyn, B., Coy, M., Francis, R.T., Paw, B.H., and Bagge, A. (1987) Iron transport in Microbes, Plants and animals. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Neilands, J.B. (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* **270**: 26723-26726.
- Nelson, J.S., Kawahara, E., Kawai, E., and Kusuda, R. (1989) Macrophage infiltration in pseudotuberculosis of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Bull. Mar. Sci. Fish Kochi Univ* **11**: 17-22.
- Nicolas, J.L., Gauthier, G., Orsini, L., and Corre, S. (1994) Use of 16S rRNA sequences for taxonomy and detection of pathogenic bacteria. 6th International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture. Montpellier, Francia.
- Nomura, J., and Aoki, T. (1985) Morphological analysis of lipopolisaccharide from gram negative fish pathogenic bacteria. *Fish Pathol.* **20**: 193-197.
- Noya, M., Magariños, B., Toranzo, A.E., and Lamas, J. (1995) Sequential pathology of experimental pasteurellosis in gilthead seabream *Sparus aurata*. A light- and electron- microscopic study. *Dis Aquat Organ* **21**: 177-186.

- O'Brien-Simpson, N.M., Veith, P.D., Dashper, S.G., and Reynolds, E.C. (2003) *Porphyromonas gingivalis* gingipains: the molecular teeth of a microbial vampire. *Curr Protein Pept Sci* **4**: 409-426.
- Occhino, D.A., Wyckoff, E.E., Henderson, D.P., Wrona, T.J., and Payne, S.M. (1998) *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of tonB, exbB, exbD genes. *Mol Microbiol* **29**: 1493-1507.
- Ochsner, U.A., and Vasil, M.L. (1996) Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4409-4414.
- Ohnishi, K., Watanabe, K., and Jo, Y. (1982) *Pasteurella* infection in young black seabream. *Fish Pathol.* **16**: 207-210.
- O'Malley, S.M., Mouton, S.L., Occhino, D.A., Deanda, M.T., Rashidi, J.R., Fuson, K.L., Rashidi, C.E., Mora, M.Y., Payne, S.M., and Henderson, D.P. (1999) Comparison of the heme iron utilization systems of pathogenic Vibrios. *J Bacteriol* **181**: 3594-3598.
- Osorio, C.R. (1999), Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela.
- Osorio, C.R., Collins, M.D., Toranzo, A.E., Barja, J.L., and Romalde, J.L. (1999) 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2942-2946.
- Osorio, C.R., and Klose, K.E. (2000) A region of the transmembrane regulatory protein ToxR that tethers the transcriptional activation domain to the cytoplasmic membrane displays wide divergence among *Vibrio* species. *J Bacteriol* **182**: 526-528.
- Osorio, C.R., Romalde, J.L., Barja, J.L., and Toranzo, A.E. (2000a) Presence of phospholipase-D (*dly*) gene coding for damselysin production is not a prerequisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Microb Pathog* **28**: 119-126.
- Osorio, C.R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., and Barja, J.L. (2000b) Multiplex PCR assay for *ureC* and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. *Dis Aquat Organ* **40**: 177-183.
- Osorio, C.R., and Lemos, M.L. (2002) Haeme iron acquisition mechanisms in *Vibrionaceae*. In *Recent Res. Devel. Microbiology*. Vol. 6. Trivandrum-695 023, Kerala, India: Research Signpost.
- Osorio, C.R. and Toranzo, A.E.(2002). Seafood safety and human health. Capítulo en: *Recent Advances in Marine Biotechnology* (vol. 7). Fingerman, N., and Nagabhushanam, R. (Eds). Science Publishers Inc., NH, USA. **7**: 253-310.

- Osorio, C.R., Collins, M.D., Romalde, J.L., and Toranzo, A.E. (2004a) Characterization of the 23S and 5S rRNA genes and 23S-5S intergenic spacer region (ITS-2) of *Photobacterium damsela*. *Dis Aquat Organ* **61**: 33-39.
- Osorio, C.R., Lemos, M.L., and Braun, V. (2004b) Identification of Fur regulated genes in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* using the Fur titration assay. *Biometals* **17**: 725-733.
- Osorio, C.R., Collins, M.D., Romalde, J.L., and Toranzo, A.E. (2005) Variation in 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions in *Photobacterium damsela*: a Mosaic-Like Structure. *Appl Environ Microbiol* **71**: 636-645.
- Panek, H., and O'Brian, M.R. (2002) A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology* **148**: 2273-2282.
- Panina, E.M., Mironov, A.A., and Gelfand, M.S. (2001) Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria. *Nucleic Acids Res* **29**: 5195-5206.
- Paoli, M., yerson, B.F., Baker, H.M., Morgan, W.T., Smith, A., and Baker, E.N. (1999) Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two beta-propeller domains. *Nat Struct Biol* **6**: 926-931.
- Pappenheimer, A.M., Jr (1955) The pathogenesis of diphteria. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **5**: 40-56.
- Parales, R.E., and Harwood, C.S. (1993) Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for gram- bacteria. *Gene* **133**: 23-30.
- Paustian, M.L., May, B.J., and Kapur, V. (2001) *Pasteurella multocida* gene expression in response to iron limitation. *Infect Immun* **69**: 4109-4115.
- Paustian, M.L., May, B.J., Cao, D., Boley, D., and Kapur, V. (2002) Transcriptional response of *Pasteurella multocida* to defined iron sources. *J Bacteriol* **184**: 6714-6720.
- Payne, S.M. (1989) Iron and virulence in *Shigella*. *Mol Microbiol* **3**: 1301-1306.
- Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C.A., Schubert, S., and Heesemann, J. (1998) The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J Bacteriol* **180**: 538-546.
- Pimpinelli, S., Berloco, M., Fanti, L., Dimitri, P., Bonaccorsi, S., Marchetti, E., Caizzi, R., Caggese, C., and Gatti, M. (1995) Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3804-3808.

- Pohl, E., Haller, J.C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E., and Vasil, M.L. (2003) Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* **47**: 903-915.
- Poole, K., and Braun, V. (1988) Iron regulation of *Serratia marcescens* hemolysin gene expression. *Infect Immun* **56**: 2967-2971.
- Poole, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D.E., and Dean, C.R. (1996) The *Pseudomonas aeruginosa tonB* gene encodes a novel TonB protein. *Microbiology* **142**: 1449-1458.
- Postle, K. (1990) TonB and the gram-negative dilemma. *Mol Microbiol* **4**: 2019-2025.
- Pradel, E., Guiso, N., Menozzi, F.D., and Locht, C. (2000) *Bordetella pertussis* TonB, a Bvg-independent virulence determinant. *Infect Immun* **68**: 1919-1927.
- Prado, M.E., Dabo, S.M., and Confer, A.W. (2005) Immunogenicity of iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* A:3 in cattle: molecular characterization of the immunodominant heme acquisition system receptor (HasR) protein. *Vet Microbiol* **105**: 269-280.
- Pressler, U., Staudenmaier, H., Zimmermann, L., and Braun, V. (1988) Genetics of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 2716-2724.
- Prince, R.W., Cox, C.D., and Vasil, M.L. (1993) Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene. *J Bacteriol* **175**: 2589-2598.
- Pugsley, A.P. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 50-108.
- Quadri, L.E. (2000) Assembly of aryl-capped siderophores by modular peptide synthetases and polyketide synthases. *Mol Microbiol* **37**: 1-12.
- Rajan, P.R., Lin, J.H., Ho, M.S., and Yang, H.L. (2003) Simple and rapid detection of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* by a PCR technique and plating method. *J Appl Microbiol* **95**: 1375-1380.
- Ratledge, C., and Dover, L.G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**: 881-941.
- Reckseidler, S.L., DeShazer, D., Sokol, P.A., and Woods, D.E. (2001) Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant. *Infect Immun* **69**: 34-44.
- Riesenberg-Wilmes, M.R., Bearson, B., Foster, J.W., and Curtis, R., 3rd (1996) Role of the acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **64**: 1085-1092.

- Rioux, C., Jordan, D.C., and Rattray, J.B. (1983). Colorimetric determination of catechol siderophores in microbial cultures. *Anal Biochem* **133**: 163-169.
- Robins-Browne, R.M., Prpic, J.K., and Stuart, S.J. (1987) *Yersiniae* and iron. A study in host-parasite relationships. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 254-258.
- Romalde, J.L., Magariños, B., Turnbull, K.D., Baya, A.M., Barja, J.M., and Toranzo, A.E. (1995) Fatty acid profiles of *Pasteurella piscicida*: comparison with other fish pathogenic gram-negative bacteria. *Arch Microbiol* **163**: 211-216.
- Romalde, J.L., and Magariños, B. (1997) Immunization with bacterial antigens: pasteurellosis. *Dev Biol Stand* **90**: 167-177.
- Romalde, J.L., Magariños, B., Lores, F., Osorio, C.R., and Toranzo, E. (1999) Assessment of a magnetic bead-EIA based kit for rapid diagnosis of fish pasteurellosis. *J Microbiol Methods* **38**: 147-154.
- Romalde, J.L. (2002) *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *Int Microbiol* **5**: 3-9.
- Rose, R.E. (1988) The nucleotide sequence of pACYC177. *Nucleic Acids Res* **16**: 356.
- Ruffolo, C.G., Jost, B.H., and Adler, B. (1998) Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and their role in immunity. *Vet Microbiol* **59**: 123-137.
- Rusnak, F., Sakaitani, M., Drueckhammer, D., Reichert, J., and Walsh, C.T. (1991) Biosynthesis of the *Escherichia coli* siderophore enterobactin: sequence of the entF gene, expression and purification of EntF, and analysis of covalent phosphopantetheine. *Biochemistry* **30**: 2916-2927.
- Saito, I., Wormald, M.R., and Williams, R.J.P. (1991a) Some structural features of the iron-uptake regulation protein. *Eur J Biochem* **197**: 29-38.
- Saito, T., Duly, D., and Williams, R.J. (1991b) The histidines of the iron-uptake regulation protein, Fur. *Eur J Biochem* **197**: 39-42.
- Saito, T., and Williams, R.J. (1991) The binding of the ferric uptake regulation protein to a DNA fragment. *Eur J Biochem* **197**: 43-47.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Salama, N., Guillemin, K., McDaniel, T.K., Sherlock, G., Tompkins, L., and Falkow, S. (2000) A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14668-14673.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning A laboratory Manual*. New York: Laboratory Press, ColdSpring Harbor.

- SanMiguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y.K., Motchoulskaia, N., Zakharov, D., Melake-Berhan, A., Springer, P.S., Edwards, K.J., Lee, M., Avramova, Z., and Bennetzen, J.L. (1996) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* **274**: 765-768.
- Sarkar, B. (1970) State of iron (3) in normal human serum: low molecular weight and protein ligands besides transferrin. *Can J Biochem* **48**: 1339-1350.
- Sawada, K., Koeguchi, S., Hongyo, H., Sawada, S., Miyamoto, M., Maeda, H., Nishimura, F., Takashiba, S., and Murayama, Y. (1999) Identification by subtractive hybridization of a novel insertion sequence specific for virulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* **67**: 5621-5625.
- Schaffer, S., Hantke, K., and Braun, V. (1985) Nucleotide sequence of the iron regulatory gene *fur*. *Mol Gen Genet* **200**: 110-113.
- Schlumbohm, W., Stein, T., Ullrich, C., Vater, J., Krause, M., Marahiel, M.A., Kruff, V., and Wittmann-Liebold, B. (1991) An active serine is involved in covalent substrate amino acid binding at each reaction center of gramicidin S synthetase. *J Biol Chem* **266**: 23135-23141.
- Schmitt, M.P. (1997) Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheriae*: identification of a gene whose product is homologous to eukaryotic heme oxygenases and is required for acquisition of iron from heme and hemoglobin. *J Bacteriol* **179**: 838-845.
- Schneider, A., and Marahiel, M.A. (1998) Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* **169**: 404-410.
- Schouler, C., Koffmann, F., Amory, C., Leroy-Setrin, S., and Moulin-Schouleur, M. (2004) Genomic subtraction for the identification of putative new virulence factors of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain of O2 serogroup. *Microbiology* **150**: 2973-2984.
- Schroder, I., Johnson, E., and de Vries, S. (2003) Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 427-447.
- Schwarzer, D., Finking, R., and Marahiel, M.A. (2003) Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep* **20**: 275-287.
- Schwyn, B., and Neilands, J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**: 47-56.
- Shea, J.E., Hensel, M., Gleeson, C., and Holden, D.W. (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 2593-2597.

- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A., and Lukyanov, S.A. (1995) An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res* **23**: 1087-1088.
- Sigel, S.P., Stoeber, J.A., and Payne, S.M. (1985) Iron-vibriobactin transport system is not required for virulence of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **47**: 360-362.
- Simidu, U., and Egusa, S. (1972) A re-examination of the fish-pathogenic bacterium that had been reported as a *Pasteurella* species. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **38**: 803-812.
- Simonson, C., Brener, D., and DeVoe, I.W. (1982) Expression of a high-affinity mechanism for acquisition of transferrin iron by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **36**: 107-113.
- Skare, J.T., Ahmer, B.M., Seachord, C.L., Darveau, R.P., and Postle, K. (1993) Energy transduction between membranes. TonB, a cytoplasmic membrane protein, can be chemically cross-linked in vivo to the outer membrane receptor FepA. *J Biol Chem* **268**: 16302-16308.
- Skarmeta, A., Bandin, I., Santos, Y., and Toranzo, A.E. (1995) In vivo killing of *Pasteurella piscicida* by fish macrophages. *Dis Aquat Organ* **23**: 51-57.
- Skerman, V.B.D., McGowan, V., and Sneath, P.H.A. (1989) *Approved list of bacterial names*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Snieszko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E., and Boone, J.G. (1964) *Pasteurella* sp. from an epizootic of white Perch (*Roccus Americanus*) in Chesapeake Bay Tidewater Areas. *J Bacteriol* **88**: 1814-1815.
- Sorsa, L.J., Dufke, S., and Schubert, S. (2004) Identification of novel virulence-associated loci in uropathogenic *Escherichia coli* by suppression subtractive hybridization. *FEMS Microbiol Lett* **230**: 203-208.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**: 493-505.
- Staggs, T.M., and Perry, R.D. (1992) Fur regulation in *Yersinia* species. *Mol Microbiol* **6**: 2507-2516.
- Staggs, T.M., Fetherston, J.D., and Perry, R.D. (1994) Pleiotropic effects of a *Yersinia pestis* fur mutation. *J Bacteriol* **176**: 7614-7624.
- Stathopoulos, C., Hendrixson, D.R., Thanassi, D.G., Hultgren, S.J., St Geme, J.W., 3rd, and Curtiss, R., 3rd (2000) Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens: an evolving story. *Microbes Infect* **2**: 1061-1072.

- Stevens, M.K., Porcella, S., Klesney-Tait, J., Lumbley, S., Thomas, S.E., Norgard, M.V., Radolf, J.D., and Hansen, E.J. (1996) A hemoglobin-binding outer membrane protein is involved in virulence expression by *Haemophilus ducreyi* in an animal model. *Infect Immun* **64**: 1724-1735.
- Stoebner, J.A., and Payne, S.M. (1988) Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **56**: 2891-2895.
- Stojiljkovic, I., and Hantke, K. (1992) Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria. *Embo J* **11**: 4359-4367.
- Stojiljkovic, I., Baumler, A.J., and Hantke, K. (1994) Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a fur titration assay. *J Mol Biol* **236**: 531-545.
- Stojiljkovic, I., and Hantke, K. (1995) Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol Gen Genet* **247**: 199-205.
- Stojiljkovic, I., Hwa, V., de Saint Martin, L., O'Gaora, P., Nassif, X., Heffron, F., and So, M. (1995) The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol Microbiol* **15**: 531-541.
- Stojiljkovic, I., and Srinivasan, N. (1997) *Neisseria meningitidis* tonB, exbB, and exbD genes: Ton-dependent utilization of protein-bound iron in *Neisseriae*. *J Bacteriol* **179**: 805-812.
- Stojiljkovic, I., and Perkins-Balding, D. (2002) Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria. *DNA Cell Biol* **21**: 281-295.
- Stork, M., Di Lorenzo, M., Mourino, S., Osorio, C.R., Lemos, M.L., and Crosa, J.H. (2004) Two tonB systems function in iron transport in *Vibrio anguillarum*, but only one is essential for virulence. *Infect Immun* **72**: 7326-7329.
- Straus, D., and Ausubel, F.M. (1990) Genomic subtraction for cloning DNA corresponding to deletion mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1889-1893.
- Stroeher, U.H., and Manning, P.A. (1997) *Vibrio cholerae* serotype O139: swapping genes for surface polysaccharide biosynthesis. *Trends Microbiol* **5**: 178-180.
- Sullivan, J.T., and Ronson, C.W. (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5145-5149.
- Tabor, S., and Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 1074-1078.

- Takase, H., Nitandai, H., Hoshino, K., and Otani, T. (2000) Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa tonB* gene for high-affinity iron acquisition and infection. *Infect Immun* **68**: 4498-4504.
- Tanabe, T., Funahashi, T., Nakao, H., Miyoshi, S., Shinoda, S., and Yamamoto, S. (2003) Identification and characterization of genes required for biosynthesis and transport of the siderophore vibrioferrin in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **185**: 6938-6949.
- Theil, E.C. (1987) Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem* **56**: 289-315.
- Thompson, F.L., Iida, T., and Swings, J. (2004) Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 403-431.
- Thyssen, A., Grisez, L., van Houdt, R., and Ollevier, F. (1998) Phenotypic characterization of the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Int J Syst Bacteriol* **4**: 1145-1151.
- Tilbrook, G.S., and Hider, R.C. (1998) Iron chelators for clinical use. *Met Ions Biol Syst* **35**: 691-730.
- Tinsley, C.R., and Nassif, X. (1996) Analysis of the genetic differences between *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: two closely related bacteria expressing two different pathogenicities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11109-11114.
- Tolmasky, M.E., Wertheimer, A.M., Actis, L.A., and Crosa, J.H. (1994) Characterization of the *Vibrio anguillarum fur* gene: role in regulation of expression of the FatA outer membrane protein and catechols. *J Bacteriol* **176**: 213-220.
- Tong, Z., Zhou, D., Song, Y., Zhang, L., Pei, D., Han, Y., Pang, X., Li, M., Cui, B., Wang, J., Guo, Z., Qi, Z., Jin, L., Zhai, J., Du, Z., Wang, X., Yu, J., Huang, P., Yang, H., and Yang, R. (2005) Pseudogene accumulation might promote the adaptive microevolution of *Yersinia pestis*. *J Med Microbiol* **54**: 259-268.
- Toranzo, A.E., Barja, J.I., and Hetrick, F.M. (1982) Survival of *Vibrio anguillarum* and *Pasteurella piscicida* in estuarine and fresh waters. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **3**: 43-45.
- Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magariños, B., and Barja, J.L. (1991) Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture* **99**: 1-15.
- Toranzo, A.E., and Barja, J.L. (1993) Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annual Review of Fish Diseases* **3**: 5-36.

- Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L., and Despied, S. (1995) Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta *fur* mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J Bacteriol* **177**: 2305-2314.
- Truper, H.G., and De'Clari (1997) Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". *Int J Syst Bacteriol* **47**: 908-909.
- Tsolis, R.M., Baumber, A.J., Stojiljkovic, I., and Heffron, F. (1995) Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron-regulated genes. *J Bacteriol* **177**: 4628-4637.
- Tsujibo, H., Miyamoto, K., Okamoto, T., Orikoshi, H., and Inamori, Y. (2000) A serine protease-encoding gene (*aprII*) of *Alteromonas* sp. Strain O-7 is regulated by the iron uptake regulator (Fur) protein. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3778-3783.
- Tung, M.C., Tsai, S.S., Ho, L.F., Huang, S.T., and Chien, S.C. (1985) An acute septicemic infection of *Pasteurella* organism in pond-cultured Formosa snake-head fish (*Channa maculatta* Lacepeda) in Taiwan. *Fish Pathol.* **20**: 143-148.
- Ueki, N., kayano, Y., and Muroga, K. (1990) *Pasteurella piscicida* infection in juvenile red grouper (*Epinephelus akaara*). *Fish Pathol.* **25**: 43-44.
- Urdaci, M.C., Marchand, M., and Grimont, P.A. (1990) Characterization of 22 *Vibrio* species by gas chromatography analysis of their cellular fatty acids. *Res Microbiol* **141**: 437-452.
- Van der Helm, D. (1998) The physical chemistry of bacterial outer-membrane siderophore receptor proteins. *Met Ions Biol Syst* **35**: 355-401.
- Van Hove, B., Staudenmaier, H., and Braun, V. (1990) Novel two-component transmembrane transcription control: regulation of iron dicitrate transport in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **172**: 6749-6758.
- Vasil, M.L., and Ochsner, U.A. (1999) The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol* **34**: 399-413.
- Von Dohren, H., Keller, U., Vater, J., and Zocher, R. (1997) Multifunctional Peptide Synthetases. *Chem Rev* **97**: 2675-2706.
- Wagegg, W., and Braun, V. (1981) Ferric citrate transport in *Escherichia coli* requires outer membrane receptor protein fecA. *J Bacteriol* **145**: 156-163.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**: 945-951.

- Walsh, C.T., Chen, H., Keating, T.A., Hubbard, B.K., Losey, H.C., Luo, L., Marshall, C.G., Miller, D.A., and Patel, H.M. (2001) Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr Opin Chem Biol* **5**: 525-534.
- Wandersman, C., and Stojiljkovic, I. (2000) Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol* **3**: 215-220.
- Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* **58**: 611-647.
- Wang, R.F., and Kushner, S.R. (1991) Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**: 195-199.
- Watnick, P.I., Eto, T., Takahashi, H., and Calderwood, S.B. (1997) Purification of *Vibrio cholerae fur* and estimation of its intracellular abundance by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Bacteriol* **179**: 243-247.
- Watnick, P.I., Butters, J.R., and Calderwood, S.B. (1998) The interaction of the *Vibrio cholerae* transcription factors, Fur and IrgB, with the overlapping promoters of two virulence genes, *irgA* and *irgB*. *Gene* **209**: 65-70.
- Webster, A.C., and Litwin, C.M. (2000) Cloning and characterization of *vuuA*, a gene encoding the *Vibrio vulnificus* ferric vulnibactin receptor. *Infect Immun* **68**: 526-534.
- Wee, S., Neilands, J.B., Bittner, M.L., Hemming, B.C., Haymore, B.L., and Seetharam, R. (1988) Expression, isolation and properties of Fur (ferric uptake regulation) protein of *Escherichia coli* K 12. *Biol Met* **1**: 62-68.
- Whalan, R.H., Funnell, S.G., Bowler, L.D., Hudson, M.J., Robinson, A., and Dowson, C.G. (2005) PiuA and PiaA, iron uptake lipoproteins of *Streptococcus pneumoniae*, elicit serotype independent antibody responses following human pneumococcal septicaemia. *FEMS Immunol Med Microbiol* **43**: 73-80.
- Wienk, K.J., Marx, J.J., and Beynen, A.C. (1999) The concept of iron bioavailability and its assessment. *Eur J Nutr* **38**: 51-75.
- Wiggerich, H.G., Klauke, B., Koplin, R., Priefer, U.B., and Puhler, A. (1997) Unusual structure of the *tonB-exb* DNA region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: *tonB*, *exbB*, and *exbD1* are essential for ferric iron uptake, but *exbD2* is not. *J Bacteriol* **179**: 7103-7110.
- Wilks, A., and Schmitt, M.P. (1998) Expression and characterization of a heme oxygenase (HmuO) from *Corynebacterium diphtheriae*. Iron acquisition requires oxidative cleavage of the heme macrocycle. *J Biol Chem* **273**: 837-841.

- Williams, P.H. (1979) Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **26**: 925-932.
- Winkelmann, G. (2002) Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans* **30**: 691-696.
- Winkelmann, G., Schmid, D.G., Nicholson, G., Jung, G., and Colquhoun, D.J. (2002) Bisucaberin--a dihydroxamate siderophore isolated from *Vibrio salmonicida*, an important pathogen of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biometals* **15**: 153-160.
- Winstanley, C. (2002) Spot the difference: applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens. *J Med Microbiol* **51**: 459-467.
- Worst, D.J., Maaskant, J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., and Kusters, J.G. (1999) Multiple haem-utilization loci in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* **145**: 681-688.
- Wright, A.C., Simpson, L.M., and Oliver, J.D. (1981) Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. *Infect Immun* **34**: 503-507.
- Wyckoff, E.E., Smith, S.L., and Payne, S.M. (2001) VibD and VibH are required for late steps in vibriobactin biosynthesis in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **183**: 1830-1834.
- Wyckoff, E.E., Schmitt, M., Wilks, A., and Payne, S.M. (2004) HutZ is required for efficient heme utilization in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **186**: 4142-4151.
- Xiong, A., Singh, V.K., Cabrera, G., and Jayaswal, R.K. (2000) Molecular characterization of the ferric-uptake regulator, *fur*, from *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **146**: 659-668.
- Yamamoto, S., Hara, Y., Tomochika, K., and Shinoda, S. (1995) Utilization of hemin and hemoglobin as iron sources by *Vibrio parahaemolyticus* and identification of an iron-repressible hemin-binding protein. *FEMS Microbiol Lett* **128**: 195-200.
- Yamamoto, S., Funahashi, T., Ikai, H., and Shinoda, S. (1997) Cloning and sequencing of the *Vibrio parahaemolyticus fur* gene. *Microbiol Immunol* **41**: 737-740.
- Yamane, K., Asato, J., Kawade, N., Takahashi, H., Kimura, B., and Arakawa, Y. (2004) Two Cases of Fatal Necrotizing Fasciitis Caused by *Photobacterium damsela* in Japan. *J Clin Microbiol* **42**: 1370-1372.
- Yeoman, K.H., Wisniewski-Dye, F., Timony, C., Stevens, J.B., deLuca, N.G., Downie, J.A., and Johnston, A.W. (2000) Analysis of the *Rhizobium leguminosarum* siderophore-uptake gene *fhuA*: differential expression in free-living bacteria and nitrogen-fixing bacteroids and distribution of an *fhuA* pseudogene in different strains. *Microbiology* **146**: 829-837.

- Zhang, Y.L., Ong, C.T., and Leung, K.Y. (2000) Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiology* **146**: 999-1009.
- Zhao, J., and Aoki, T. (1989) A specific DNA hybridization probe for detection of *Pasteurella piscicida*. *Dis Aquat Organ* **7**: 203-210.
- Zheng, M., Doan, B., Schneider, T.D., and Storz, G. (1999) OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J Bacteriol* **181**: 4639-4643.
- Zhou, D., Hardt, W.D., and Galan, J.E. (1999) *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect Immun* **67**: 1974-1981.
- Zhu, C., Ngeleka, M., Potter, A.A., and Allan, B.J. (2002) Effect of *fur* mutation on acid-tolerance response and in vivo virulence of avian septicemic *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **48**: 458-462.
- Zhu, W., Hunt, D.J., Richardson, A.R., and Stojiljkovic, I. (2000a) Use of heme compounds as iron sources by pathogenic neisseriae requires the product of the *hemO* gene. *J Bacteriol* **182**: 439-447.
- Zhu, W., Wilks, A., and Stojiljkovic, I. (2000b) Degradation of heme in gram-negative bacteria: the product of the *hemO* gene of *Neisseriae* is a heme oxygenase. *J Bacteriol* **182**: 6783-6790.
- Zimmermann, L., Hantke, K., and Braun, V. (1984) Exogenous induction of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **159**: 271-277.
- Zorrilla, I., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Sarasquete, C., and Borrego, J.J. (1999) Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *J. Fish Dis.* **22**: 167-172.

Artículos

Identification and characterisation of the *fur* genes in *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* and ssp. *damsela*

Sandra Juárez-Río, Carlos R. Osorio, Manuel L. Lemos*

Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

ABSTRACT: The gene encoding the ferric uptake regulator protein (*fur* gene) of the fish pathogenic bacterium *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* Strain DI21 was partially amplified using degenerate oligonucleotides. Complete sequencing of the *fur* gene and neighbouring DNA was accomplished by primer walking. An open reading frame of 447 bp, coding for a protein of 148 amino acids, and with high homology to previously described Fur proteins, was identified. The *fur* gene of *P. damsela* ssp. *damsela* ATCC 35083 was subsequently amplified by PCR with specific primers and its sequence determined, showing a 99.3% similarity to the *P. damsela* ssp. *piscicida* *fur* gene. The *P. damsela* *fur* gene was able to complement the *fur* mutation of *Escherichia coli* Strain H1681 in an iron-dependent fashion.

KEY WORDS: *Photobacterium damsela* · Pasteurellosis · *fur* gene · Fur protein · Iron uptake

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

The species *Photobacterium damsela* includes Gram-negative marine bacteria belonging to 2 different subspecies, namely *P. damsela* ssp. *damsela* and ssp. *piscicida* (Gauthier et al. 1995). *P. damsela* ssp. *piscicida* (formerly *Pasteurella piscicida*) is the causative agent of fish pasteurellosis, a serious disease which results in considerable economic losses in marine aquaculture worldwide (Magariños et al. 1996a). *P. damsela* ssp. *damsela* (formerly *Vibrio damsela*), has been reported to cause wound infections and fatal disease in a variety of marine animals and humans (Clarridge & Zigelboim-Daum 1985).

The lethality of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* to fish is increased when haemin or haemoglobin are injected intraperitoneally (Magariños et al. 1994). Iron availability also regulates the amount of capsular polysaccharide and the production of an extracellular protease in this subspecies (Magariños et al. 1996a,b). Production of siderophores and several iron-regulated outer membrane proteins has also been reported in *P.*

damsela ssp. *piscicida* strains (Magariños et al. 1994). Similarly, utilisation of haemoglobin and ferric ammonium citrate as sole iron sources *in vitro* has been reported in *P. damsela* ssp. *damsela* (Fouz et al. 1994), and virulence of this subspecies is significantly increased in iron-overloaded animals. However, despite the evidence that iron uptake mechanisms play a role in *P. damsela* virulence, little is known about the genetic basis of iron-sequestering systems in this species.

Despite the importance of iron in bacterial physiology, concentrations of this metal over physiological levels is toxic for cells, as it catalyses the Fenton reaction that leads to formation of hydroxyl radicals (OH) (Halliwell & Gutteridge 1984). Thus, iron homeostasis must be strictly controlled. Expression of genes involved in iron uptake systems is regulated at the level of transcription by the Fur (ferric uptake regulator) repressor protein (Escobar et al. 1999). Homologues of Fur protein have been characterised in many bacterial genera, where it has been found to control expression of iron-responsive genes (Hantke

*Corresponding author. Email: mlemos@usc.es

2001). This protein requires ferrous iron as a cofactor for dimerisation and DNA binding. When Fur is associated with ferrous iron, it is able to bind operator sites (called Fur boxes) within the promoter region of iron uptake genes, so that transcription of these genes is shut off in iron-replete cells. In iron-depleted conditions, Fur cannot bind operator sites, thus allowing transcription of iron uptake-related genes. In this study, the *fur* gene has been cloned and sequenced in the 2 *P. damsela* subspecies, and its ability to function as an iron-dependent co-repressor has been tested.

MATERIALS AND METHODS

Strains used are listed in Table 1. *Photobacterium damsela* strains were routinely grown at 25°C in Tryptic Soy Agar (Difco) supplemented with 1 % NaCl (TSA-1). *Escherichia coli* strains were routinely grown at 37°C in Luria Bertani (LB) medium. MacConkey Agar (Cultimed) was supplemented either with 200 µM 2,2'-dipyridil (iron-restricted conditions) or with 0.1 mM FeCl₃ (iron-sufficient conditions). All strains were stored frozen at –80°C in LB broth with

20 % glycerol. Ampicillin sodium salt stock solutions (100 mg ml^{–1} in water) were filter sterilized and stored at –20°C.

Standard methods for DNA manipulations were carried out as described by Sambrook & Russell (2001). Total genomic DNA from *Photobacterium damsela* was prepared with the Easy-DNA kit (Invitrogen). Plasmid DNA purification and extraction of DNA from agarose gels were done with kits from Qiagen. DNA-probe labeling and Southern blot analysis were carried out with the ECL DNA labeling and detection system (Amersham Biosciences), following the manufacturer's instructions. Plasmids used in cloning experiments and those derived from this study are summarised in Table 1. Degenerate PCR primers for partial amplification of the *P. damsela fur* gene were designed on the basis of conserved amino-acid sequences evidenced by comparative analysis of Fur proteins of *Vibrio* spp. and *Escherichia coli*. PCR reactions were carried out in a T-Gradient thermal Cycler (Biometra), with *Taq* polymerase BioTaq (Bioline). Oligonucleotide primers used are listed in Table 1.

DNA sequences were determined by the dideoxy chain termination method on either plasmid or PCR products using the Big Dye Terminator v3.0 DNA

Table 1. Strains, plasmids and oligonucleotide primers used in this study. Added restriction sites are shown in italics. Positions are with respect to the translational starting point of *Photobacterium damsela* ssp. *piscida fur* gene

	Relevant features/ sequence	Source/isolated from/position
Bacteria		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE4 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15)</i>	Laboratory stock
H1681	<i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> <i>thr ser fhuA lacy rpsL galK hsdR mcrA</i> <i>fhuF:λpLacMu fur-31 zbf::Tn10</i>	Heidreich et al. (1996)
<i>Photobacterium damsela</i> ssp. <i>piscida</i> DI21		<i>Sparus aurata</i>
<i>Photobacterium damsela</i> ssp. <i>damsela</i> ATCC 35083		<i>Carcharinus plumbeus</i>
Plasmids		
pGEMT-Easy	General TA cloning vector, Amp ^R	Promega
pWKS30	Low copy cloning vector, Amp ^R	Wang & Kushner (1991)
pCAR106	<i>Hind</i> III- <i>Bgl</i> II fragment of DI21, containing partial <i>fur</i> and <i>glnS</i> ORFs, cloned in pGEM-T	This study
pCAR113	<i>Hind</i> III- <i>Bgl</i> II fragment of DI21, containing <i>orf1</i> and partial <i>fur</i> and <i>fld</i> genes, cloned in pGEM-T	This study
pSJR21	DI21 complete <i>fur</i> gene in pWKS30	This study
Oligonucleotides		
Fur-5'	5'-AACRGGAAAGTRTATGTCAG-3'	<i>fur</i> (-13-7)
Fur-3'	5'-CCRTAHARRTADAGGCTGTG-3'	<i>fur</i> (303-322)
IP-DI21-fur-2	5'-GAAGATCTTCAAACGAGGTAGTGTAAT-3'	<i>fur</i> (43-67)
Fur-pisc-5'-1	5'-ACAACCAGAGTGTCAACACA-3'	<i>fur</i> (81-100)
Delfur-DI21-3'-1	5'-GCAAGCTTTACGTGATACCTGGGCTAAAA-3'	<i>glnS</i> (600-580)
Delfur-DI21-5'-1	5'-GCGGATCCCATGATACATCCTGATAACAA-3'	<i>orf1</i> (-260-240)
M13-fw	5'-GTTTTCCTCCAGTCACGAC-3'	pWKS30 polylinker
M13-rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	pWKS30 polylinker

Sequencing Kit (Applied Biosystems) and an automated sequencer ABI 377 (Applied Biosystems). Both strands of DNA were completely sequenced. The European Bioinformatics Institute services were used to consult the EMBL (European Molecular Biology Laboratory) database with the FASTA3 and BLAST algorithms. Sequences were aligned with DNATools software (Version 6.0). Phylogenetic trees were constructed according to the neighbour-joining method (Saitou & Nei 1987) using the ClustalX software. The stability of the groupings was evaluated by performing a bootstrap analysis (1000 replicates). Additional DNA and peptide sequence analysis was performed using BioEdit software (Version 5.0.6).

Escherichia coli H1681 is a *fur*-defective strain that harbours a β -galactosidase reporter gene placed under control of the *fur*-regulated *fhuF* gene promoter (Heidreich et al. 1996). Thus, this strain is ideal for testing the function of a putative *fur* gene as an iron-regulated transcriptional repressor. The complete *P. damsela* *fur* gene was PCR-amplified with primers delfur-DI21-5'-1 and delfur-DI21-3'-1, cloned in pWKS30 to create pSJR21, and transformed into H1681. The resultant colonies were tested on MacConkey Agar plates under both iron-rich and iron-restricted conditions for β -galactosidase activity, and recorded as Lac⁺ (red colonies) or Lac⁻ (white colonies).

RESULTS

Using degenerate primers *fur*-5' and *fur*-3', a fragment of 392 bp was obtained by PCR using DNA of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* Strain DI-21 as a template. This fragment was excised from the agarose gel, cloned in pGEMT-Easy vector, and sequenced in full. A partial open reading frame was deduced from the nucleotide sequence, and showed 91% similarity to the Fur protein of *Vibrio fischeri*. In order to clone the complete *fur* gene, the PCR-amplified partial *fur* was used as a probe in Southern blots of restriction-digested *P. damsela* ssp. *piscicida* DI21 chromosomal DNA. This probe hybridised to a *Hind*III fragment of ca. 3 kb. *Hind*III-*Bgl*II-digested chromosomal DNA was ligated into plasmid pWKS30 which had been similarly digested, and ligation products were used as DNA template in 2 different PCR reactions, one with primers *Fur*-pisc-5'-1 and M13-fw and the second with primers IP-DI21-*fur*2 and M13-rev. PCR products of ca. 1.5 and 1.2 kb were amplified and cloned in pGEMT-easy to create pCAR106 and pCAR113, respectively (Fig. 1). This strategy allows the amplification of unknown DNA sequences upstream or downstream of a known DNA fragment, without the need of screening gene libraries.

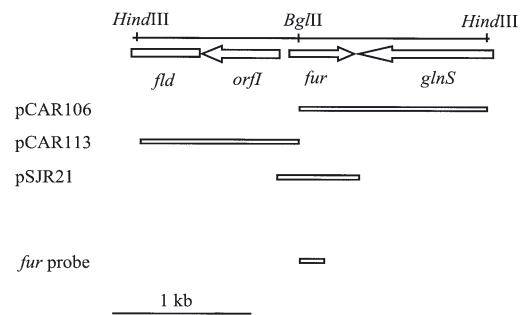


Fig. 1. *Photobacterium damsela*. Restriction map and schematic representation of the *fur* region. Open arrows indicate open reading frames (ORFs; arrows point in the direction of transcription). Relevant plasmids and the partial *fur* gene used as DNA probe are also indicated. Only relevant restriction sites are shown

After sequencing the DNA insert in pCAR106, containing the 3'-end of the *fur* gene, the complete *Photobacterium damsela* *fur* gene was established as an open reading frame coding for a 148-amino acid protein, which showed high percentage similarity with Fur proteins of *Vibrio fischeri* (86%), *V. logei* (86%) and *V. anguillarum* (84%). The 3'-end of pCAR106 contained a partial new open reading frame (ORF), which was interrupted by a *Hind*III site (Fig 1). The closest database matches for this new ORF were the *glnS* genes of *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, and *V. cholerae*. Sequence analysis of pCAR113 revealed 2 ORFs that were tentatively identified according to homology with published sequences. These were: a partial flavin mononucleotide-containing electron transferase (*fld*) gene showing significant homology to *fldA* genes of *V. fischeri*, *V. salmonicida* and *V. cholerae*, and an ORF (ORF1) with homology to hypothetical proteins of *Vibrio* spp. (Fig. 1). The *fur* gene was PCR-amplified from *P. damsela* ssp. *damsela* strain ATCC 35083 with primers delfur-DI21-5'-1 and delfur-DI21-3'-1, and its sequence determined. The percentage of *fur* gene sequence similarity between the 2 subspecies was 99.3%, and 2 nucleotide substitutions were found between the 2 subspecies, one of which leads to a single amino acid substitution at Position 60 (N in DI21, S in ATCC 35083). Nucleotide sequences determined in this study have been assigned the following EMBL accession numbers: AJ440780 (*P. damsela* ssp. *piscicida* partial *fld*, *glnS* genes and complete *orf1* and *fur* genes) and AJ564701 (*P. damsela* ssp. *damsela* complete *fur* gene).

The predicted sequences of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* and ssp. *damsela* Fur proteins were aligned with their closest homologues from *Vibrio* species, as well as with that of *Escherichia coli* (Fig. 2). A high degree of sequence conservation was observed in most of the protein regions, but significant sequence

<i>subsp. piscicida</i>	MSDNNHALKQAGLKITLPRLKILEVLQQPECQHISAEDLYKKLIDIGEEIGLATVYRVLN	60
<i>subsp. damsela</i>	S	60
<i>V. parahaemolyt</i>	Q...D...V.....D.....L.....	60
<i>V. vulnificus</i>	Q...D...V.....D.....L.....	60
<i>V. anguillarum</i>	Q...D...V.....E.....L.....	60
<i>V. cholerae</i>	Q...D...V.....E.....L.....	60
<i>V. salmonicida</i>	Q...K...V.....I.....S.....	60
<i>V. logei</i>	Q...K...V.....I.....S.....	60
<i>V. fischeri</i>	Q...K...V.....E.....	60
<i>A. hydrophila</i>	.A...Q...K...I...V...I...D...T...R...Q.....	60
<i>E. coli</i>	.T...T...K...V.....E.DNH.V.....R...M.....	60
<i>subsp. piscicida</i>	QFDDAGIVTRHHFEGGKSVFELATQHHDHLVCLDCGKVIIEFSDELIERRQKEIAAQYNV	120
<i>subsp. damsela</i>		120
<i>V. parahaemolyt</i>	S.....E.....DI..E..R...K... 120	
<i>V. vulnificus</i>	S.....E.....DI..E.....A... 120	
<i>V. anguillarum</i>	S.....E.....V..Q..R...E... 120	
<i>V. cholerae</i>	S.....E.....DV..Q.....K... 120	
<i>V. salmonicida</i>	D...E...D..NK... 120	
<i>V. logei</i>	D...E...D..NK... 120	
<i>V. fischeri</i>	T..Q...QV.EK... 120	
<i>A. hydrophila</i>	E.....V..Q..T...KKH.I 120	
<i>E. coli</i>	N.....TQ.....I.....DS..A..R...KHGI 120	
<i>subsp. piscicida</i>	DLTNHSLYLYGHC-ANGDCCKDESLHDQK	148
<i>subsp. damsela</i>	-	148
<i>V. parahaemolyt</i>	T.....K.-SD.G.KENPDA.KPAK	149
<i>V. vulnificus</i>	Q.....K.-GD.S.KGNPDA.KR.S	149
<i>V. anguillarum</i>	Q.....K.-D.S.KQNPNA.KS.R	149
<i>V. cholerae</i>	Q.....K.GSD.S.KDNPNA.KP.K	150
<i>V. salmonicida</i>	R.....-IT...IENTTA.NG	147
<i>V. logei</i>	R.....-IT...IENTTA.NG	147
<i>V. fischeri</i>	R.....-IT...ADNDDA.NA	147
<i>A. hydrophila</i>	R.....-A...KH.D	142
<i>E. coli</i>	R.....-E...RE...HA.EG.	148

Fig. 2. Amino-acid sequence alignment of Fur (ferric uptake regulator) proteins in *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* and *damsela*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* and *Vibrio* spp. Identical residues are denoted with dots, and deletions are denoted with hyphens

divergence was encountered at the C-terminal end. Phylogenetic trees were constructed with *fur* gene and Fur protein sequences (Fig. 3a,b). For comparative purposes, a phylogenetic tree was constructed with the 16S rRNA gene sequences of the same bacterial species (Fig. 3c). Tree topologies produced with the 3 sequences revealed congruous phylogenetic relationships, and were reinforced by the bootstrap analysis.

The *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* *fur* gene contained in plasmid pSJR21 was able to functionally complement *Escherichia coli* H1681, and this complementation was dependent on the iron concentration of the culture medium (Table 2).

Table 2. Results of complementation of *Escherichia coli* H1681 with plasmid pSJR21 harbouring *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* complete *fur* gene. Lac phenotype (fl-galactosidase activity) was recorded after 24 h incubation at 37°C

Strain	MacConkey agar + Fe (iron-rich)	MacConkey agar + dipyrilid (iron-restricted)
H1681	Red colonies (Lac ⁺)	Red colonies (Lac ⁺)
H1681 + pSJR21	White colonies (Lac ⁻)	Red colonies (Lac ⁺)

DISCUSSION

The arrangement of the sequenced ORFs in *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* was *fld-orf1-fur-glnS*, which is the same pattern encountered in *Vibrio salmonicida* and *V. logei* (Colquhoun & Sorum 2002). Database searches conducted on the finished genome projects of *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* also showed this same gene organisation. The existence of a conserved gene order in the vicinity of the *fur* locus is thus evident in the family *Vibrionaceae*. In addition, this gene order is similar to that encountered in *Escherichia coli* and *Aeromonas hydrophila*. The

existence of *fldA* homolog upstream of *fur* gene has also been reported in *Alteromonas* sp. (Tsuji et al. 2000).

The sequence of the *fur* gene has been determined in several members of the family *Vibrionaceae*, including *Vibrio cholerae* (Litwin et al. 1992), *V. parahaemolyticus* (Yamamoto et al. 1997), *V. logei* and *V. salmonicida* (Colquhoun & Sorum 2002), *V. vulnificus* (Litwin & Calderwood 1993)

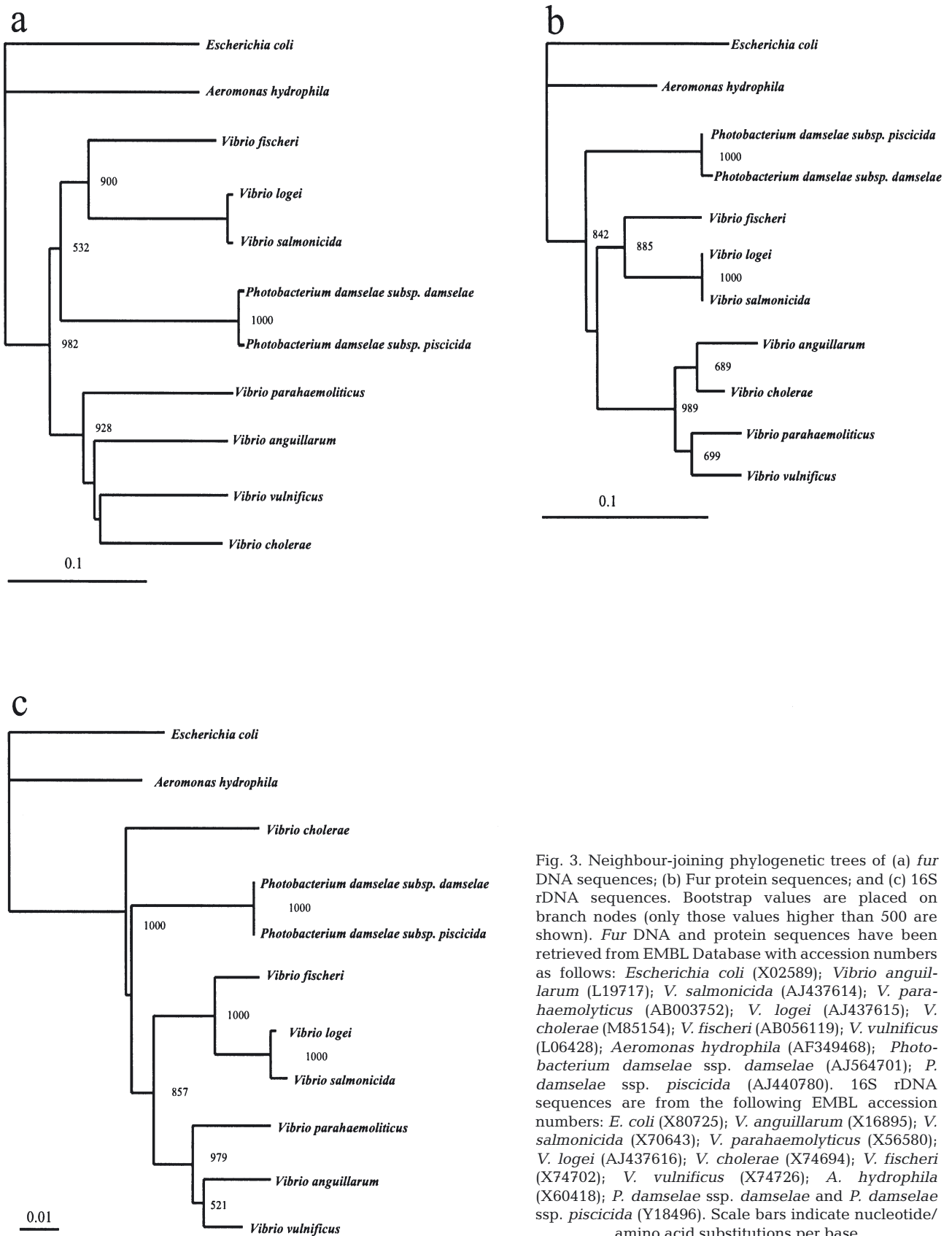


Fig. 3. Neighbour-joining phylogenetic trees of (a) *fur* DNA sequences; (b) Fur protein sequences; and (c) 16S rDNA sequences. Bootstrap values are placed on branch nodes (only those values higher than 500 are shown). *Fur* DNA and protein sequences have been retrieved from EMBL Database with accession numbers as follows: *Escherichia coli* (X02589); *Vibrio anguillarum* (L19717); *V. salmonicida* (AJ437614); *V. parahaemolyticus* (AB003752); *V. logei* (AJ437615); *V. cholerae* (M85154); *V. fischeri* (AB056119); *V. vulnificus* (L06428); *Aeromonas hydrophila* (AF349468); *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* (AJ564701); *P. damsela* ssp. *piscicida* (AJ440780). 16S rDNA sequences are from the following EMBL accession numbers: *E. coli* (X80725); *V. anguillarum* (X16895); *V. salmonicida* (X70643); *V. parahaemolyticus* (X56580); *V. logei* (AJ437616); *V. cholerae* (X74694); *V. fischeri* (X74702); *V. vulnificus* (X74726); *A. hydrophila* (X60418); *P. damsela* ssp. *damsela* and *P. damsela* ssp. *piscicida* (Y18496). Scale bars indicate nucleotide/ amino acid substitutions per base

and *V. anguillarum* (Tomalsky et al. 1994). Conservation of the relative positions of *Vibrio* species in the phylogenetic trees, with regard to *Photobacterium damsela* subspecies and to the species included as outgroup (*E. coli*), indicate the suitability of the *fur* gene as a phylogenetic marker. Despite its small size (ca. 450 bp), phylogenies deduced with *fur* gene sequences are in accordance with those deduced from the 16S rRNA gene (ca. 1.5 kb), indicating that the *fur* gene is not an erratic evolutionary clock, and can be employed as a phylogenetic marker, as suggested by other authors (Achenbach & Yang 1997, Colquhoun & Sorum 2002).

The ability of *Photobacterium damsela* Fur protein to recognise the Fur-regulated promoters in an *Escherichia coli* background suggests that a similar regulatory mechanism (via the Fur protein) of iron-regulated genes is expected to occur in *P. damsela*, with a Fur protein which is able to sense the iron availability in the cell. This opens the door for future genetic studies aimed at identifying Fur-regulated promoters in *P. damsela* strains using a Fur titration assay (FURTA), a technique which has proved very useful for identification of iron-regulated genes (Stojiljkovic et al. 1994). Fur-regulated outer-membrane proteins are candidates that elicit a strong immune response in the host, as reported in *Aeromonas salmonicida* (Hirst & Ellis 1994). Therefore, characterisation of the *fur* gene in *P. damsela* will allow the construction of *fur* mutant strains for further identification and characterisation of iron-regulated proteins.

Acknowledgements. The authors thank Prof. K. Hantke for providing Strain H1681. This work was supported by Grants AGL2000-0492 and AGL2003-00086 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain, and grant PGIDTO1PXI26202PN from Xunta de Galicia to M.L.L. These grants were co-funded by the FEDER programme from the European Union.

LITERATURE CITED

- Achenbach LA, Yang W (1997) The *fur* gene from *Klebsiella pneumoniae*: characterisation, genomic organisation and phylogenetic analysis. *Gene* 185:201–207
- Clarridge JE, Zighelboim-Daum S (1985) Isolation and characterization of two hemolytic phenotypes of *Vibrio damsela* associated with a fatal wound infection. *J Clin Microbiol* 21:302–306
- Colquhoun DJ, Sorum H (2002) Cloning, characterisation and phylogenetic analysis of the *fur* gene in *Vibrio salmonicida* and *Vibrio logei*. *Gene* 296:213–220
- Escolar L, Pérez-Martín J, de Lorenzo V (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* 181:6223–6229
- Fouz B, Toranzo AE, Biosca EG, Mazoy R, Amaro C (1994) Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. *FEMS Microbiol Lett* 121:181–188
- Gauthier G, Lafay B, Ruimy R, Breittmayer V, Nicolas JL, Gauthier M, Christen R (1995) Small subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al. 1964) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45:139–144
- Halliwell B, Gutteridge MC (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1–14
- Hantke K (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4:172–177
- Heidreich C, Hantke K, Bierbaum G, Sahl HG (1996) Identification and analysis of a gene encoding a Fur-like protein of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* 140:253–259
- Hirst ID, Ellis AE (1994) Iron-regulated outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida* are important protective antigens in Atlantic salmon against furunculosis. *Fish Shellfish Immunol* 4:29–45
- Litwin CM, Calderwood SB (1993) Cloning and genetic analysis of the *Vibrio vulnificus fur* gene and construction of a *fur* mutant by *in vivo* marker exchange. *J Bacteriol* 175:706–715
- Litwin CM, Boyko SA, Calderwood SB (1992) Cloning, sequencing and transcriptional regulation of the *Vibrio cholerae fur* gene. *J Bacteriol* 174:1897–1903
- Magariños B, Romalde JL, Lemos ML, Barja JL, Toranzo AE (1994) Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Appl Environ Microbiol* 60:2990–2998
- Magariños B, Bonet R, Romalde JL, Martínez MJ, Congregado F, Toranzo AE (1996a) Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microb Pathog* 21:289–297
- Magariños B, Toranzo AE, Romalde JL (1996b) Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annu Rev Fish Dis* 6:41–64
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Stojiljkovic I, Bäumer AJ, Hantke K (1994) Fur regulon in gram-negative bacteria: identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. *J Mol Biol* 236:531–545
- Tolmasky ME, Wertheimer AM, Actis LA, Crosa JH (1994) Characterisation of the *Vibrio anguillarum fur* gene: role in regulation of expression of FatA outer membrane protein expression and catechols. *J Bacteriol* 176:213–220
- Tsujiho H, Miyamoto K, Okamoto T, Orikoshi H, Inamori Y (2000) A serine-protease-encoding gene (*aprII*) of *Alteromonas* sp. Strain 0–7 is regulated by the iron uptake regulator (Fur) protein. *Appl Environ Microbiol* 66:3778–3783
- Yamamoto S, Funahashi T, Ikai H, Shinoda S (1997) Cloning and sequencing of the *Vibrio parahaemolyticus fur* gene. *Microbiol Immunol* 41:737–740
- Wang RF, Kushner S (1991) Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 100:195–199

Sandra Juárez Río · Carlos R. Osorio · Manuel L. Lemos

Heme uptake genes in human and fish isolates of *Photobacterium damsela*: existence of *hutA* pseudogenes

Received: 11 March 2005 / Revised: 20 April 2005 / Accepted: 25 April 2005 / Published online: 26 May 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract The marine bacterium *Photobacterium damsela* includes strains classified into two distinct subspecies, namely subsp. *damsela* and subsp. *piscicida*, which have been reported to cause disease in a variety of marine animals and in humans. *P. damsela* strains utilize heme compounds as sole iron sources. In the present study, ten potential heme uptake and utilization genes are described in *P. damsela* subsp. *damsela* and subsp. *piscicida*. One gene cluster includes the genes coding for putative proteins HutZ, HutX and HutW; TonB, ExbB and ExbD, the three components of the TonB system; HutB, the putative periplasmic binding protein; HutC, the putative inner membrane permease; and HutD, the putative ABC-transporter ATP-ase. A gene coding for HutA, the outer membrane heme receptor, has also been identified, but it is not linked to the rest of the heme transport genes. RT-PCR analyses showed that heme uptake genes are arranged in three iron-regulated transcriptional units. A plasmid carrying the gene for the heme receptor HutA in combination with a plasmid carrying *tonBexbBDhutBCD* genes conferred to *Escherichia coli* 101ESD (*ent*) the ability to use heme and hemoglobin as iron sources. The *hutA* gene was present in strains isolated from humans and a variety of fish species, but it was shown to be interrupted in some subsp. *piscicida* strains, constituting a pseudogene. This is the first description of a heme-uptake system in a *Photobacterium* species, and shows some structural and functional similarities to heme-uptake systems reported in other gram-negative bacteria.

Keywords *Photobacterium damsela* · Iron uptake · Heme uptake · ABC transporter · Pseudogenes

Introduction

The ability to use iron from host tissues is crucial for pathogenicity in many bacteria. In biological systems, iron is chelated by high-affinity iron-binding proteins, and thus pathogens have developed efficient mechanisms to obtain iron from the host (Ratlidge and Dover 2000). One of the main strategies is the synthesis and secretion of Fe(III) chelators, named siderophores, which are low-molecular-weight iron-chelating molecules that can remove iron from host iron-binding proteins (Crosa 1989). Another important source of iron for many bacterial pathogens is the ability to obtain it from free heme or heme proteins from the host tissues (Lee 1995; Genco and Dixon 2001; Osorio and Lemos 2002).

Photobacterium damsela subsp. *damsela* (formerly *Vibrio damsela*) and *P. damsela* subsp. *piscicida* (formerly *Pasteurella piscicida*) are currently included under the same species epithet *P. damsela* (Gauthier et al. 1995). *P. damsela* subsp. *damsela* has been reported to cause wound infections and fatal disease in a variety of marine animals (Buck et al. 1991; Fouz et al. 1992) and humans (Morris et al. 1982; Fraser et al. 1997; Goodell et al. 2004). Some virulence factors such as hemolysin production have been already characterized (Kreger et al. 1987; Fouz et al. 1993; Osorio et al. 2000). However, little is known about other virulence factors. Strains of this subspecies are capable of utilizing hemoglobin and ferric ammonium citrate as sole iron sources in vitro (Fouz et al. 1994). Solid-phase dot-binding assays demonstrated the existence of constitutive cell surface-mediated binding activity for hemoglobin, regardless of the iron load in the medium (Fouz et al. 1994). However, the nature of the proteins involved in hemoglobin utilization as iron source remains unknown.

S. J. Río · C. R. Osorio · M. L. Lemos (✉)
Department of Microbiology and Parasitology,
Institute of Aquaculture and Faculty of Biology,
University of Santiago de Compostela,
Santiago de Compostela, 15782 Galicia,
Spain
E-mail: mlemos@usc.es
Tel.: +34-981-563100
Fax: +34-981-547165

P. damsela subsp. *piscicida* is the causative agent of fish pasteurellosis, a disease affecting wild and cultured marine fish worldwide (Magariños et al. 1996a). Iron-regulated outer membrane proteins and genes have been described in this subspecies (Magariños et al. 1994; Osorio et al. 2004). This bacterium is able to obtain iron from heme and hemoglobin as unique iron sources in vitro (Magariños et al. 1994). The amount of capsular polysaccharide and the production of an extracellular protease have been shown to be regulated by iron availability in this subspecies (Magariños et al. 1996a, b; do Vale et al. 2002). Recent studies have reported that *P. damsela* subsp. *piscicida* is able to bind heme, as well as protoporphyrin IX and biotinylated bovine hemoglobin, and that the heme-binding activity is increased in pathogenic strains, when cells are grown under iron-limited conditions (do Vale et al. 2002). However, the genetic basis of the heme-uptake system has not been ascertained yet.

Heme-uptake systems in gram-negative bacteria usually involve outer membrane receptors, a TonB-dependent internalization process, a periplasmic binding protein and an inner membrane-associated ABC-transporter. This type of mechanism has been identified in numerous species, including *Vibrio anguillarum* (Mazoy et al. 2003; Mouriño et al. 2004), *Yersinia enterocolitica* (Stojiljkovic and Hantke 1992, 1994), *Vibrio cholerae* (Henderson and Payne 1993; Occhino et al. 1998; Mey and Payne 2001), *Escherichia coli* O157 (Torres and Payne 1997), *Vibrio vulnificus* (Litwin and Byrne 1998) *Plesiomonas shigelloides* (Henderson et al. 2001), and *Shigella dysenteriae* (Mills and Payne 1997) among others. A second possible mechanism consists of an outer membrane receptor and a heme-binding protein that is secreted via a type I protein secretion system, as has been described in *Serratia marcescens* (Ghigo et al. 1997) and *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner et al. 2000). A third mechanism for heme uptake is mediated by a heme-binding outer membrane lipoprotein, as in *Haemophilus influenzae* (Reidl and Mekalanos 1996).

The goal of this study was to identify and characterize the genes involved in heme uptake in strains of the two subspecies of *P. damsela*, including isolates pathogenic for humans and for marine animals.

Materials and methods

Bacteria, plasmids, and media

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *P. damsela* subsp. *damsela* and *P. damsela* subsp. *piscicida* cells were grown at 25°C in either Tryptic Soy Agar or Tryptic Soy Broth (Difco) supplemented with 1% NaCl (TSA-1 and TSB-1, respectively), and in CM9 minimal medium (Mouriño et al. 2004). *E. coli* strains were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth or LB agar, as well as in CM9

minimal medium, supplemented with antibiotics when appropriate. All strains were stored frozen at -80°C in LB broth with 20% glycerol. Antibiotics were used at the following final concentrations: kanamycin (Km) at 25 µg ml⁻¹ and ampicillin sodium salt at 50 µg ml⁻¹. All stocks were filter-sterilized and stored at -20°C. 2,2'-Dipyridyl (Sigma) to chelate nonheme iron was prepared at 10 mM in water. Bovine heme (Sigma) was dissolved at 5 mM in 10 mM NaOH. Bovine hemoglobin (Sigma) was dissolved at 1 mM in water.

Recombinant DNA techniques

Recombinant DNA methods including restriction-enzyme digestions, ligation reactions, agarose-gel electrophoresis, and plasmid analysis were performed following standard protocols (Sambrook and Russell 2001). Chromosomal DNA was isolated using the Easy-DNA kit (Invitrogen). Plasmid purification and elution of DNA fragments from agarose gels was performed using kits from Qiagen. Southern blot analysis was performed using Hybond-N⁺ membranes (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J., USA) using the ECL Direct Nucleic Acid labeling and detection system (Amersham Biosciences), following the manufacturer's instructions. *E. coli* strains were transformed using a standard calcium chloride method (Sambrook and Russell 2001). PCR reactions were carried out using the Expand Long Template Kit (Roche). For inverse PCR, chromosomal DNA was digested with a single restriction enzyme, the fragments self-ligated, and the ligation products subsequently used as templates in PCR reactions with suitable primers.

DNA sequencing and data analysis

DNA sequences were determined by the dideoxy-chain termination method by using the Big Dye Terminator v3.0 DNA sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) on an automated sequencer ABI 377 (Applied Biosystems). Restriction maps and DNA translation were generated by the BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999). Homologies of the deduced amino acid sequences were determined by consulting the EMBL and SWALL databases with the FASTA3 and BLAST algorithms, at the European Bioinformatics Institute Web site. The EMBL accession numbers for the sequences described in this article are AJ582082, AJ749813, AJ830893, and AJ830894.

Cloning of heme uptake genes using the *tonB* gene as a probe

In a previous study (Osorio et al. 2004), plasmid F-64, bearing a *tonB* gene and partial *exbB* and *hutW* genes on a Sau3AI fragment, was initially isolated by a ferric

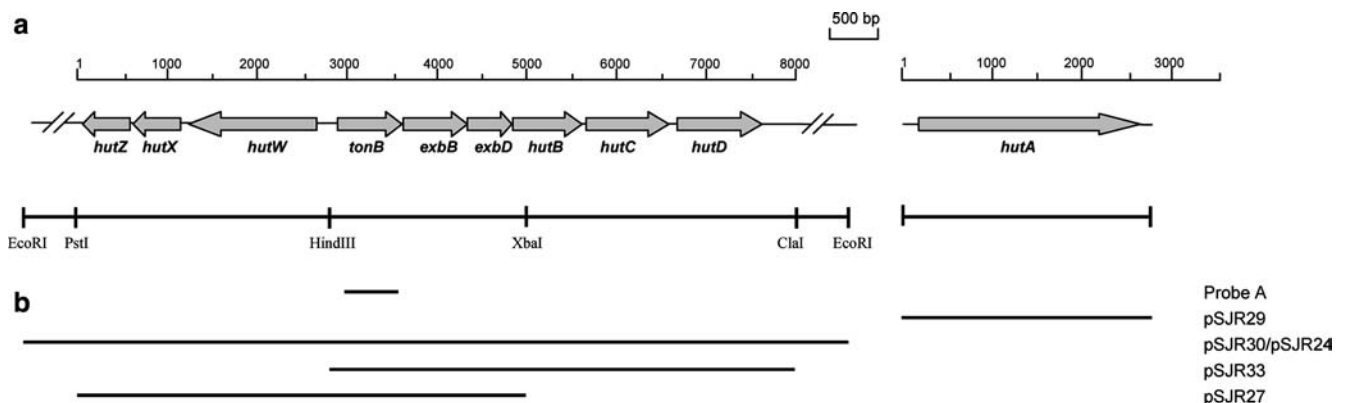
Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s)	Reference/source
<i>Photobacterium damsela</i> ssp. <i>piscicida</i>		
DI21	Highly virulent	Seabream, Spain
10831	Highly virulent	Seabass, France
IT-1	Highly virulent	Seabream, Italy
MP-7801	Highly virulent	Yellowtail, Japan
MZS-8001	Highly virulent	Yellowtail, Japan
ATCC17911	Moderately virulent	White perch, USA
ATCC29690	Nonvirulent	Yellowtail, Japan
EPOY 8803-II	Nonvirulent	Red grouper, Japan
<i>P. damsela</i> ssp. <i>damsela</i>		
RG-91	Highly virulent	Turbot, Spain
RM-71	Highly virulent	Turbot, Spain
CDC-2227-81	Highly virulent	Human, USA
RG-153	Highly virulent	Turbot, Spain
RG-214	Highly virulent	Turbot, Spain
ATCC33539	Moderately virulent	Damselfish, USA
LD-07	Moderately virulent	Seabream, Spain
ATCC35083	Nonvirulent	Brown shark, USA
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	Cloning strain	Laboratory stock
101ESD	HB101 derivative, deficient in enterobactin biosynthesis $\Delta(entC-entA)$	Laboratory stock
H1717	<i>araD139</i> $\Delta lacU169$ <i>rspL150</i> <i>relA1</i> <i>flb5301</i> <i>deoC1</i> <i>ptsF25</i> <i>rbsR</i> <i>aroB</i> <i>fhuF::\lambda</i> <i>placMu</i>	Hantke 1987
Plasmids		
pGEMT-Easy	PCR cloning vector, ampicillin sodium salt (Ap) ^r	Promega
pWKS30	Low-copy-number plasmid vector, Ap ^r	Wang and Kushner (1991)
pACYC177	Cloning vector, Ap ^r , kanamycin (Km) ^r	Rose (1988)
pT7-7	Cloning vector, Ap ^r	Tabor and Richardson (1985)
pCAR121	<i>Apa</i> LI fragment of pML1 containing <i>V. anguillarum</i> <i>huvA</i> gene cloned into pACYC177, Km ^r	Mouriño et al. (2004)
pSJR29	<i>Sau</i> 3AI fragment of CDC 2227-81 containing <i>hutA</i> cloned in pACYC177	This study
pSJR28	CDC 2227-81 <i>hutA</i> cloned in pGEMt-Easy	This study
pSJR24	<i>hutZXWtonBexbBDhutBCD</i> genes of <i>P. damsela</i> ssp. <i>piscicida</i> DI21 cloned into pWKS30, Ap ^r	This study
pSJR30	<i>hutZXWtonBexbBDhutBCD</i> genes of <i>P. damsela</i> ssp. <i>damsela</i> CDC 2227-81 cloned into pWKS30, Ap ^r	This study
pSJR27	DI21 <i>hutZXWtonBexbBD</i> genes cloned in pCR 2.1 TOPO	This study
pSJR33	DI21 <i>tonBexbBDhutBCD</i> genes cloned in pCR 2.1 TOPO	This study

uptake regulator (Fur) titration assay from a *P. damsela* subsp. *piscicida* strain DI21 genomic library. Based on previously reported heme uptake gene clusters

Fig. 1 a Physical map of the heme uptake gene cluster of *Photobacterium damsela*. Open reading frames are depicted as arrows, which indicate the direction of transcription. Only relevant restriction sites are shown. **b** Relevant plasmid derivatives of the heme uptake cluster

in other species of *Vibrionaceae*, we hypothesized that *P. damsela* heme uptake genes could be chromosomally linked to the *tonB* gene. Thus, for cloning of the complete TonB system and flanking genes, *P. damsela* subsp. *damsela* clinical isolate CDC 2227-81 and subsp. *piscicida* fish isolate DI21 chromosomal DNA were digested with various restriction enzymes and examined by



Southern blotting with probe A (Fig. 1b) designed on the basis of the known nucleotide sequence of plasmid F-64. Genomic DNA *EcoRI*–*EcoRI* fragments hybridizing with probe A were excised from agarose gels and ligated into plasmid vector pWKS30. Pools of recombinant colonies were screened by PCR with oligos internal to *tonB* gene to isolate plasmids pSJ30 (CDC 2227-81) and pSJ24 (DI21) (Table 1). Subcloning of these plasmids was accomplished using suitable restriction sites.

Cloning of the heme receptor *hutA*

A genomic library of *P. damsela* subsp. *damsela* CDC 2227-81 was constructed by cloning *Sau3AI* partially digested chromosomal DNA in the *BamHI* site of plasmid vector pACYC177 and used to transform competent cells of *E. coli* 101ESD/pSJ24. Transformants were screened on CM9 minimal medium containing 150 μ M 2,2'-dipyridyl, 50 μ g ml⁻¹ ampicillin, 50 μ g ml⁻¹ Km and 10 μ M hemin. Colonies, which grew on these media, were isolated and selected for further studies. After plasmid DNA purification, transformation in DH5 α and selection for Km resistance, we isolated plasmid pSJ29 (CDC 2227-81).

RNA isolation and RT-PCR

To determine the transcriptional organization of the heme uptake gene cluster, *P. damsela* subsp. *damsela* CDC 2227-81 and subsp. *piscicida* DI21 were grown in TSB-1 and then subcultured on CM9 minimal medium. Total RNA was prepared using the RNeasy Isolation Reagent (Ambion), according to the manufacturer's instructions. RNA preparations were then subjected to standard treatments with RNase-free DNaseI. Reverse transcription reaction was performed by using the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). For each reaction, 1 μ g of total RNA was used. Subsequent PCR amplification was carried out with *Taq* polymerase (Bioline) using suitable primers. As negative controls, DNA contamination of the RNA samples was ruled out by PCR using *Taq* DNA polymerase without reverse transcriptase. As positive controls, each primer combination was tested in PCR reactions carried out using chromosomal DNA as a template.

To determine the iron-mediated regulation of the heme uptake cluster transcriptional units, RNA was purified from *P. damsela* cells grown in TSB-1, and in TSB-1 supplemented with either FeSO₄ (10 μ M), or the iron chelator 2,2'-dipyridyl to final concentrations of 100 μ M and 300 μ M. RNA concentrations were adjusted spectrophotometrically, and RT-PCR was carried out as described above using suitable primers. As a control reaction, the 16S rRNA was reverse-amplified with the universally conserved oligo PH targeted to the 3' end of the 16S transcript, and PCR was carried out using

P. damsela 16S-specific primers *car1* and *car2* (Osorio et al. 1999).

Fur titration assay

For the detection of Fur boxes in the promoter regions of the heme uptake cluster genes described in this study, the Fur titration assay was carried out as previously described (Stojiljkovic et al. 1994), using the indicator *E. coli* strain H1717 (Hantke 1987). This strain carries a Fur-regulated *fhu::lacZ* gene fusion that is particularly sensitive to changes in the concentration of the Fur repressor. Plasmids, which contain a Fur-binding site, will cause derepression of the fusion by titrating the Fur protein, thus leading to transcription of the *lacZ* gene and the expression of a Lac⁺ phenotype. Recombinant plasmids were introduced into the indicator *E. coli* strain H1717, and transformants were screened for the Lac⁺ phenotype on MacConkey lactose agar plates (Difco) supplemented with 20 μ M ferrous ammonium sulfate. Results were annotated as Furta⁺ (Lac⁺ phenotype) and Furta⁻ (Lac⁻ phenotype).

Complementation of *E. coli* 101ESD

To test which genes of the *P. damsela* heme uptake cluster were essential for the utilization of hemin and hemoglobin as iron sources in *E. coli* 101ESD Δ (*entC-entA*), this strain was transformed with several plasmids (Table 1). About 100 μ l of overnight cultures of each transformant were added to 3 ml of molten soft CM9 and plated onto appropriate pre-poured CM9 or CM9 supplemented with 150 μ M 2,2'-dipyridyl plates. Sterile filter-paper disks were loaded with 20 μ l of either 5 m *M* hemin or 1 m *M* hemoglobin. Disks spotted with 20 μ l of 5 m *M* FeSO₄ were included as positive controls for utilization of iron sources. Results were annotated as positive or negative after 24 h of incubation.

Results and discussion

P. damsela heme utilization genes are linked to one set of *tonB-exbB-exbD* genes

The genetic organization of the *P. damsela* subsp. *damsela* strain CDC 2227-81 and subsp. *piscicida* strain DI21 heme utilization gene cluster was determined by DNA sequence analysis of pSJ30 and pSJ24, two recombinant plasmids containing DNA fragments that hybridized to the *tonB1* gene of *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21.

A DNA region spanning ca. 8,000 bp was sequenced in plasmid pSJ30, and nine closely linked open reading frames (ORFs) were identified (Fig. 1a). The predicted products displayed high similarity to components of

Table 2 Proteins with homology to open reading frames of *P. damsela* subsp. *damsela* CDC 2227-81 heme utilization gene cluster

<i>P. damsela</i> ssp. <i>damsela</i> protein	Homologue	EMBL accession number	Amino acid identity (%)	Amino acid similarity (%)
HutA	<i>P. damsela</i> ssp. <i>piscicida</i> HutA	AJ830894	98	99
	<i>Vibrio mimicus</i> MhuA	Q9AQK5	45	63
	<i>V. parahaemolyticus</i> HutA	Q87HSH4	31	49
	<i>V. anguillarum</i> HuvA	Q70YH5	34	52
HutZ	<i>P. damsela</i> ssp. <i>piscicida</i> HutZ	Q70GE2	98	100
	<i>V. vulnificus</i> hypothetical protein	Q7MF93	69	81
	<i>V. cholerae</i> HutZ	Q9KL41	68	80
	<i>V. parahaemolyticus</i> hypothetical protein	Q87J24	66	82
HutX	<i>P. damsela</i> ssp. <i>piscicida</i> HutX	Q70GE1	100	100
	<i>V. cholerae</i> HutX	Q9KL40	66	83
	<i>V. vulnificus</i> hypothetical protein	Q7MF94	66	83
	<i>V. anguillarum</i> HuvX	Q70YH3	63	81
HutW	<i>P. damsela</i> ssp. <i>piscicida</i> HutW	Q70GE0	96	97
	<i>V. parahaemolyticus</i> PhuW	Q87J26	60	76
	<i>V. vulnificus</i> hypothetical protein	Q7MF95	59	76
	<i>V. cholerae</i> HutW	Q9KL39	59	76
TonB1	<i>P. damsela</i> ssp. <i>piscicida</i> TonB1	Q8RK39	94	96
	<i>V. parahaemolyticus</i> TonB1	Q87J27	41	56
	<i>V. cholerae</i> TonB1	Q52042	43	58
ExbB1	<i>P. damsela</i> ssp. <i>piscicida</i> ExbB1	Q8RK38	97	98
	<i>V. anguillarum</i> ExbB1	Q70YH1	64	81
	<i>V. parahaemolyticus</i> ExbB1	Q9XCY5	67	83
ExbD1	<i>P. damsela</i> ssp. <i>piscicida</i> ExbD1	Q8RK37	97	100
	<i>V. vulnificus</i> ExbD1	Q8D3S5	53	78
	<i>V. anguillarum</i> ExbD1	Q70YH0	55	72
HutB	<i>P. damsela</i> ssp. <i>piscicida</i> HutB	Q70GD6	96	99
	<i>V. parahaemolyticus</i> HutB	Q87J30	49	68
	<i>V. anguillarum</i> HuvB	Q70YG9	53	70
	<i>V. vulnificus</i> heme transporter	Q7MF99	48	67
HutC	<i>P. damsela</i> ssp. <i>piscicida</i> HutC	Q70GD5	99	99
	<i>V. parahaemolyticus</i> HutC	Q87J31	64	81
	<i>V. vulnificus</i> heme transporter	Q8D3S7	62	79
	<i>V. anguillarum</i> HuvC	Q70YG8	64	81
HutD	<i>P. damsela</i> ssp. <i>piscicida</i> HutD	Q70GD4	97	98
	<i>V. parahaemolyticus</i> HutD	Q87J32	57	74
	<i>V. cholerae</i> HutD	O52047	54	74
	<i>V. vulnificus</i> heme transporter	Q7MFA1	54	72

heme-uptake systems described in *Vibrio* species. Three ORFs were shown to encode homologues of described TonB1, ExbB1, and ExbD1 proteins (Table 2). The TonB, ExbB, and ExbD proteins are key components of a cytoplasmic membrane complex involved in the transport of ferric siderophore complexes and heme through the outer membrane of gram-negative bacteria. In a previous study (Osorio et al. 2004), we demonstrated that *P. damsela* subsp. *piscicida* harbored at least two sets of genes encoding TonB, ExbB, and ExbD proteins. In the present study, we show that the arrangement of *tonB-exbB-exbD* genes in the TonB1 system of *P. damsela* is the same as described for other *Vibrionaceae*.

A gene, which we termed *hutW*, was found 396 bp upstream of *tonB1* start codon and is transcribed from the opposite strand. *hutW* encodes a 465-amino acid protein with homology to proteins linked to described heme transport gene clusters (Table 2). All these proteins share homology to described oxygen-independent coproporphyrinogen oxidases, an enzyme that converts coproporphyrinogen III into protoporphyrin IX, one of

the steps in heme biosynthesis pathway (Panek and O'Brian 2002). However, the actual biological function has not specifically been demonstrated in any of the *hutW* homologues in *Vibrio* species.

The next ORF in the cluster corresponds to the *hutX* gene, located 131 nucleotides downstream of *hutW* stop codon, and codes for a predicted protein of 148 amino acids, with similarity to hypothetical proteins linked to heme transport genes of *Vibrio* species (Table 2). None of the HutX homologues have a known function, and deletion of this homologue in *V. anguillarum* exhibited no significant effect on the utilization of heme as a source of nutrient iron (Mouriño et al. 2004). Downstream of HutX we found an ORF, which we termed HutZ based on nomenclature used for the closest homologues (Table 2). In *V. anguillarum*, deletion of *huvZ* (a *hutZ* homologue), drastically reduces the ability of the bacterium to grow with heme as the sole iron source, indicating that this gene is essential for heme iron utilization (Mouriño et al. 2004). In *V. cholerae*, it has recently been reported that HutZ is required for heme utilization as an iron source, and it is hypothesized that

this protein acts as a heme storage protein as it binds heme with high efficiency (Wyckoff et al. 2004).

Three additional genes are transcribed downstream of *P. damsela* *exbD* gene and code for proteins which show characteristics of heme transport proteins (Table 2). The predicted start codon for the seventh ORF of the cluster, HutB, overlaps with the stop codon of the preceding *exbD* gene. It encodes a predicted 298-amino acid protein with homology to putative periplasmic heme-binding proteins (Table 2). These proteins are believed to be involved in the transport of heme across the periplasm from the receptor to the ABC transporter located in the inner membrane.

The eighth ORF of the cluster encodes a 345-amino acid protein, which we termed HutC, and has homology to members of a family of ABC-type permease proteins involved in the uptake of iron, and which are linked to genes of the TonB system and to outer membrane heme receptor genes in species of *Vibrio* (Table 2). The last ORF of the cluster was termed HutD, and its start codon overlapped with the stop codon of the upstream *hutC* gene. The predicted 266-amino acid HutD protein showed homology to the ATP-binding protein component of permeases involved in heme transport (Table 2) as well as to the ATP-binding permease proteins of the *E. coli* ferric citrate and ferrichrome transport systems.

The predicted HutD ORF contains features common for ABC transporter ATPases: the walkerA nucleotide-binding consensus motif GPNGAGKS (positions 46–53) and the walkerB motif LMLDE (positions 172–176). These two sites are part of a highly conserved ATP-binding motif that conforms to an ATP-binding pocket (Walker et al. 1982). In addition, an ABC transporter signature motif, LSGGE, is found at positions 146–150 of HutD. The presence of these features suggests that *P. damsela* HutD is the ATPase component of the heme ABC-transporter. The involvement of *hutBCD* homologues in heme transport has been demonstrated in *V. anguillarum*, where each of these genes was shown to be essential for heme iron utilization as an iron source in this fish pathogen (Mouriño et al. 2004).

Analysis of plasmid pSJR24 showed that the sequence and structure of the heme uptake cluster in *P. damsela* subsp. *piscicida* strain DI21 is nearly identical to that of *P. damsela* subsp. *damsela* CDC 2227-81 (data not shown). The identity at the nucleotide sequence level between the clusters of CDC 2227-81 and of DI21 was 97%. The identities and similarities of the nine ORFs between the two strains at the amino acid level are reflected in Table 2.

The spatial organization of heme uptake genes in the chromosome of *P. damsela* is similar to that described in *Vibrio* species and in *P. shigelloides*. Similarly to what has been described in *V. cholerae*, *V. vulnificus*, and *V. parahaemolyticus*, we could not find an ORF coding for a putative outer membrane heme receptor downstream of *hutZ* or *hutD*. Thus, we hypothesized that the *P. damsela* heme receptor is located in a chromosomal location distant from the rest of heme transport and utilization genes.

Transcriptional organization of the nine-gene heme uptake cluster

In a previous study, we demonstrated that a potential binding site for the Fur repressor protein exists in the DNA sequence between *tonB* and *hutW* genes in *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 strain (Osorio et al. 2004). In the present study, an in silico analysis of the complete nine-gene cluster cloned in pSJR30 and pSJR24 did not evidence additional potential Fur boxes. We hypothesized that promoter sequences upstream of *tonB* and *hutW*, respectively, would lead to the transcription of all the remaining genes of the heme uptake cluster, constituting two divergently transcribed operons. To confirm this hypothesis, the possible cotranscription of *tonBexbBDhutBCD* was assayed in a RT reaction with a primer (RT-1) targeted to the 3' end of *hutD*, and PCR reactions were performed with different primer pairs that amplify *hutB*, *exbB*, and *tonB* genes, respectively (Fig. 2a). To assay the cotranscription of *hutZXW*, a primer (RT-2) targeted to the 3' end of *hutZ* gene was used in the RT reaction, and a PCR reaction was performed with a primer pair targeted to

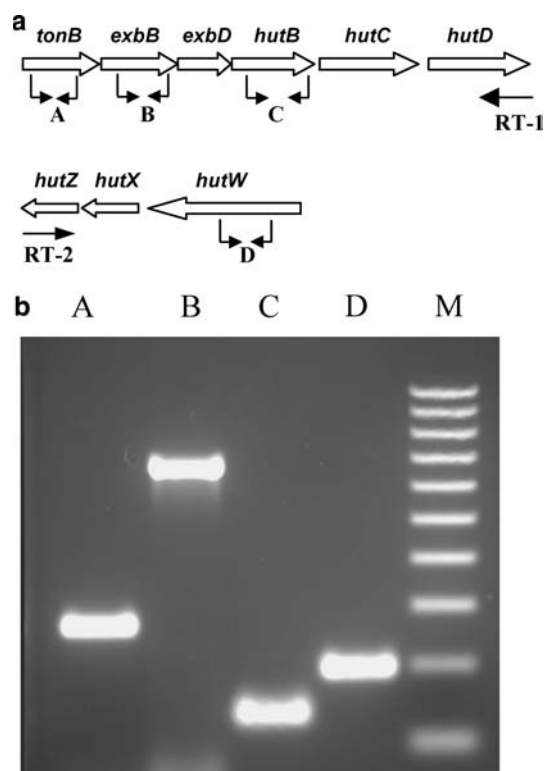


Fig. 2 a Operon mapping by RT-PCR analysis of the heme uptake gene cluster. Predicted RT-PCR fragments are shown below each gene. b Results from the RT-PCR. The gel lanes match the RT-PCR fragment labels shown in a. Lane M 100-bp DNA ladder

the *hutW* gene (Fig. 2a). Each RT-PCR gave a product of the expected size (Fig. 2b). Negative and positive controls (see “Material and methods”) corroborated the accuracy of the RT-PCR results (data not shown). These results demonstrate that the nine genes of the heme uptake cluster are arranged in two operons, *hutW-hutX-hutZ*, and *tonB-exbB-exbD-hutB-hutC-hutD*. This is consistent with the results previously reported in *V. cholerae*, where the *hutBCD* genes were shown to be on the same transcript as the *tonB-exbB-exbD* genes (Occhino et al. 1998).

Construction of a heme-uptake hybrid system in *E. coli* 101ESD with *V. anguillarum* *huvA*

In order to set up a strategy to clone the putative outer membrane heme receptor of *P. damsela*, a hybrid genetic system, which included a plasmid harboring the *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 nine-gene heme uptake cluster described here (pSJR24) and a plasmid containing the *V. anguillarum* heme receptor *huvA* (pCAR121) (Mouriño et al. 2004) was constructed in *E. coli* 101ESD [Δ (*entC-entA*)], and tested for its ability to transport heme. The *entC-entA* deletion renders *E. coli* 101ESD unable to grow in the presence of iron chelators unless supplied with an utilizable source of iron. 101ESD could satisfy the iron limitation by utilizing exogenously supplied hemin, as long as a genetic system for hemin uptake is provided.

Results demonstrated that the strain 101ESD/pCAR121/pSJR24 containing the hybrid system was able to grow on CM9 plates supplemented with 150 μ M 2,2'-dipyridyl, with hemin and hemoglobin as sole iron sources, demonstrating the involvement of genes cloned in pSJR24 in heme transport. Thus, we hypothesized that if an outer membrane receptor for heme existed in *P. damsela*, it would be feasible to isolate it by complementing 101ESD/pSJR24 with a *P. damsela* genomic library.

Cloning of *hutA*, the *P. damsela* heme receptor

Plasmid pSJR29 was isolated by complementation of *E. coli* 101ESD/pSJR24 with a genomic library of *P. damsela* subsp. *damsela* human isolate CDC 2227-81 genomic DNA in pACYC177. DNA sequence of pSJR29 revealed a complete ORF coding for a putative 718-amino acid protein. A search of protein databases revealed significant homology to described outer membrane heme receptors (Table 2). Based on these homologies and in the functional complementation of *E. coli* 101ESD/pSJR24 for heme utilization, we named this gene *hutA*, the outer membrane heme receptor of *P. damsela* subsp. *damsela*. HutA contains conserved features that are common to other TonB-dependent outer membrane heme receptors. These include a TonB box similar to *V. vulnificus*

HupA, *V. cholerae* HutA, and *V. anguillarum* HuvA TonB boxes, as well as a conserved FRAP box, a motif that is conserved among outer membrane heme receptors (Fig. 3). *P. damsela* HutA also contains a conserved phenylalanine residue at the C-terminal region (Fig. 3) that is thought to be involved in the incorporation of the protein into the outer membrane (Struyve et al. 1991).

The promoter region of *P. damsela* *hutA* was shown to contain a putative binding site for the Fur protein (the so-called Fur box, GATAATGATAGTAAT-TATC), with an identity of 16 out of 19 residues to the consensus Fur-box sequence described in *E. coli* (GATAATGATAATCATTATC) (de Lorenzo et al. 1987). To verify that this putative Fur box constituted a site for the binding of the Fur repressor, a Fur titration assay was carried out with plasmid pSJR28 containing the complete *hutA* gene and upstream DNA cloned in the high-copy plasmid pGEMt-Easy. When transformed in the indicator strain H1717, this plasmid conferred a Lac⁺ phenotype (data not shown). This suggests that the promoter of *hutA* gene is iron-regulated through the binding of the Fur repressor. A Fur-mediated regulation of iron uptake genes was expected in *P. damsela*, because a Fur homologue acting as an iron-responsive transcriptional regulator has been recently described in this species (Juíz-Río et al. 2004).

A pair of PCR primers, P1 and P2, which flanked the complete *hutA* ORF, were designed on the sequence of strain CDC 2227-81 and used to amplify the *hutA* gene in subsp. *piscicida* strain MP-7801. DNA sequencing revealed an ORF coding for a 718-amino acid protein that showed 98% identity (14 differences in 718 positions) with the HutA protein of *P. damsela* subsp. *damsela* strain CDC 2227-81 (Table 2; Fig. 3). The MP-7801 HutA sequence was 99% identical to PPH, a protein recently described in a Japanese strain of subsp. *piscicida* (Naka et al. 2005) and which was suggested to constitute the heme receptor of *P. damsela* subsp. *piscicida* due to its similarity with described heme receptors.

The gene coding for the *P. damsela* outer membrane heme receptor is not linked to the rest of heme transport genes. Such a spatial organization is usual in other species of *Vibrionaceae* (Heidelberg et al. 2000; Chen et al. 2003; Makino et al. 2003), but differs from that described in *V. anguillarum*, where the heme receptor is closely linked to the rest of heme transport genes (Mouriño et al. 2004).

Iron regulation of *hutA*, *hutW*, and *tonB* promoters

Expression of RNA transcripts of the three transcriptional units in the heme-uptake system of *P. damsela* was analyzed under normal, iron-rich and iron-limiting conditions using RT-PCR. Results showed that *hutA*, *hutW*, and *tonB* transcripts were weakly expressed under iron-rich conditions, with the intensity of the bands

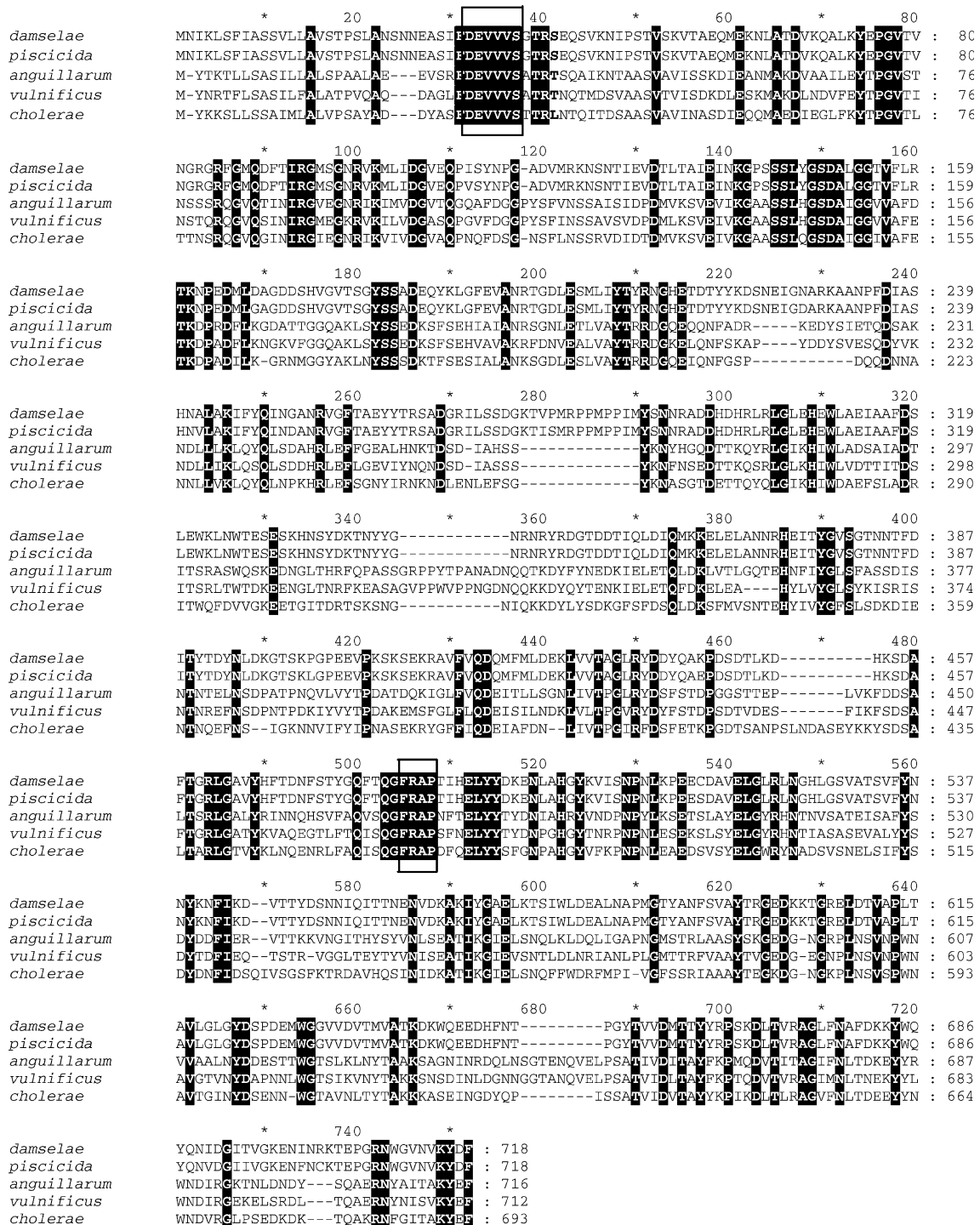


Fig. 3 Alignment of the amino acid sequences of *P. damsela* subsp. *damsela* HutA (EMBL accession number Q5K376), *P. damsela* subsp. *piscicida* HutA (Q659V2), *V. cholerae* HutA (L27149), *V. vulnificus* HupA (O85161), and *V. anguillarum* HuvA (Q7OYH5). Numbers indicate the amino acid position in the unprocessed protein. Residues, which are conserved in the four proteins are shaded. Conserved TonB-box and FRAP-box domains are boxed

significantly reduced when compared to the bands obtained from samples cultured under increasing amounts of iron chelator (Fig. 4). As a control, we showed that

the level of 16S RNA expression was not significantly affected by the iron load of the culture. The observed iron-mediated regulation of the three putative promoters is in agreement with the existence of conserved putative Fur-binding sites upstream of the start codons of *hutA*, *hutW*, and *tonB* genes. Iron regulation mediated by Fur of the different genes involved in heme uptake has been reported in different bacteria (Litwin and Byrne 1998; Henderson and Payne 1993; Stojiljkovic and Hantke 1992; King et al. 2005). This regulation is in agreement

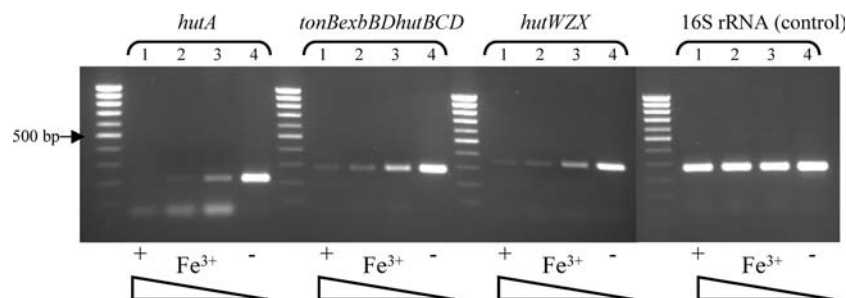
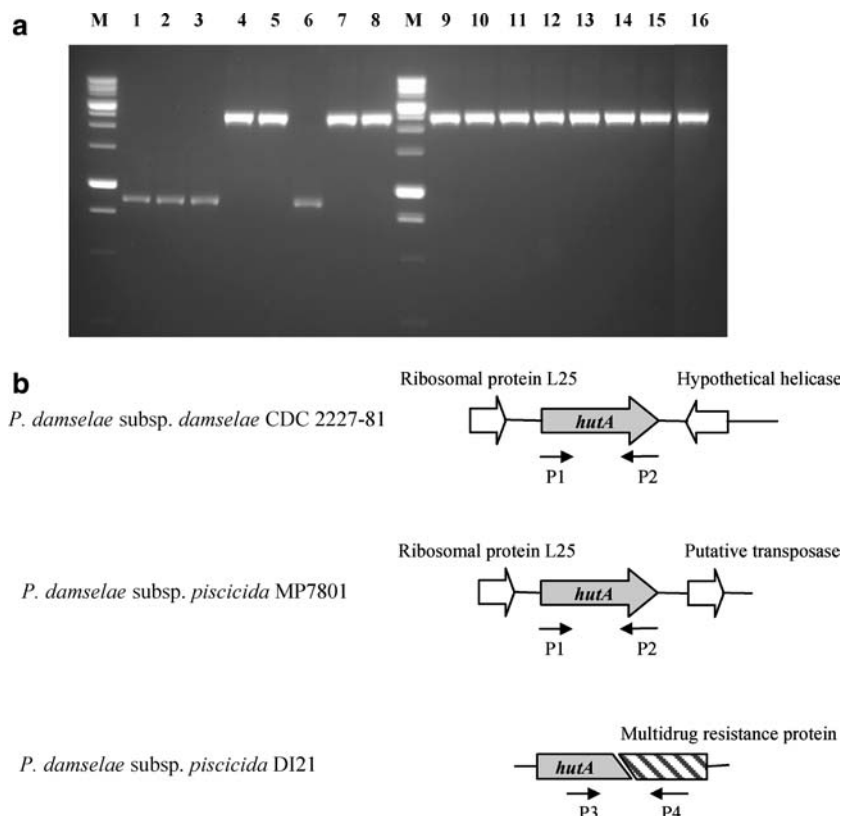


Fig. 4 RT detection of mRNA in *P. damsela* ssp. *piscicida* MP7801 under different iron conditions. Lane 1 Tryptic Soy Broth (TSB) + 10 μ M FeSO₄, lane 2 TSB, lane 3 TSB + 100 μ M 2,2'-dipyridyl, lane 4 TSB + 300 μ M 2,2'-dipyridyl. The amplified fragments in each transcriptional unit are as follows: *hutA* transcript, a 204-bp fragment internal to *hutA* gene; *tonBexbDhutBCD* transcript, a 260-bp fragment internal to *tonB* gene; *hutWZX* transcript, a 340-bp fragment internal to *hutX* gene; and 16S rRNA transcript, a 267-bp fragment internal to 16S rRNA gene

Fig. 5 a Results of PCR screening of *P. damsela* strains for the presence of either complete or disrupted *hutA* gene coding for the outer membrane heme receptor, with primer combinations P1-P2 (lanes 4, 5, and 7–16) or P3-P4 (lanes 1–3 and 6), respectively. Lanes 1–8 *P. damsela* subsp. *piscicida* strains DI21, 10831, IT-1, MP-7801, MZS-8001, ATCC 17911, ATCC29690, and EPOY 8803-II. Lanes 9–16 *P. damsela* subsp. *damsela* strains RG-91, RM-71, CDC 2227-81, RG-153, RG-214, ATCC 33539, LD-07, and ATCC 35083. M Molecular size marker. **b** Schematic representation of the genetic organization of *hutA* and neighboring DNA in three different *P. damsela* strains, depicting three distinct possibilities. P1, P2, P3, and P4 are the primers used in the PCR screening



with the role of heme uptake as a mechanism to get iron from the cell environment.

Distribution of the heme receptor *hutA* in *P. damsela* isolates: the presence of *hutA* pseudogenes

PCR primers P1 and P2 flanking the complete *hutA* ORF were used to test a collection of *P. damsela* strains. All the subsp. *damsela* isolates yielded a fragment of the expected size (Fig. 5a). However, among the subsp. *piscicida* strains, only the four Japanese isolates (MP7801, MZS8001, EPOY 8803-II, and ATCC 29690) yielded amplification of complete *hutA* gene (Fig. 5a, lanes 4, 5, 7, and 8).

When a pair of primers flanking the 5' half of *hutA* gene were used, amplification was obtained in all the subsp. *piscicida* strains, whereas other primer combinations that flanked the 3' half of the gene yielded amplification exclusively in the Japanese isolates (data not shown). We hypothesized that a gene disruption

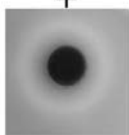
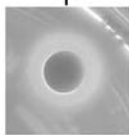
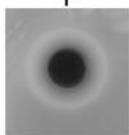
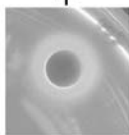
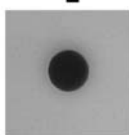
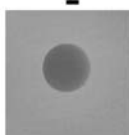
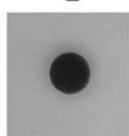
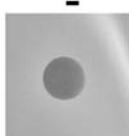
plasmids	gene combination	Hemin 5 mM	Hemoglobin 1 mM
pSJR29/pSJR24	<i>hutA hutZXW tonBexbBD hutBCD</i>	+	+
			
pSJR29/pSJR33	<i>hutA tonBexbBD hutBCD</i>	+	+
			
pSJR29	<i>hutA</i>	-	-
			
pSJR29/pSJR27	<i>hutA hutZXW tonBexbBD</i>	-	-
			

Fig. 6 Utilization of hemin and hemoglobin as iron sources by *Escherichia coli* 101ESD complemented with different combinations of *P. damsela* heme uptake genes. Assay was conducted on CM9 plates supplemented with 150 μ M 2,2'-dipyridyl

occurred in the non-Japanese subsp. *piscicida* strains in the *hutA* gene. DNA sequences surrounding the 5' half of subsp. *piscicida* DI21 *hutA* gene were amplified by inverse PCR and sequenced, demonstrating that *hutA* is interrupted in the genome of strain DI21 and linked to an interrupted ORF coding for a putative multidrug resistance protein (Fig. 5b). The existence of this genetic structure was confirmed by direct PCR amplification and sequencing (data not shown).

In order to ascertain whether a similar gene disruption existed in the genome of other subsp. *piscicida* strains that proved negative for the complete *hutA* gene, we designed primer P4, targeted to the sequence of the putative multidrug resistance protein that was used in a PCR reaction in combination with primer P3, targeted to the 5'-end of *hutA*. All the strains, which had tested negative for complete *hutA* gene, now yielded a similar amplification product to that of DI21, indicating that *hutA* and neighboring downstream DNA have undergone the same deletion or insertion event (Fig. 5a, lanes 1–3 and 6). This suggests clearly that all the strains with *hutA* similarly interrupted share the same clonal origin. In order to analyze the DNA sequence in the vicinity of *hutA* in subsp. *piscicida* strains, which did not undergo the deletion/insertion event, inverse PCR was carried out using chromosomal DNA of subsp. *piscicida* strain MP-7801. DNA sequencing of the amplification product showed that the *hutA* gene of strain MP-7801 is preceded by a ribosomal protein L25 homologue, as in subsp. *damsela*

strains (Fig. 5b). However, a gene coding for a putative transposase was evidenced downstream of the *hutA* stop codon, which had not been encountered in subsp. *damsela* strains (Fig. 5b). We hypothesize that the presence of this transposase could be related to insertion sequences or transposons, which would have played a role in the reorganization of its neighboring DNA, thus leading to the generation of a *hutA* pseudogene.

It is interesting that the complete gene for HutA heme receptor was found in all the subsp. *damsela* strains analyzed, but only in four Japanese isolates of subsp. *piscicida*, whereas five other subsp. *piscicida* strains were shown to harbor a *hutA* pseudogene. In a previous study (Magariños et al. 2000), it was proposed the possibility that two distinct clonal lineages exist within *P. damsela* subsp. *piscicida*, represented by the European isolates on one hand and the Japanese isolates on the other. The fact that this pseudogene occurs in all the European and American isolates supports that idea. This is a particularly interesting data for epidemiological typing of strains of this fish pathogen. In addition, because all the assayed subsp. *piscicida* strains could utilize heme as sole iron source (Magariños et al. 1994), the presence of a *hutA* pseudogene in some isolates raises the question that an additional, yet undescribed outer membrane heme receptor may exist in some *P. damsela* subsp. *piscicida* strains.

Utilization of heme compounds by *E. coli* 101ESD complemented with *P. damsela* genes

In the results shown above, it was evidenced that *E. coli* 101ESD complemented with a plasmid carrying the

nine genes *hutZXWtonBexbBDhutBCD* can use hemin as sole iron source as long as it is complemented with the *hutA* gene, which can substitute for the function of the well-described *V. anguillarum* outer membrane heme receptor *huvA* (Mazoy et al. 2003). This suggests that *hutA* is the outer membrane heme receptor of *P. damsela*. In order to determine the minimum genetic background necessary for utilization of heme as an iron source in *E. coli* 101ESD, different gene combinations were assayed (Fig. 6). For this purpose, suitable restriction sites were used to subclone fragments of pSJR30 and pSJR24 (Fig. 1B). Heme iron utilization did not occur when 101ESD was transformed with pSJR29 (*hutA*) plus pSJR27 (*hutZXWtonBexbBD*). However, when complete *tonBexbBDhutBCD* genes cloned in pSJR33 were transformed into 101ESD/pSJR29 (*hutA*), this strain could utilize hemin and hemoglobin as iron sources. These results demonstrate that *tonBexbBDhutBCD* genes in combination with *hutA* are necessary for heme iron utilization in *E. coli* 101ESD, but *hutZXW* are not (Fig. 6). However, as reported in *P. shigelloides*, some of *hutZXW* homologues could play a role in preventing heme toxicity when *E. coli* is complemented with a heme-uptake system and grown in the presence of heme (Henderson et al. 2001). In summary, our results of *E. coli* complementation are in agreement with previous studies (Occhino et al. 1998; Mouriño et al. 2004) reporting that utilization of hemin as iron source can be reconstituted in *E. coli* with either *V. cholerae* *hutA* and *tonBexbBDhutBCD* or *V. anguillarum* *huvA*, *tonBexbBDhuvBCD* genes, respectively.

Conclusions

In this work, we have characterized a set of genes from *P. damsela* involved in heme uptake. Although they share common features with other gram-negative bacteria, the presence of *P. damsela* subsp. *piscicida* strains with interrupted *hutA* genes introduces interesting perspectives about the evolution of this fish pathogen. From a practical point of view, the variability observed could be used to define epidemiological markers for a better characterization of the fish pathogen subspecies strains. Future studies will focus on analyzing the implication of the *P. damsela* heme-uptake system in virulence. Furthermore, the presence of *hutA* pseudogenes suggests that an alternative, not yet characterized heme receptor might be present in some ssp. *piscicida* strains. Studies to ascertain this possibility are currently under way.

Acknowledgements This work was supported by grants AGL2000-0492 and AGL2003-00086 from the Ministry of Science and Technology of Spain (grants cofunded by the FEDER Programme from the European Union), and grant PGI-DIT04PXIC23501PN from Xunta de Galicia to M.L.L. S.J.R. also thanks the Spanish Ministry of Science and Technology for a predoctoral fellowship.

References

- Buck JD, Overstrom NA, Patton GW, Anderson HF, Gorzelany JF (1991) Bacteria associated with stranded cetaceans from the northeast USA and southwest Florida Gulf coasts. *Dis Aquat Org* 10:147–152
- Chen CY, Wu KM, Chang YC, Chang CH, Tsai HC, Liao TL, Liu YM, Chen HJ, Shen ABT, Li JC, Su TL, Shao CP, Lee CT, Hor LI, Tsai SF (2003) Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res* 13:2577–2587
- Crosa JH (1989) Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol Rev* 53:517–530
- do Vale A, Magariños B, Romalde JL, Lemos ML, Ellis AE, Toranzo AE (2002) Binding of haemin by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Dis Aquat Org* 48:109–115
- Fouz B, Conchas RF, Magariños B, Amaro C, Toranzo AE (1992) *Vibrio damsela* strain virulence for fish and mammals. *FHS/AFS Newsl* 20:3–4
- Fouz B, Barja JL, Rivas C, Amaro C, Toranzo AE (1993) Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolated from diseased fish. *Curr Microbiol* 27:341–347
- Fouz B, Toranzo AE, Biosca EG, Mazoy R, Amaro C (1994) Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. *FEMS Microbiol Lett* 121:181–188
- Fraser SL, Purcell BK, Delgado B Jr, Baker AE, Whelen AC (1997) Rapidly fatal infection due to *Photobacterium (Vibrio) damsela*. *Clin Infect Dis* 25:935–936
- Gauthier G, Lafay B, Ruimy R, Breittmayer V, Nicolas JL, Gauthier M, Christen R (1995) Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45:139–144
- Genco CA, Dixon DW (2001) Emerging strategies in microbial haeme capture. *Mol Microbiol* 39:1–11
- Ghigo JM, Letoffe S, Wandersman C (1997) A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:3572–3579
- Goodell KH, Jordan MR, Graham R, Cassidy C, Nasraway SA (2004) Rapidly advancing necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium (Vibrio) damsela*: a hyperaggressive variant. *Crit Care Med* 32:278–281
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
- Hantke K (1987) Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol Gen Genet* 210:135–139
- Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Qin H, Dragoi I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishmann RD, Nierman WC, White O, Salzberg SL, Smith HO, Colwell RR, Mekalanos JJ, Venter JC, Fraser CM (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406:477–483
- Henderson DP, Payne SM (1993) Cloning and characterization of the *Vibrio cholerae* genes encoding the utilization of iron from haemin and haemoglobin. *Mol Microbiol* 7:461–469
- Henderson DP, Wyckoff EE, Rashidi CE, Oldham AL (2001) Characterization of the *Plesiomonas shigelloides* genes encoding the heme iron utilization system. *J Bacteriol* 183:2715–2723
- Juiz-Río S, Osorio CR, Lemos ML (2004) Identification and characterisation of the *fur* genes in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and subsp. *damsela*. *Dis Aquat Org* 58:157–164

- King ND, Kirby AE, Connell TD (2005) Transcriptional control of the *rhuIR-bhuRSTUV* heme acquisition locus in *Bordetella avium*. *Infect Immun* 73:1613–1624
- Kreger AS, Bernheimer AW, Etkin LA, Daniel LW (1987) Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytolysin and its interaction with sheep erythrocytes. *Infect Immun* 55:3209–3212
- Lee BC (1995) Quelling the red menace: haem capture by bacteria. *Mol Microbiol* 18:383–390
- Litwin CM, Byrne BL (1998) Cloning and characterization of an outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* required for heme utilization: regulation of expression and determination of the gene sequence. *Infect Immun* 66:3134–3141
- de Lorenzo V, Wee S, Herrero M, Neilands JB (1987) Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor. *J Bacteriol* 169:2624–2630
- Magariños B, Romalde JL, Lemos ML, Barja JL, Toranzo AE (1994) Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Appl Environ Microbiol* 60:2990–2998
- Magariños B, Bonet R, Romalde JL, Martínez MJ, Congregado F, Toranzo AE (1996a) Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microb Pathog* 21:289–297
- Magariños B, Toranzo AE, Romalde JL (1996b) Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annu Rev Fish Dis* 6:41–64
- Magariños B, Toranzo AE, Barja JL, Romalde JL (2000) Existence of two geographically-linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* evidenced by random amplified polymorphic DNA analysis. *Epidemiol Infect* 125:213–219
- Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nakano M, Yamashita A, Kubota Y, Kimura S, Yasunaga T, Honda T, Shinagawa H, Hattori M, Iida T (2003) Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361:743–749
- Mazoy R, Osorio CR, Toranzo AE, Lemos ML (2003) Isolation of mutants of *Vibrio anguillarum* defective in haeme utilisation and cloning of *huvA*, a gene coding for an outer membrane protein involved in the use of haeme as iron source. *Arch Microbiol* 179:329–338
- Mey AR, Payne SM (2001) Haem utilization in *Vibrio cholerae* involves multiple TonB-dependent haem receptors. *Mol Microbiol* 42:835–849
- Mills M, Payne SM (1997) Identification of *shuA*, the gene encoding the heme receptor of *Shigella dysenteriae*, and analysis of invasion and intracellular multiplication of a *shuA* mutant. *Infect Immun* 65:5358–5363
- Morris JG Jr, Wilson R, Hollis DG, Weaver RE, Miller HG, Tacket CO, Hickman FW, Blake PA (1982) Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae*. *Lancet* 1:1294–1297
- Mouriño S, Osorio CR, Lemos ML (2004) Characterization of the heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* 186:6159–6167
- Naka H, Hirano I, Aoki T (2005) Molecular cloning and functional analysis of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* haem receptor gene. *J Fish Dis* 28:81–88
- Occhino DA, Wyckoff EE, Henderson DP, Wrona TJ, Payne SM (1998) *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Mol Microbiol* 29:1493–1507
- Ochsner UA, Johnson Z, Vasil ML (2000) Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 146:185–198
- Osorio CR, Lemos ML (2002) Haeme iron acquisition mechanisms in *Vibrionaceae*. In: Pandalai SG (ed) Recent research developments in microbiology. vol 6. Research Signpost, Kerala, India, pp 419–436
- Osorio CR, Collins MD, Toranzo AE, Barja JL, Romalde JL (1999) 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for the rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Appl Environ Microbiol* 65:2942–2946
- Osorio CR, Romalde JL, Barja JL, Toranzo AE (2000) Presence of Phospholipase-D (*dly*) gene coding for damselysin production is not a pre-requisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Microb Pathog* 28:119–126
- Osorio CR, Lemos ML, Braun V (2004) Identification of Fur regulated genes in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* using the Fur titration assay. *Bio-metals* 17:725–733
- Panek H, O'Brian MR (2002) A whole genome view of prokaryotic biosynthesis. *Microbiology* 148:2273–2282
- Ratledge C, Dover LG (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54:881–941
- Reidl J, Mekalanos JJ (1996) Lipoprotein e(P4) is essential for hemin uptake by *Haemophilus influenzae*. *J Exp Med* 183:621–629
- Rose RE (1988) The nucleotide sequence of pACYC177. *Nucleic Acids Res* 16:356–356
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Stojiljkovic I, Hantke K (1992) Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: Similarities with the other TonB-dependent systems in Gram-negative bacteria. *EMBO J* 11:4359–4367
- Stojiljkovic I, Hantke K (1994) Transport of haemin across the cytoplasmic membrane through a haemin-specific periplasmic binding-protein-dependent transport system in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 13:719–732
- Stojiljkovic I, Bäuml AJ, Hantke K (1994) Fur regulon in Gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur Titration Assay. *J Mol Biol* 236:531–545
- Struyve M, Moons M, Tommassen J (1991) Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol* 218:141–148
- Tabor S, Richardson CC (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase-promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:1074–1078
- Torres AG, Payne SM (1997) Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 23:825–833
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1:945–951
- Wang RF, Kushner SR (1991) Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing, and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 100:195–199
- Wyckoff EE, Schmitt M, Wilks A, Payne SM (2004) HutZ is required for efficient heme utilization in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 186:4142–4151

Subtractive hybridization reveals a high genetic diversity in the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence of a SXT-like element

Sandra Juárez-Río,^{1,2} Carlos R. Osorio,¹ Víctor de Lorenzo²
and Manuel L. Lemos¹

Correspondence
Manuel L. Lemos
mlemos@usc.es

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

²Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* is the causative agent of fish pasteurellosis, a severe disease affecting cultured marine fish worldwide. In this study, suppression subtractive hybridization was used to identify DNA fragments present in the virulent strain PC554.2, but absent in the avirulent strain EPOY 8803-II. Twenty-one genomic regions of this type (that included twenty-six distinct putative ORFs) were analysed by DNA sequencing. Twenty ORFs encoded proteins with homology to proteins in other bacteria, including four homologues involved in siderophore biosynthesis, and four homologues related to mobile elements; three of these were putative transposases and one was a putative conjugative transposon related to the *Vibrio cholerae* SXT element. This sequence was shown to be integrated into a *prfC* gene homologue. Six ORFs showed no significant homology to known bacterial proteins. Among the 21 DNA fragments specific to strain PC554.2, 5 DNA fragments (representing 7 ORFs) were also absent in the avirulent strain ATCC 29690. The analysis of these differential regions, as well as the screening of their presence in a collection of strains, demonstrated the high genetic heterogeneity of this pathogen.

Received 13 January 2005
Revised 30 March 2005
Accepted 19 May 2005

INTRODUCTION

The marine Gram-negative bacterium *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is the causative agent of fish pasteurellosis or pseudotuberculosis in warm water marine fish (Magariños *et al.*, 1996a). This disease, which was first described in wild populations of white perch (*Morone americanus*) (Snieszko *et al.*, 1964) and striped bass (*Morone saxatilis*) (Janssen & Surgalla, 1968), has affected wild and cultured marine fish in the USA and Japan (Kitao, 1993), and since 1990 in various European countries (Magariños *et al.*, 1996a). The pathogenesis of *P. damsela* subsp. *piscicida* in fish is a multifactor process not yet fully understood. It is believed that the main virulence factors of this micro-organism consist of polysaccharide capsular material (Magariños *et al.*, 1996b), and a high affinity

siderophore-mediated iron-sequestering system (Magariños *et al.*, 1994). Extracellular products, including a variety of enzymes, as well as adherence and invasive capacities, are also believed to play a role in virulence (reviewed by Romalde, 2002). However, as a whole, little is known about the molecular biology of this micro-organism or the molecular basis of the putative virulence factors. Although attempts to assess the genetic variability within *P. damsela* subsp. *piscicida* strains have been conducted using DNA fingerprinting techniques such as ribotyping (Magariños *et al.*, 1997) and RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis (Magariños *et al.*, 2000), most of these techniques proved to be of limited value in discriminating between strains. The limited amount of sequence data available, together with the finding that no serotypes can be differentiated within this pathogen, led to the consideration that the species was homogeneous (Magariños *et al.*, 1996a).

Differences in virulence between isolates of the same bacterial species are related to differences in gene content and/or gene expression (Akopyants *et al.*, 1998). Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic strains can provide useful information on genes that are

Abbreviations: RDA, representational difference analysis; SSH, suppression subtractive hybridization.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences reported in this paper are AJ749789–AJ749795, AJ749797–AJ749804, AJ749806–AJ749809, AJ749812, AJ870983–AJ870986 and AJ888462–AJ888463.

specific for highly virulent isolates. Some of these differentially occurring genes may determine strain-specific characteristics such as virulence factors (Tinsley & Nassif, 1996; Groisman & Ochman, 1997; Reckseidler *et al.*, 2001), which can be used as a valuable tool to establish the nature and severity of disease.

Representational difference analysis (RDA) (Lisitsyn, 1995; Tinsley & Nassif, 1996), which is based on suppression subtractive hybridization (SSH) (Akopyants *et al.*, 1998; Diatchenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996), is a powerful technique for analysing the differences between two complex genomes, and for identifying DNA sequences that are present in one strain (the tester), but absent in another strain (the driver). This technique has been used in different bacterial species to identify genomic differences between virulent and avirulent strains (Calia *et al.*, 1998; Mahairas *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2000). Since pathogenesis is a multifactor process, SSH analysis can be useful for revealing genes that otherwise would not be detected by a genetic screen of random mutants. This is particularly advantageous for genetic studies with *P. damsela* subsp. *piscicida*, in which previous attempts to use transposon-based mutagenesis in our laboratory were unsuccessful. Furthermore, comparison of two complete genomes can give us a more complete genetic picture of the pathogen than other techniques.

Thus, our goal was to carry out a screen for *P. damsela* subsp. *piscicida* genes that are differentially present in a collection of virulent and avirulent strains. Implementing the SSH methodology, we have investigated genetic differences between two strains selected on the basis of their LD₅₀. The analysis of tester specific regions, as well as their screening in other virulent and avirulent strains, demonstrated the high genetic heterogeneity of this pathogen. Evidence in the tester strain of a conjugative transposon related to *Vibrio cholerae* SXT element is also described.

METHODS

Bacterial strains, media and DNA extraction. Strains used in this study are listed in Table 1. *P. damsela* subsp. *piscicida* strains were routinely grown at 25 °C in Tryptic Soy Agar (Difco) supplemented with 1% NaCl (TSA-1). *Escherichia coli* strains were routinely grown at 37 °C in Luria broth (LB). When necessary, media were supplemented with ampicillin (100 µg ml⁻¹). All strains were stored frozen at -80 °C in LB broth with 20% (v/v) glycerol. Total genomic DNA from *P. damsela* strains was prepared as described by Ausubel *et al.* (1995). Plasmid DNA was purified and DNA was extracted from agarose gels using kits from Qiagen.

Suppression subtractive hybridization. Bacterial genome subtraction was performed following the user manual of the PCR-Select Bacterial Genome Subtraction Kit (Clontech). Briefly, tester strain (PC554.2) and driver strain (EPOY 8803-II) genomic DNA (2 µg) were each digested with 10 units *Rsa*I for 5 h. The tester DNA was then aliquoted into two tubes, and the DNA in each aliquot was ligated to a different adaptor provided with the kit (tester 1-1 and 2-1). Two hybridizations were carried out; in the first hybridization, an excess of driver was added to each adaptor-ligated tester sample,

and samples were then heat denatured and allowed to anneal. In the second hybridization, the two samples from the first hybridization were mixed together, but without denaturation. The product of this last hybridization was then used as a template in a PCR reaction to amplify the tester-specific sequences, using Advantage cDNA polymerase mix (Clontech) and an iCycler thermal cycler (Bio-Rad). The PCR products were cloned using a pGEM-T Easy TA cloning kit (Promega) and transformed into *E. coli* DH5α. Recombinant clones were screened by restriction analysis to allow duplicated clones to be discarded before proceeding to DNA sequencing.

DNA sequencing. DNA sequences were determined by the dideoxy chain terminator method on plasmid products, using an Applied Biosystems Prism 3700 automated DNA sequencer and the dye termination method. The sequences were edited with BioEdit analysis software. The European Bioinformatics Institute EMBL database was screened with the FASTA3 and BLAST algorithms.

DNA hybridization and PCR. For DNA hybridization, DNA inserts from some of the subtracted clones were used as probes to screen the genomic DNA of a collection of *P. damsela* subsp. *piscicida* strains. For dot-blot hybridization, chromosomal DNA samples were diluted in a final volume of 50 µl in TE buffer so that each sample contained approximately 2 µg DNA. Diluted samples were boiled for 5 min to denature dsDNA and immediately transferred on a nylon membrane (Boehringer Mannheim) previously activated with 2 × SSC, using a Minifold II apparatus (Schleicher & Schuell). The transferred DNA was fixed to the membrane by exposure to UV light for 2 min in a ultraviolet cross-linker (Amersham). DNA probe labelling and hybridization were carried out using the ECL DNA labelling and detection system (Amersham), following the manufacturer's instructions.

Suitable oligonucleotides that flanked DNA inserts of clones pRDA5, 19, 23, 25 and 31 were designed and used in a PCR-based screening of a collection of *P. damsela* subsp. *piscicida* strains. When a PCR product of the expected size was amplified, the result was scored as positive for the presence of that gene.

To assess the *attP* attachment site of the putative SXT-like element into a chromosomal attachment site, *attB*, genomic DNA of strain PC554.2 was cut with *Bam*HI and ligated with pUC118 plasmid that had been similarly digested. The ligation reactions were used as the DNA template in PCR reactions with M13fw primer (targeted to the pUC118 polylinker) and either primer P4 or P5, which are targeted to the left (*attL*) and right (*attR*) junctions of the putative SXT-like element, respectively (Hochhut & Waldor, 1999). The resulting PCR products were cloned into pGEM-T Easy (Promega) and sequenced. This strategy allows the amplification of DNA regions in the vicinity of the insertion site of an SXT-like element.

Nucleotide sequence accession numbers. The DNA sequences described in this article have been assigned the EMBL accession numbers listed in Tables 2 and 3.

RESULTS AND DISCUSSION

In the last few years, several strategies have been developed for the identification of bacterial genes essential for infection, such as the use of *in vivo* expression technology (Mahan *et al.*, 1993), signature-tagged transposon mutagenesis (Shea *et al.*, 1996) and microarray DNA chips (de Saizieu *et al.*, 1998). In this study, we used SSH to identify genetic differences between two *P. damsela* subsp. *piscicida* strains, one highly pathogenic and the other innocuous, and isolated twenty-one distinct types of clone that were tester

specific. These results provide a more complete picture of the genetic background of *P. damselae* subsp. *piscicida*, whose genome has not yet been sequenced.

Genomic subtraction between *P. damselae* subsp. *piscicida* PC554.2 and EPOY 8803-II

For the SSH procedure we used as the tester the highly virulent strain PC554.2 isolated from sole (*Solea senegalensis*) (Magariños *et al.*, 2003), and as the driver the strain EPOY 8803-II, isolated from *Epinephelus akaara* (Magariños *et al.*, 1992), which displays a much lower degree of virulence. The sizes of subtracted fragments were between 0.7 and 2 kb. Ninety-eight clones were obtained after two rounds of hybridization. Ten clones were found to have no inserts, and sixty-four duplicated clones were discarded on

the basis of their restriction pattern. The remaining 23 clones were examined by dot-blot hybridization analysis to check the specificity of the technique. In addition to the tester and driver strains, one virulent (DI21) and one avirulent strain (ATCC 29690) were included in the dot-blot screening. Only 2 clones proved to be false positives (pRDA15 and pRDA36), while the other 21 hybridized with the tester genome but not with the driver genome (Fig. 1). Four clones were present only in the two virulent strains, whereas sixteen clones were found in the two virulent strains plus in the avirulent strain ATCC 29690. One clone (pRDA5) was specific to the tester strain PC554.2 (Fig. 1).

The selected 21 subtracted fragments were sequenced and a homology search was carried out (Table 2). A total of 26

Table 1. Bacterial strains

Strain	Relevant characteristic*	Source
<i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i>		
DI21	Highly virulent	Seabream, Spain
B52	Highly virulent	Seabass, Spain
IT-2	Highly virulent	Seabream, Italy
1083 1	Highly virulent	<i>Dicentrarchus labrax</i> , France
PC554.2	Highly virulent	Sole, Spain
PC435-1	Highly virulent	Sole, Spain
MP7801	Highly virulent	Yellowtail, Japan
MZS-8001	Highly virulent	Yellowtail, Japan
ATCC 17911	Moderately virulent	White perch, USA
EPOY-8803-II	Avirulent	Red grouper, Japan
ATCC 29690	Avirulent	Yellowtail, Japan
666-1	ND	Seabass, Portugal
069A	ND	Seabream, Greece
ATLIT 2	ND	<i>Morone</i> sp., Israel
2101	ND	<i>Morone</i> sp., Israel
C1	ND	Seabream, Spain
P3333	ND	Yellowtail, Japan
Lgh 41/01	ND	Sole, Spain
Lgr 52/02	ND	Sole, Spain
Pp.5	ND	Sole, Spain
TW 515/02	ND	Sole, Spain
EW 194/97	ND	Sole, Spain
188/98	ND	<i>Dicentrarchus labrax</i> , Portugal
Nu no	ND	<i>Dicentrarchus labrax</i> , Portugal
PC610-1	ND	Seabream, Spain
R.46	ND	Seabream, Spain
PC267-1	ND	Seabream, Spain
91-197	ND	<i>Morone</i> sp., USA
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 lacU169</i> (ϕ 80dlacZ Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96</i> <i>thi-1 relA1</i>	Laboratory stock

ND, LD₅₀ not determined.

*Virulence data for fish obtained from Magariños *et al.*, 1992. Highly virulent, LD₅₀ 10²–10⁴; moderately virulent, LD₅₀ 10⁵–10⁶; avirulent, LD₅₀ > 10⁸.

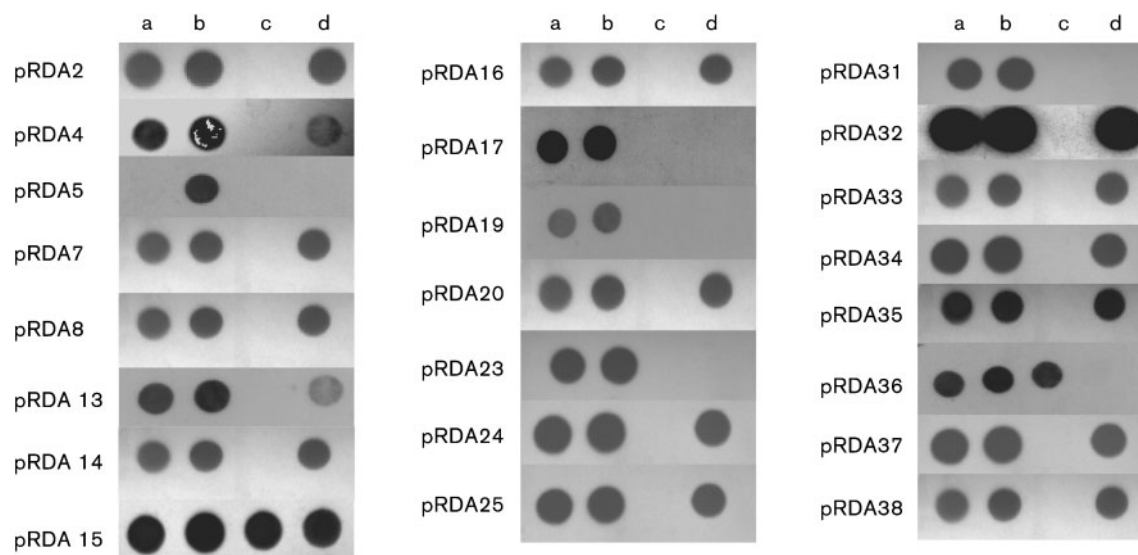


Fig. 1. Dot-blots of subtracted fragments of chromosomal DNA from *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 (a), PC554.2 (tester strain) (b), EPOY 8803-II (driver strain) (c) and ATCC 29690 (d). The DNA subtracted fragments used as labelled probes are indicated on the left of the panels.

distinct putative ORFs (either partial or complete) were inferred, among which 6 (clones pRDA13, pRDA14, pRDA17, pRDA24, pRDA32 and pRDA37) showed no significant matches with entries in the databases. These proteins are thus referred to as putative *P. damsela* subsp. *piscicida* proteins. To date, more than 100 bacterial genomes, including those of several important pathogens, have been sequenced, revealing that around 25% of the ORFs are hypothetical genes without known function (Fraser, 2000).

The remaining 20 predicted ORFs showed homology to proteins described in other bacterial species. Clones into this category were divided into two subgroups. In subgroup A we included the ORFs that were found to correspond to putative insertion sequences elements of *P. damsela* subsp. *piscicida*, and in subgroup B we included the remaining RDA clones.

Presence of transposase genes in *P. damsela* subsp. *piscicida*

SSH has been successfully used to detect the differential presence of insertion sequences in other bacteria (Lai *et al.*, 2000; Sawada *et al.*, 1999; DeShazer, 2004). The putative insertion sequences detected in *P. damsela* subsp. *piscicida* included three different transposases, with homology to *Vibrio vulnificus* putative transposases A and B, and to a *Shigella flexneri* transposase (Table 2). Several clones contained a homologue of the *V. vulnificus* transposase A. It is noteworthy that the DNA sequence flanking the transposase gene was different in each clone, indicating that this gene occurs in a multicopy fashion in the genome of the tester strain. A single clone (pRDA16) contained a homologue of

the *V. vulnificus* transposase B. Interestingly, when this transposase B gene was used as a probe in a Southern blot of chromosomal DNA cut with *Bgl*II and *Pst*I, it was also shown to occur in a multicopy fashion (about 15–20 copies) in the tester strain, as well as in three additional *P. damsela* strains, while it proved to be absent in the driver strain (Fig. 2). The occurrence of multiple copies of a sequence in a genome seems to be a feature typical of small insertion sequences (Schneider & Blot, 2003). In addition, clone pRDA37 contained an ORF with homology to a *S. flexneri* transposase found in the virulence plasmid pCP301 (Jin *et al.*, 2002).

These putative transposase genes are believed to be the first identified in *P. damsela* subsp. *piscicida* to date. In all cases, the putative transposase genes were inserted so that they interrupted ORFs. The identification of transposase elements or markers specific to individual strains or clones, has been shown to be an important starting point in the identification of genomic islands implicated in virulence (Winstanley, 2002). It has been reported that the typing of closely related strains of the same species can be accomplished by studying the variation in mobile genetic elements (Lawrence *et al.*, 1989). The presence of transposases and their distribution along the genome could be an adequate method for typing *P. damsela* subsp. *piscicida* strains, in which other typing methods proved to be of limited value (Magariños *et al.*, 1997; 2000).

Identification of SXT-like element DNA sequences in the tester strain

Within the subgroup A clones we also included clone pRDA5, which contained a partial ORF with high similarity

Table 2. Summary of the sequence analysis of clones inserts specific for *P. damsela* subsp. *piscicida* pathogenic strain PC554.2, and absent from avirulent strain EPOY 8803-II

Fragment no.	ORF size (bp)	Predicted protein (aa)	Accession no.	Homology	Amino acid identity (%)	Amino acid similarity (%)	Homologue accession no.
pRDA2	192	222	AJ749789	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> arginine ABC transporter permease protein	73	89	Q87IG7
pRDA4	258	91	AJ749790	<i>V. vulnificus</i> putative transposase A	70	80	Q7MP06
	330	419		<i>P. profundum</i> putative ATP-dependent RNA helicase SrmB	83	92	CAG18985
pRDA5	216	259	AJ749791	<i>P. profundum</i> hypothetical protein	77	87	CAG18984
	219	195		<i>P. rettgeri</i> hypothetical protein and <i>V. cholerae</i> SXT-related gene	93	95	Q8RL11
pRDA7	540	759	AJ749792	<i>Helicobacter pylori</i> ATP-binding cassette	42	61	Q9ZK71
pRDA8	246	419	AJ749793	<i>P. profundum</i> hypothetical phosphoglycerate-transport regulatory protein PgtC	48	74	CAG21141
pRDA13	258	91	AJ749794	<i>V. vulnificus</i> putative transposase A	70	80	Q7MP06
	156	91		No database matches	—	—	—
pRDA14	258	91	AJ749795	<i>V. vulnificus</i> putative transposase A	70	80	Q7MP06
	459	141		No database matches	—	—	—
pRDA16	423	141	AJ749797	<i>V. vulnificus</i> putative transposase B	76	87	Q7MP05
pRDA17	588		AJ749798	No database matches	—	—	—
pRDA19	246	203	AJ749800	<i>Pseudomonas stutzeri</i> cytochrome C oxidase monoheme subunit	57	72	Q8KS21
pRDA20	303	488	AJ749801	<i>Vibrio marinus</i> cytochrome C oxidase	41	65	Q9RA08
	258	91		<i>V. vulnificus</i> putative transposase A	70	80	Q7MP06
pRDA23	717	241	AJ749802	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> putative AraC-family transcriptional activator	100	100	Q6ZXE4
pRDA24	504	277	AJ749803	<i>V. anguillarum</i> putative DHAP synthase	48	67	Q83XJ7
	579			No database matches	—	—	—
pRDA25	528	617	AJ749804	<i>P. profundum</i> putative protein-export membrane protein SecD	73	79	CAG19158
pRDA31	186	315	AJ749799	<i>P. profundum</i> putative translocase subunit SecF	67	78	CAG19159
	621	230		<i>V. anguillarum</i> phosphopantetheinyl transferase	34	58	Q83XK1
pRDA32	516		AJ749808	No database matches	—	—	—
pRDA33	258	91	AJ749809	<i>V. vulnificus</i> putative transposase A	70	80	Q7MP06
pRDA34	198	186	AJ749806	<i>Y. pestis</i> putative chorismate mutase	75	83	Q8ZGE8
	240	186		<i>Photorhabdus luminescens</i> chorismate mutase	37	55	Q7MB89
pRDA35	414	248	AJ749807	<i>P. profundum</i> conserved hypothetical protein	33	66	CAG20188
pRDA37	129	402	AJ749812	<i>S. flexneri</i> transposase	35	55	Q8VSM0
pRDA38	372		AJ749800	No database matches	—	—	—
	102	509		<i>V. cholerae</i> N-acetylglucosamine-specific transporter II	87	90	O32444

to an uncharacterized protein included within the SXT element of *V. cholerae*. The identity at the nucleotide sequence level between pRDA5 and this *V. cholerae* homologue was as high as 94 %. This element is a representative of a family of conjugative transposon-like mobile genetic elements that encode multiple antibiotic-resistance genes (Beaber *et al.*, 2002). That ORF also showed homology to a hypothetical protein of *Providencia rettgeri* found in the conjugative element R391 (Böltner *et al.*, 2002). R391 and its relatives carry specific phenotypes that are also found in genomic

islands (including symbiosis and pathogenicity islands). Both R391 and the SXT element share functional and structural similarities to genomic islands, conjugative transposons and bacteriophages.

To further test the hypothesis that a SXT-like conjugative element exists in the genome of the tester strain, PCR amplification and sequence analysis were employed to help identify DNA sequences that are well-conserved among SXT-like elements described in several species. These

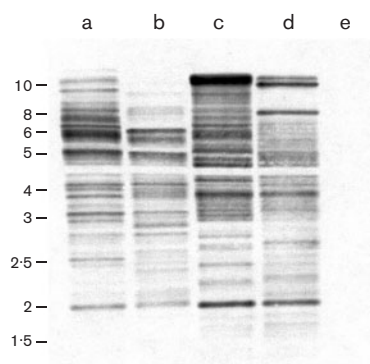


Fig. 2. Southern blot of chromosomal DNA doubly digested with *Bgl*II and *Pst*I, hybridized with the transposase B gene from clone pRDA16. Lanes indicate *P. damsela* subsp. *piscicida* strains: (a) PC554.2 (tester), (b) DI21, (c) ATCC 29690, (d) B52, (e) EPOY 8803-II (driver). Molecular sizes (kb) are denoted on the left.

elements share a conserved 'backbone' that includes an integrase gene and other genes related to excision and integration, conjugative transfer and regulation (Beaber *et al.*, 2002). A recent study described how primer pairs targeted to conserved DNA stretches can be useful for detecting DNA sequences of SXT-like elements in γ -proteobacteria (Böltner and Osborn, 2004).

We selected five primer pairs (Table 3) targeted to genes encoding an integrase (*int*), a relaxase (*traI*), a putative pilus assembly protein (*traC*) and a putative pilus assembly and synthesis protein (*traN*). These primers proved to be effective for amplifying the sequences of *V. cholerae* SXT, *P.*

rettingeri R391, *Proteus mirabilis* R997 and *Shewanella putrefaciens* pMERPH elements (Böltner and Osborn, 2004). The PCR amplifications yielded products of the size expected based on the DNA sequence of the *P. rettingeri* conjugative element R391 (Böltner *et al.*, 2002) (Fig. 3a). DNA sequencing of the five amplicons in the tester strain demonstrated that SXT-like sequences exist in the genome of *P. damsela* PC554.2, and showed a high percentage of sequence identity to homologous sequences described in SXT-like elements (Table 3). The same primers were employed with DNA of strains EPOY 8803-II, ATCC29690 and DI21, but no amplification was obtained (data not shown), which is in accordance with the dot-blot hybridization results with pRDA5, and suggests that the SXT-like sequences are exclusive to strain PC554.2. When we carried out hybridization experiments with 29 strains of *P. damsela* subsp. *piscicida* using pRDA5 insert DNA as a probe, we found that it is present uniquely in the tester strain PC554.2 (Table 4).

Chromosomal integration of SXT-like conjugative transposons occurs via site-specific recombination between a 17 bp sequence found in the SXT element and a similar 17 bp sequence in the *prfC* gene that encodes the peptide chain release factor 3 (Hochhut & Waldor, 1999; McGrath & Pembroke, 2004). Recombination between the chromosomal *attB* and the SXT *attP* generates the left and right junctions *attL* and *attR*, respectively. The integration site in the chromosome of strain PC554.2 was assessed using primers targeted to the left and right junctions of this element within the bacterial chromosome (Hochhut & Waldor, 1999; Ahmed *et al.*, 2005). PCR products were obtained that included the *attL* and *attR* junctions as well as neighbour chromosomal DNA. Sequencing of the

Table 3. PCR amplification of SXT-like sequences in the *P. damsela* subsp. *piscicida* tester strain PC554.2, and nucleotide sequence comparison to homologous sequences in SXT-like conjugative and integrative elements in other γ -proteobacteria

Primer combination*	PCR product†			Function	Percentage nucleotide similarity				EMBL accession no.
	Expected size (bp)	R391 position			SXT	R997	R391	pMERPH	
		Start	Stop						
284/285	1427	2701	4128	Integrase (<i>int</i>)	99.5	99.9	96.3	96.6	AJ870983
286/287	1034	2884	3918						
243/244	1008	32821	33829	Putative relaxase (<i>traI</i>)	92.1	NA	93.5	NA	AJ870984
227/119	553	51997	52550	Putative pilus assembly protein (<i>traC</i>)	98.7	NA	97.8	NA	AJ870985
121/223	1044	56531	57575	Putative pilus assembly and synthesis protein (<i>traN</i>)	95.1	NA	96.2	NA	AJ870986
P4/M13fw‡	—	—	—	<i>attL</i> junction	99.6	98.4	95.0	98.4	AJ888462
P5/M13fw‡	—	—	—	<i>attR</i> junction	98.8	98.8	99.4	98.8	AJ888463

NA, Not available.

*Primer annotation is as described by Böltner & Osborn (2004).

†Expected PCR product size and priming sites annotation were calculated on the basis of the complete sequence of the SXT-like R391 conjugative element of *P. rettingeri* (EMBL accession no. AY090559).

‡Primers P4 and P5 as described by Hochhut & Waldor (1999); primer M13fw is a universal primer targeted to pUC118 plasmid region flanking the polylinker.

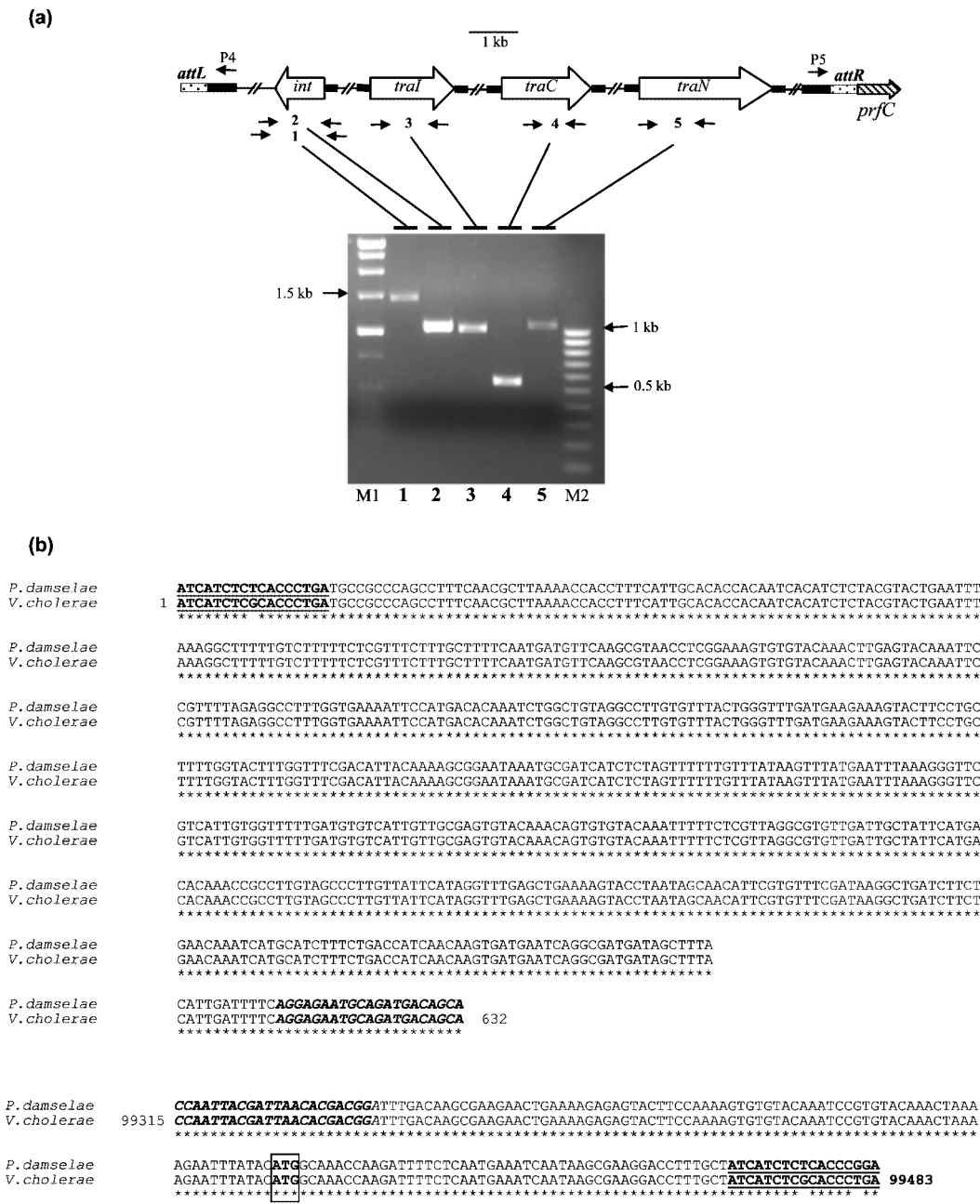


Fig. 3. (a) Amplification of genes of the putative SXT-like conjugative element in *P. damsela* subsp. *piscicida* strain PC554.2. A scheme of the amplified genes is shown above the agarose gel of the PCR products generated with the primers listed in Table 3. Open white arrows denote ORFs of the *P. rettgeri* R391 conjugative transposon, and small black arrows represent the relative location of primers. *attL* and *attR* denote the putative left and right junctions of the SXT-like element in the bacterial chromosome, respectively. The *prfC* gene is denoted as a hatched arrow located downstream of the *attR* junction. Lanes M1 and M2 contain 1 kb and 100 bp molecular size markers, respectively. The lanes and the predicted product sizes are as follows: lane 1, complete *int* gene and flanking bases (1427 bp); lane 2, *int* gene internal (1034 bp); lane 3 *tral* gene internal (1008 bp); lane 4, *traC* gene internal (553 bp); lane 5 *traN* gene internal (1044 bp). (b) Nucleotide sequence alignment of *P. damsela* subsp. *piscicida* PC554.2 and *V. cholerae* O139 chromosomes at the left (top) and right (bottom) SXT-like chromosome junctions. The 17 bp duplication resulting from integration of the SXT-like element, and which constitutes the core of *att* sites, is shown in bold and underlined. The nucleotide sequences of primers P4 and P5 are shown in bold and italics. The alternative ATG start codon of the 5' terminus of *prfC* gene, replacing the chromosomal 5' end and restoring a functional *prfC* gene upon chromosomal integration, is shown in bold and boxed. Numbers indicate positions in the SXT sequence of *V. cholerae* (accession no. AY055428).

Table 4. Distribution of tester-specific DNA fragments among virulent and avirulent strains of *P. damsela* subsp. *piscicida*

Results were obtained by dot-blot hybridization and PCR.

Strain	pRDA5	pRDA31	pRDA19	pRDA23	pRDA25
Highly virulent strains					
DI21	—	+	+	+	+
B52	—	+	+	+	+
MZS 8001	—	—	—	—	+
MP7801	—	+	—	+	+
1083 1	—	—	+	—	—
IT-2	—	—	+	—	+
PC554.2	+	+	+	+	+
PC435-1	—	+	+	+	+
Moderately virulent strains					
ATCC 17911	—	—	—	—	+
Avirulent strains					
EPOY 8803-II	—	—	—	—	—
ATCC 29690	—	—	—	—	+
Fish isolates (virulence not determined)					
ATLIT 2	—	+	—	+	—
2101	—	+	—	+	—
C1	—	+	+	+	—
P3333	—	—	—	—	—
666.1	—	+	+	+	—
069A	—	+	+	+	+
Lgh 41/01	—	+	+	+	—
Lgr 52/02	—	—	+	+	—
Pp.5	—	—	—	—	—
TW 515/02	—	+	—	+	—
EW 194/97	—	—	—	+	—
188/98	—	+	—	+	—
Nu no	—	+	+	+	—
PC610.1	—	+	+	+	+
R.46	—	—	+	—	—
PC267.1	—	+	+	+	—
91.197	—	+	—	+	—

amplicons revealed nucleotide sequences highly similar to those described for the *attL* and *attR* sites of *V. cholerae* SXT element and related conjugative transposons (Table 3), and also demonstrated that these sequences are inserted within a *prfC* homologue in strain PC554.2 (Fig. 3b). The SXT-like sequence disrupted *prfC*, but encoded a novel 5' sequence that presumably restores the function of the gene (Fig. 3b). A 17 bp region conforming the putative *att* core sequence was also encountered at the *attP* site (Fig. 3b). These results demonstrate that sequences nearly identical to the *attL* and *attR* sites of the *attP* attachment site of the *V. cholerae* SXT element are present in the chromosome of *P. damsela* subsp. *piscicida* PC554.2, and that the *attR* junction reconstitutes a complete copy of the *prfC* gene.

Altogether, these results strongly suggest that a SXT-like integrative and conjugative element is present in the genome of *P. damsela* subsp. *piscicida* PC554.2. To date, SXT-like

elements have been described in as few as six bacterial species (McGrath & Pembroke., 2004; Ahmed *et al.*, 2005). The high similarity between the SXT-related sequences analysed in our study and those reported previously supports the hypothesis that these types of elements share a common ancestral origin (Beaber *et al.*, 2002; Böltner and Osborn, 2004). The fact that these sequences were found in only one recently isolated strain (Magariños *et al.*, 2003), as well as their high homology to *V. cholerae* SXT sequences, suggests that a possible recent horizontal transfer of these sequences has occurred.

Clones containing ORFs homologous to those in other bacteria

The subgroup B comprises the remaining RDA clones that are summarized in Table 2. Among them, clones were isolated that contained ORFs encoding proteins implicated in

the transport of molecules across the bacterial membrane (pRDA2, pRDA7, pRDA8 and pRDA38), as well as putative proteins involved in protein secretion.

Clones pRDA23, pRDA31, pRDA33 and pRDA34 contained putative members of iron-sequestering systems based on siderophore production. An ORF in pRDA31 showed homology to the *vibD* gene, required for late steps of vibriobactin biosynthesis in pathogenic strains of *V. cholerae* (Wyckoff *et al.*, 2001). Similarly, pRDA33 and pRDA34 harboured ORFs with homology to two different putative chorismate mutases, enzymes also involved in the synthesis of siderophores. Clones pRDA31 and pRDA23 contained homologues of genes described as part of the virulence plasmid pJM1 of *Vibrio anguillarum* (Di Lorenzo *et al.*, 2003) that encodes an iron-sequestering system. Homologues include a phosphopantetheinyl transferase (clone pRDA31), an enzyme that could be involved in the synthesis of the siderophore anguibactin, and a putative DAHP (3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate) synthase in clone pRDA23. This clone also contained an ORF with homology to a putative member of the AraC family of transcriptional activators. Members of this family act as positive regulators of genes encoding siderophore receptors and for enzymes involved in siderophore biosynthesis, as is the case of *Yersinia pestis* YbtA (Fetherston *et al.*, 1996). This ORF in clone pRDA23 has been previously isolated in *P. damsela* subsp. *piscicida* strain DI21, as part of a gene cluster that included a putative ferrisiderophore receptor and additional iron-regulated genes (Osorio *et al.*, 2004).

Clone pRDA25 includes two ORFs homologous to the SecD and SecF proteins of the *E. coli* Sec locus, which comprises nine genes involved in protein translocation across the membrane (Manting & Driessen, 2000). It has been suggested that SecD and SecF proteins form a complex in the inner membrane that functions at the late steps of protein export (Economou *et al.*, 1995). The presence of this protein export system could be related to virulence in *P. damsela* subsp. *piscicida* isolates, since extracellular proteins considered as potential virulence factors need to be translocated across the bacterial envelope through a protein export system.

An ORF with homology to a SrmB helicase of *Photobacterium profundum* has also been isolated (clone pRDA4). It is not clear whether the differential presence of helicase genes can be related to virulence. Curiously, using SSH, two different helicase genes were reported to be present in a pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* isolate and absent in the driver avirulent strain (Choi *et al.*, 2002).

Occurrence of the isolated sequences in a collection of *P. damsela* subsp. *piscicida* strains

We focused our attention on clones pRDA19, pRDA23 and pRDA31, representative ORFs present in the two pathogenic

strains PC554.2 and DI21, but absent in the two non-pathogenic strains EPOY 8803-II and ATCC29690. We also included clone pRDA5 since it was present uniquely in the tester strain, and clone pRDA25 containing homologues to genes involved in protein translocation across the membrane in *E. coli* (Table 2). In order to survey the distribution of these DNA fragments, dot-blot hybridization was carried out with 9 virulent and 2 avirulent strains of *P. damsela* subsp. *piscicida*, as well as with 17 additional strains isolated from diseased fish but whose LD₅₀ had not been determined. Results showed that a high degree of genetic heterogeneity exists in *P. damsela* subsp. *piscicida* isolates at the assayed DNA regions (Table 4). The same results were obtained when oligonucleotides specific for each of pRDA5, pRDA19, pRDA23, pRDA25 and pRDA31 inserts were used in a PCR-based screening (Table 4).

The dot-blot hybridization and PCR revealed a possible relationship between the presence of genes encoding elements of high affinity iron-transport systems and virulence. According to these experiments, they were absent in the two non-pathogenic isolates tested (Table 4), although they showed variable occurrence among other pathogenic isolates. Strains of *P. damsela* subsp. *piscicida* produce siderophores under iron-limiting conditions (Magariños *et al.*, 1994), but little is known about the genetic basis of these iron-sequestering systems. The genes isolated in this study will help to provide a deeper insight into the iron-acquisition mechanisms of this fish pathogen.

Clone pRDA19 contained two partial ORFs with homology to two distinct, chromosomally linked cytochrome C oxidases. These ORFs also showed a differential occurrence among *P. damsela* subsp. *piscicida* isolates, being absent not only in the two avirulent strains but also in several virulent ones (Table 4).

The results obtained from the distribution of some of the genes isolated in the present study, in 28 virulent and avirulent strains of *P. damsela* subsp. *piscicida*, strongly suggest that the population of this fish pathogen is highly heterogeneous. None of the strains tested, other than PC554.2, harboured all the sequences described here, and none of the sequences were present in all the virulent isolates tested. This heterogeneity is also very evident among strains isolated from the same host and from the same geographical origin. As an example, each of the seven strains isolated from sole in Spain (Table 1) yielded a completely different gene content profile in the Southern blot and PCR screening, summarized in Table 4, data that clearly indicate the high genetic heterogeneity of the populations of this fish pathogen. We propose that some of the DNA sequences described in this study could serve as genetic markers for epidemiological typing of *P. damsela* subsp. *piscicida* strains.

Conclusion

Our results demonstrate that SSH is a successful technique for identifying genetic differences between virulent and

avirulent *P. damsela* subsp. *piscicida* isolates. This is expected to provide insights into the virulence mechanisms of this fish pathogen. Although from the results described here a direct relationship between a particular sequence and virulence cannot be inferred (only two strains clearly considered as avirulent are available), the distribution of a particular gene in a bacterial population can provide clues on its implication in virulence, and clearly some of the sequences described here could be involved in the virulence of *P. damsela* subsp. *piscicida*. Isolation of genes related to iron-acquisition mechanisms as part of the subtracted sequences suggests a likely role of these systems in virulence, as has been demonstrated in other bacteria. In addition, the presence of several genes related to mobile elements among the subtracted fragments points to the presence of pathogenicity islands in *P. damsela* subsp. *piscicida*. Studies on this possibility are currently under way.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grant AGL2003-00086 from the Ministry of Science and Technology of Spain, and grant PGIDIT04PXIC23501PN from Xunta de Galicia to M.L.L. S.J.R. also thanks the Spanish Ministry of Science and Technology for a predoctoral fellowship.

REFERENCES

- Ahmed, A. M., Shinoda, S. & Shimamoto, T. (2005). A variant type of *Vibrio cholerae* SXT element in a multidrug-resistant strain of *Vibrio fluvialis*. *FEMS Microbiol Lett* **242**, 241–247.
- Akopyants, N. S., Fradkov, A., Diatchenko, L., Hill, J. E., Siebert, P. D., Lukyanov, S. A., Sverdlov, E. D. & Berg, D. E. (1998). PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13108–13113.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (editors) (1995). *Current Protocols in Molecular Microbiology*. New York: Wiley.
- Beaber, J. W., Hochhut, B. & Waldor, M. K. (2002). Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **184**, 4259–4269.
- Böltner, D. & Osborn, A. M. (2004). Structural comparison of the integrative and conjugative elements R391, pMERPH, R997, and SXT. *Plasmid* **51**, 12–23.
- Böltner, D., MacMahon, C., Pembroke, J. T., Strike, P. & Osborn, A. M. (2002). R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements. *J Bacteriol* **184**, 5158–5169.
- Calia, K. E., Waldor, M. K. & Calderwood, S. B. (1998). Use of representational difference analysis to identify genomic differences between pathogenic strains of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **66**, 849–852.
- Choi, J. Y., Sifri, C. D., Goumnerov, B. C., Rahme, L. G., Ausubel, F. M. & Calderwood, S. B. (2002). Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. *J Bacteriol* **184**, 952–961.
- de Saizieu, A., Certa, U., Warrington, J., Gray, C., Keck, W. & Mous, J. (1998). Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* **16**, 45–48.
- DeShazer, D. (2004). Genomic diversity of *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates: subtractive hybridization reveals a *Burkholderia mallei*-specific prophage in *B. pseudomallei* 1026b. *J Bacteriol* **186**, 3938–3950.
- Di Lorenzo, M., Stork, M., Tolmasky, M. E. & 9 other authors (2003). Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain 775. *J Bacteriol* **185**, 5822–5830.
- Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P. & 8 other authors (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6025–6030.
- Economou, A., Pogliano, J. A., Beckwith, J., Oliver, D. B. & Wickner, W. (1995). SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecE. *Cell* **83**, 1171–1181.
- Fetherston, J. D., Bearden, S. W. & Perry, R. D. (1996). YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. *Mol Microbiol* **22**, 315–325.
- Fraser, C. M. (2000). Microbial genome sequencing: new insights into physiology and evolution. *Novartis Found Symp* **229**, 54–58.
- Groisman, E. A. & Ochman, H. (1997). How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* **5**, 343–349.
- Gurskaya, N. G., Diatchenko, L., Chenchik, A. & 7 other authors (1996). Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* **240**, 90–97.
- Hochhut, B. & Waldor, M. K. (1999). Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. *Mol Microbiol* **32**, 99–110.
- Janssen, W. A. & Surgalla, M. J. (1968). Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch. (*Roccus americanus*). *J Bacteriol* **96**, 1606–1610.
- Jin, Q., Yuan, Z., Xu, J. & 30 other authors (2002). Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Res* **30**, 4432–4441.
- Kitao, T. (1993). Pasteurellosis. In *Bacterial Diseases of Fish*, pp. 159–165. Edited by V. Inglis, R. J. Roberts & N. R. Bromage. Oxford: Blackwell Science.
- Lai, Y. C., Yang, S. L., Peng, H. L. & Chang, H. Y. (2000). Identification of genes present specifically in a virulent strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* **68**, 7149–7151.
- Lawrence, J. G., Dykhuizen, D. E., DuBose, R. F. & Hartl, D. L. (1989). Phylogenetic analysis using insertion sequence fingerprinting in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **6**, 1–14.
- Lisitsyn, N. A. (1995). Representational difference analysis: finding the differences between genomes. *Trends Genet* **11**, 303–307.
- Magariños, B., Santos, Y., Romalde, J. L., Rivas, C., Barja, J. L. & Toranzo, A. E. (1992). Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *J Gen Microbiol* **138**, 2491–2498.
- Magariños, B., Romalde, J. L., Lemos, M. L., Barja, J. L. & Toranzo, A. E. (1994). Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2990–2998.

- Magariños, B., Toranzo, A. E. & Romalde, J. L. (1996a). Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annu Rev Fish Dis* 6, 41–46.
- Magariños, B., Bonet, R., Romalde, J. L., Martinez, M. J., Congregado, F. & Toranzo, A. E. (1996b). Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microb Pathog* 21, 289–297.
- Magariños, B., Osorio, C. R., Toranzo, A. E. & Romalde, J. L. (1997). Applicability of ribotyping for intraspecific classification and epidemiological studies of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Syst Appl Microbiol* 20, 634–639.
- Magariños, B., Toranzo, A. E., Barja, J. L. & Romalde, J. L. (2000). Existence of two geographically-linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* evidenced by random amplified polymorphic DNA analysis. *Epidemiol Infect* 125, 213–219.
- Magariños, B., Romalde, J. L., Lopez-Romalde, S., Moriñigo, M. A. & Toranzo, A. E. (2003). Pathobiological characterisation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bull Eur Ass Fish Pathol* 23, 183–190.
- Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C. & Stover, C. K. (1996). Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 178, 1274–1282.
- Mahan, M. J., Slauch, J. M. & Mekalanos, J. J. (1993). Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* 259, 686–688.
- Manting, E. H. & Driessen, A. J. (2000). *Escherichia coli* translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol Microbiol* 37, 226–238.
- McGrath, B. M. & Pembroke, J. T. (2004). Detailed analysis of the insertion site of the mobile elements R997, pMERPH, R392, R705 and R391 in *E. coli* K12. *FEMS Microbiol Lett* 237, 19–26.
- Osorio, C. R., Lemos, M. L. & Braun, V. (2004). Identification of Fur regulated genes in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* using the Fur titration assay. *Biometals* 17, 725–733.
- Reckseidler, S. L., DeShazer, D., Sokol, P. A. & Woods, D. E. (2001). Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant. *Infect Immun* 69, 34–44.
- Romalde, J. L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *Int Microbiol* 5, 3–9.
- Sawada, K., Koeguchi, S., Hongyo, H., Sawada, S., Miyamoto, M., Maeda, H., Nishimura, F., Takashiba, S. & Murayama, Y. (1999). Identification by subtractive hybridization of a novel insertion sequence specific for virulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 67, 5621–5625.
- Schneider, D. & Blot, M. (2003). Insertion sequences as genomic markers. In *Methods and Tools in Biosciences and Medicine. Prokaryotic Genomics*, pp. 22–33. Edited by M. Blot. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C. & Holden, D. W. (1996). Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2593–2597.
- Snieszko, S. F., Bullock, G. L., Hollis, E. & Boone, J. G. (1964). *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *J Bacteriol* 88, 1814–1815.
- Tinsley, C. R. & Nassif, X. (1996). Analysis of the genetic differences between *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: two closely related bacteria expressing two different pathogenicities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11109–11114.
- Winstanley, C. (2002). Spot the difference: applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens. *J Med Microbiol* 51, 459–467.
- Wyckoff, E. E., Smith, S. L. & Payne, S. M. (2001). VibD and VibH are required for late steps in vibriobactin biosynthesis in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 183, 1830–1834.
- Zhang, Y. L., Ong, C. T. & Leung, K. Y. (2000). Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiology* 146, 999–1009.



<http://mc.manuscriptcentral.com/fems>

The ABC-transporter *hutCD* genes of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* are essential for heme utilization as iron source and are expressed during infection in fish

Journal:	<i>FEMS Microbiology Letters</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Research Letter
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Sandra, Juiz Río; Universidad de Santiago de Compostela, Department of Microbiology and Parasitology Osorio, Carlos; Universidad de Santiago de Compostela, Department of Microbiology and Parasitology Lemos, Manuel; Universidad de Santiago de Compostela, Department of Microbiology and Parasitology
Keywords:	<i>Photobacterium damsela</i> , iron uptake, heme uptake, ABC transporter

powered by ScholarOne
Manuscript Central™

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The ABC-transporter *hutCD* genes of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* are essential for heme utilization as iron source and are expressed during infection in fish

Sandra Juíz-Río, Carlos R. Osorio and Manuel L. Lemos*

*Departamento de Microbiología e Parasitología, Instituto de Acuicultura e
Facultade de Biología, Universidade de Santiago de Compostela,
Santiago de Compostela 15782, Galicia, Spain*

*Corresponding author:
Phone: +34 981 563100 ext 16080
Fax: +34 981 547165
E-mail: mlemos@usc.es

Key words: *Photobacterium damsela*, iron uptake, heme uptake, ABC transporter

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

The marine fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* utilizes heme compounds as sole iron sources. In a previous work we have characterized a gene cluster with ten potential heme uptake and utilization genes. Two of these genes, *hutC* and *hutD*, which are iron-regulated, conform a putative inner-membrane heme ABC-transporter. In the present study, we constructed an insertional mutant, leading to the inactivation of *hutCD* genes. Reverse transcriptase-PCR analyses demonstrated that an insertion between the *hutB* and *hutC* genes abolished transcription of the downstream *hutC* and *hutD* genes. The *hutCD* mutant was unable to utilize heme as the sole iron source, demonstrating that the putative ABC-transporter proteins HutC and HutD are crucial for heme utilization as an iron source in *P. damsela* subsp. *piscicida*. Reverse transcriptase-PCR assays conducted with RNA samples isolated from experimentally infected fish revealed the presence of *hutCD* transcripts. This demonstrates that heme uptake genes of *P. damsela* subsp. *piscicida* are expressed during the infective process.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1. Introduction

The ability of pathogenic bacteria to obtain iron from the host tissues is crucial for their growth in vivo, and essential to cause an infection. In biological systems iron is chelated by high-affinity iron binding proteins and, therefore, pathogens have developed efficient mechanisms to obtain iron from the host [1]. In addition to siderophore production [2], many bacterial pathogens can obtain iron from free heme or heme proteins which are present in host tissues [3,4].

Some gram-negative bacteria obtain heme through a mechanism which consists of an outer membrane receptor and a heme-binding protein that is secreted via a type I protein secretion system, as is the case for *Serratia marcescens* [5] and *Pseudomonas aeruginosa* [6]. Another mechanism for heme uptake is mediated by a heme-binding outer membrane lipoprotein, as in *Haemophilus influenzae* [7]. However, the most frequently encountered heme uptake mechanism in gram-negative bacteria usually involve an outer membrane receptor, a TonB-dependent internalization process, a periplasmic heme-binding protein and an inner membrane-associated ABC-transporter. This type of mechanism has been identified in numerous species, which include *Vibrio anguillarum* [8,9], *Vibrio cholerae* [10], and *Escherichia coli* O157 [11], among others. Unfortunately, though many heme uptake genetic systems have been described at the sequence level in bacterial pathogens, studies to demonstrate that heme transport genes are indeed expressed in vivo during the infective process have been reported in only a few cases [12].

P. damsela subsp. *piscicida* is the causative agent of fish pasteurellosis, a disease affecting wild and cultured marine fish worldwide [13]. This bacterium is able to obtain iron through the production and utilization of siderophores, and can also utilize heme and hemoglobin as unique iron sources *in vitro* [14]. In a recent work, the

complete sequence of a genetic system putatively involved in heme transport has been reported [15]. This system included the gene for an outer membrane heme receptor HutA, three putative proteins HutZXW, a TonB-ExbB-ExbD system, a periplasmic hemin-binding protein HutB, and an ABC-transporter constituted by an inner membrane permease HutC and an ATPase HutD. This genetic system proved to be sufficient to confer the ability to utilize heme as sole iron source to *E. coli*. However, the role of this heme uptake system has not been tested in *P. damsela* subsp. *piscicida* to date. In addition, it is not known whether this heme uptake system is expressed *in vivo* during the infective process in fish. The goal of this study was to construct a mutant by inactivation of some of the genetic functions of the heme uptake gene cluster, and test if the ability to utilize heme as the sole iron source is affected. Moreover, the expression of heme ABC-transporter genes during infection for fish has been evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

P. damsela subsp. *piscicida* DI21 strain was routinely grown at 25°C in either Tryptic Soy Agar or Tryptic Soy Broth (Difco) supplemented with 1% NaCl (TSA-1 and TSB-1, respectively), and in CM9 minimal medium [9]. *Escherichia coli* DH5α and S17-1 λ *pir* were grown at 37 °C in LB broth or LB agar, as well as in CM9 minimal medium, supplemented with antibiotics when appropriate. Antibiotics were used at the following final concentrations: Kanamycin (Km) at 25 µg ml⁻¹; Ampicillin sodium salt (Ap) at 50 µg ml⁻¹, Rifampicin (Rif) at 50 µg ml⁻¹. 2,2'-Dipyridyl (Sigma) to chelate nonheme iron was prepared at 10 mM in water. Bovine hemin (Hm) (Sigma) was dissolved at 5 mM in 10 mM NaOH. Bovine hemoglobin (Hb) (Sigma) was dissolved at

1 mM in water. A *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 derivative strain resistant to rifampicin (DI21-Rif) was isolated by plating DI21 cells on TSA-1 supplemented with a gradient of rifampicin.

2.2. Recombinant DNA techniques

Recombinant DNA methods including restriction-enzyme digestions, ligation reactions, agarose-gel electrophoresis and plasmid analysis were performed following standard protocols [16]. Chromosomal DNA was isolated using the Easy-DNA kit (Invitrogen). Plasmid purification and elution of DNA fragments from agarose gels was performed using kits from Qiagen. Southern blot analysis was performed using Hybond-N+ membranes (Amersham Biosciences) using the ECL Direct Nucleic Acid labeling and detection system (Amersham Biosciences), following manufacturer's instructions. *E. coli* strains were transformed using a standard calcium chloride method [16].

2.3. Construction of a *P. damsela* subsp. *piscicida* hutCD insertional mutant

In a previous study [15], it was reported the nucleotide sequence of a gene cluster in *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 (EMBL access no. AJ582082) that included six genes (*tonBexbBDhutBCD*) that demonstrated to be iron-regulated and cotranscribed from a single promoter upstream of the *tonB* gene. For construction of an insertional mutant abolishing *hutCD* transcription, a PCR fragment, including the *hutB* carboxy-terminal region and the *hutC* amino-terminal region, was amplified. Primers used were delhutB-DI21-3 (GCGAATTCGTAAGTACCCAAACACCCGCA, *EcoRI* site underlined) and delhutB-DI21-4 (GCGTCGACGCCTAATAGGGCTGATACCGG,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2 further excised with *NotI*-*SaII* and cloned into the suicide vector pNidKan [9] to yield pSJ19. As a pCVD442 derivative, pNidKan contains R6K *ori*, requiring the *pir* gene product for replication. pSJ19 was mated from *E. coli* S17-1 λ *pir* into *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21-Rif. Integration of pSJ19 into the chromosome by homologous recombination via a single crossover was selected on agar medium containing kanamycin and rifampicin. The generated DI21 mutant strain was named CS27. Southern hybridization analysis was used to verify gene disruption.

10 2.4. RNA isolation and RT-PCR

To verify abolition of *hutCD* transcription, RT-PCR analyses were carried out. *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 parental strain and the CS27 mutant were grown in TSB-1 and then subcultured on CM9 minimal medium. Total RNA was prepared using the RNeasy Isolation Reagent (Ambion), according to the manufacturer's instructions. RNA preparations were then subjected to standard treatments with RNase-free DNaseI. Reverse transcription reaction was performed by using the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). For each reaction, 1 μ g of total RNA was used. Subsequent PCR amplification was carried out with Taq polymerase (Bioline). RT amplifications were performed using two different primers: one located at the 3' end of the *hutD* gene, and one located at the 3' end of the *hutB* gene. Further PCR was carried out using a primer pair amplifying a ca. 230-bp internal fragment of the *hutB* gene (see Fig. 1). As negative controls, DNA contamination of the RNA samples was ruled out by PCR using Taq DNA polymerase without reverse transcriptase. As positive controls, each primer combination was tested in PCR reactions carried out using chromosomal DNA as a template.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2 2.5. Hemin utilization assays

To test whether mutation of *P. damsela* subsp. *piscicida* *hutCD* genes had any effect on the utilization of hemin and hemoglobin as iron sources, overnight cultures of the parental strain DI21 and the mutant strain CS27 were adjusted spectrophotometrically to the same optical density and diluted 1:100 in fresh CM9 broth containing the iron chelator 2,2'-dipyridyl at 75 μ M, with or without 10 μ M hemin as iron source. Cultures were grown at 25 $^{\circ}$ C and absorbance at 600 nm monitored at 1-h intervals over 12 h.

22 2.6. Analysis of the in vivo expression

Experimental infections in fish were carried out using turbot fingerlings with an average weight of 14 g. In brief, 100 μ l of a *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 cell suspension were injected intraperitoneally at a concentration of 10^5 cells ml^{-1} . Immediately after fish death, kidney and spleen samples were collected, pooled and subjected to RNA purification and further Reverse-Transcriptase analysis as described above. RT amplifications were carried out with a primer at the 3' end of *hutD* gene as above, and further PCR was conducted with a primer pair amplifying a 230-bp internal fragment of *hutB*. As a control, the 16S rRNA was reverse-amplified with the universally conserved oligo PH targeted to the 3' end of the 16S transcript, and PCR was carried out using *P. damsela* 16S-specific primers car1 and car2 [17].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2 3. Results and discussion

4 3.1. Construction and evaluation of a *P. damsela* subsp. *piscicida* heme utilization mutant by inactivation of *hutCD* genes

6

Previous studies on the genetic organization of the *P. damsela* subsp. *piscicida* heme utilization gene cluster revealed three genes, *hutBCD*, which are transcribed downstream of *exbD* gene, and are subjected to iron-regulation. Protein sequence comparisons suggested that HutBCD are homologous to described periplasmic heme binding proteins, inner membrane heme permeases and ABC-transporter associated ATPases, respectively. The *hutCD* genes are supposed to constitute an ABC transporter, but their role in heme transport in *P. damsela* subsp. *piscicida* has not been demonstrated so far. In the present study we constructed an insertional mutant by inserting a suicide plasmid containing a DNA fragment covering the 3' end of *hutB* and the 5' end of *hutC* (Fig. 1). The successful insertional inactivation of *hutCD* was corroborated by PCR and Southern blot (data not shown). To test whether an insertion between *hutB* and *hutC* would abrogate transcription of the putative ABC-transporter *hutCD* genes, Reverse-Transcriptase PCR was employed. Results demonstrated that in the CS27 mutant, no mRNA was detected when the reverse transcription was carried out with a primer located at the 3' end of *hutD*, indicating that mRNA synthesis did not reach the end of the operon in the CS27 strain. However, when reverse transcription was carried out using a primer located at the 3' end of *hutB*, a mRNA transcript containing *hutB* sequence could be evidenced, demonstrating that *hutB* transcription remains intact

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

in the CS27 mutant (Fig. 2). These results demonstrate that *hutCD* genes have been inactivated in the CS27 strain.

We tested the effect of *hutCD* inactivation in the ability of *P. damsela* subsp. *piscicida* to utilize heme compounds as the sole iron source. Both the parental strain and the mutant showed a similar growth in CM9 supplemented with 10 µM hemin (Fig. 2a). However, the CS27 mutant strain showed a significant impairment for growth with heme as the sole iron source in the presence of the iron chelator 2,2'-dipyridyl, when compared to the parental strain DI21 (Fig. 2b). This demonstrates that *hutCD* genes are essential for heme utilization as iron source in *P. damsela* subsp. *piscicida*.

HutC has homology to members of a family of ABC-type permease proteins involved in the uptake of heme, and HutD has also homology to the ATP-binding protein component of permeases involved in heme transport [15]. The involvement of *hutCD* homologues in heme transport has been tested in very few bacterial species, and hence the interest of studying their function in *P. damsela*. For example, in *V. cholerae*, homologues of *hutCD* genes can be mutated without significantly affecting heme utilization, thus suggesting that proteins of other transport systems in that species can substitute for the physiological role of *hutCD* [10]. This is in contrast with our results in *P. damsela*, where *hutCD* are essential for heme transport, and no redundant gene functions can substitute the role of these two proteins. Our results are in agreement with those reported for *V. anguillarum*, where each of these genes showed to be essential for heme iron utilization as an iron source [9].

22

3.2. Detection of *hutCD* transcripts in experimentally infected fish

Using the methodology described above, we analyzed heme uptake system-gene expression in fish experimentally infected with *P. damsela* subsp. *piscicida*. A group

of seven fish were inoculated, and after fish death the bacterium was recovered in all the cases as pure cultures from both kidney and spleen samples. Therefore, total RNA was isolated from the same kidney and spleen samples and subjected to RT-PCR analyses. We confirmed the constitutive expression of the 16S rRNA gene transcript in all the RNA samples, since the expected PCR product of 267-bp was obtained in the seven specimens (Fig. 3).

Transcripts corresponding to the *tonBexbBDhutBCD* operon were detected in 100% of the specimens. A PCR amplification product of ca. 230-bp corresponding to the *hutB* gene was obtained in the seven samples, when mRNA was reverse-transcribed with a primer located at the 3' end of *hutD* (Fig. 3). None of the RNA specimens prepared from the experimentally inoculated fish were contaminated with DNA, as determined by PCR reactions lacking reverse transcriptase enzyme with the *hutB* specific primers (data not shown). RNA samples obtained from an non-inoculated fish tested negative for both the 16S and *hutB* genes (Fig. 3).

We have thus confirmed that a subset of heme uptake genes are expressed in fish which have undergone an experimental infection with *P. damsela* subsp. *piscicida*. In all the specimens we detected presence of *hutBCD* transcripts, which, based on previously reported data [15], means that the iron-regulated promoter upstream of the *tonB* gene, leading to transcription of *tonBexbBDhutBCD* genes is expressed in vivo during the infective process. In that previous work, it was demonstrated that this gene operon is strongly regulated by iron availability, showing that the *tonBexbBDhutBCD* transcript can be detected by RT-PCR only under conditions of low iron availability [15], and this regulation is believed to be mediated by the Fur (ferric uptake regulator) repressor [18,19].

The positive detection of *tonBexbBDhutBCD* transcripts in vivo in the present study, reinforces the idea that pathogens encounter a low-iron environment into the host tissues during the infective process. In addition, the expression of heme uptake genes during infection suggests that this genetic system is utilized to scavenge heme sources into the host, in order to contribute to acquire the precious metal. Similarly, recent studies also demonstrated that heme transport genes are expressed in vivo during natural infections of *Neisseria gonorrhoeae* in humans [12]. Although other iron-sequestering systems based on the synthesis and utilization of siderophores have been reported in *P. damsela* subsp. *piscicida* [14], our results indicate that heme utilization as iron source must be one of the systems of choice of this bacterium to set an infection on the fish host. Actually, it has been demonstrated that when hemin or hemoglobin is injected intraperitoneally into fish a few hours before experimental infection, the lethality of *P. damsela* subsp. *piscicida* is increased [14]. The existence of extracellular enzymes that could play a role as hemolysins has also been reported in this species [20]. Therefore, the production of hemolysins could contribute to release heme from host tissues and make it readily available for utilization as iron source. In this scenario, the expresion of a heme uptake system could represent a significant advantage for bacterial multiplication and for the establishment of an infective process in fish.

Acknowledgements

This work was supported by grant AGL2003-00086 from the Ministry of Science and Technology of Spain (cofunded by the FEDER Programme from the European Union), and grant PGIDIT04PXIC23501PN from Xunta de Galicia to M.L.L. S.J.R also thanks the Spanish Ministry of Science and Technology for a Predoctoral Fellowship.

References

[1] Ratledge, C., and Dover, L.G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 881-941.

[2] Crosa, J.H. (1989) Genetics and molecular biology of siderophore mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53, 517-530.

[3] Genco, C.A., and Dixon, D.W. (2001) Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol. Microbiol.* 39, 1-11.

[4] Osorio, C.R., and Lemos, M.L. (2002) Haeme iron acquisition mechanisms in *Vibrionaceae*. In: *Recent Research Developments in Microbiology* (Pandalai, S.G., Ed.), pp. 419-436. vol. 6. Research Signpost, Kerala, India.

[5] Ghigo, J.M., Létoffé, S., and Wandersman, C. (1997) A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 3572-3579.

[6] Ochsner, U.A., Johnson, Z., and Vasil, M.L. (2000) Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 146, 185-198.

[7] Reidl, J., and Mekalanos, J.J. (1996) Lipoprotein e(P4) is essential for hemin uptake by *Haemophilus influenzae*. *J. Exp. Med.* 183, 621-629.

[8] Mazoy, R., Osorio, C.R., Toranzo, A.E., and Lemos, M.L. (2003) Isolation of mutants of *Vibrio anguillarum* defective in haeme utilisation and cloning of *huvA*, a gene coding for an outer membrane protein involved in the use of haeme as iron source. *Arch. Microbiol.* 179, 329-338.

[9] Mouriño, S., Osorio, C.R., and Lemos, M.L. (2004) Characterization of the heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* 186, 6159-6167.

[10] Occhino, D.A., Wyckoff, E.E., Henderson, D.P., Wrona, T.J., and Payne, S.M. (1998) *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Mol. Microbiol.* 29, 1493-1507.

[11] Torres, A.G., and Payne, S.M. (1997) Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* 23, 825-833.

[12] Agarwal, S., King, C. A., Klein, E. K., Soper, D. E., Rice, P. A., Wetzler, L. M. and Genco, C. A. (2005). The gonococcal Fur-regulated *tbpA* and *tbpB* genes are expressed during natural mucosal gonococcal infection. *Infect. Immun.* 73, 4281-4287.

[13] Magariños, B., Toranzo, A.E., and Romalde, J.L. (1996) Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annu. Rev. Fish Dis.* 6, 41-64.

[14] Magariños, B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Barja, J.L., and Toranzo, A.E. (1994) Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2990-2998.

[15] Juíz-Río, S., Osorio, C.R., and Lemos, M.L. (2005) Heme uptake genes in human and fish isolates of *Photobacterium damsela*: existence of *hutA* pseudogenes. *Arch. Microbiol* (in press). DOI: 10.1007/s00203-005-0779-4.

[16] Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

[17] Osorio, C.R., Collins, M.D, Toranzo, A.E., Barja, J.L. and Romalde, J.L. (1999) 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for the rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2942-2946.

[18] Juárez-Río, S., Osorio, C.R., and Lemos, M.L. (2004) Identification and characterisation of the *fur* genes in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and subsp. *damsela*. Dis. Aquat. Org. 58, 157-164.

[19] Osorio, C.R., Lemos, M.L., and Braun, V. (2004) Identification of Fur regulated genes in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* using the Fur titration assay. Biometals 17, 725-733.

[20] Magariños, B., Santos, Y., Romalde, J.L., Rivas, C., Barja, J.L., and Toranzo, A.E. (1992) Pathogenic activities of the live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. J. Gen. Microbiol. 138, 2491-2498.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Reverse-Transcriptase PCR mapping of expression of *hutBCD* genes in *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 wild type and in the CS27 mutant strain. Primers RT-1 and RT-2 are those used in the reverse transcription reaction. Primer pair amplifying a piece of the *hutB* gene, used in all the subsequent PCR reactions for transcript detection, is denoted as A. An inserted suicide plasmid with a Kanamycin resistance cassette is depicted in the CS27 scheme, between *hutB* and *hutC* genes. Lanes: 1: CS27 RNA retrotranscribed with RT-1; 2: CS27 RNA retrotranscribed with RT-2; 3: DI21 RNA retrotranscribed with RT-1; 4: positive control (using genomic DNA with primer pair A); 5: negative control (using DNase-treated RNA as template, with primer pair A).

Fig. 2 Effect of *hutCD* mutation in the growth of *P. damsela* subsp. *piscicida* in CM9 medium with hemin as the sole iron source. (a) growth of DI21 and CS27 in CM9 supplemented with 10 µM hemin. (b) growth of DI21 and CS27 in CM9 supplemented with 10 µM hemin plus 75 µM 2,2'-dipyridyl.

Fig. 3 Expression of the iron-regulated *tonBexbDhutBCD* operon, detected by RT-PCR in seven fish specimens inoculated experimentally with *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21. The amplified fragments in each transcriptional unit are as follows: 16S rRNA transcript, a 267-bp fragment internal to 16S rRNA gene; *tonBexbDhutBCD* transcript, a 230-bp fragment internal to the *hutB* gene. Lanes 1 to 7 denote the seven fish RNA specimens. Lane 8: negative control (non inoculated fish).

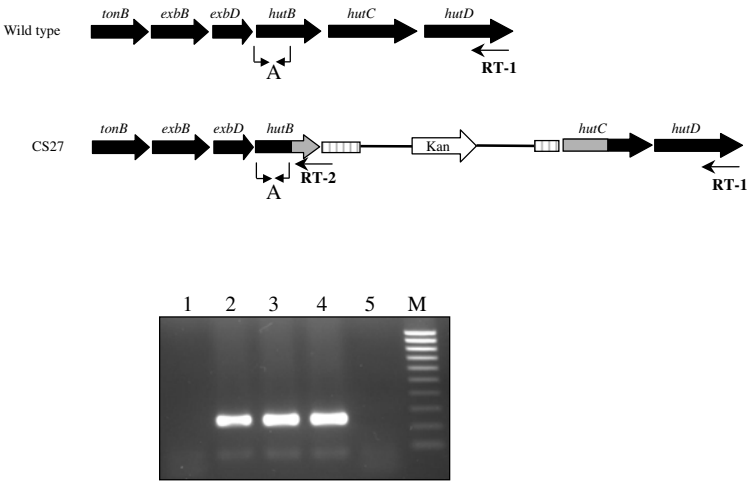


Figure 1

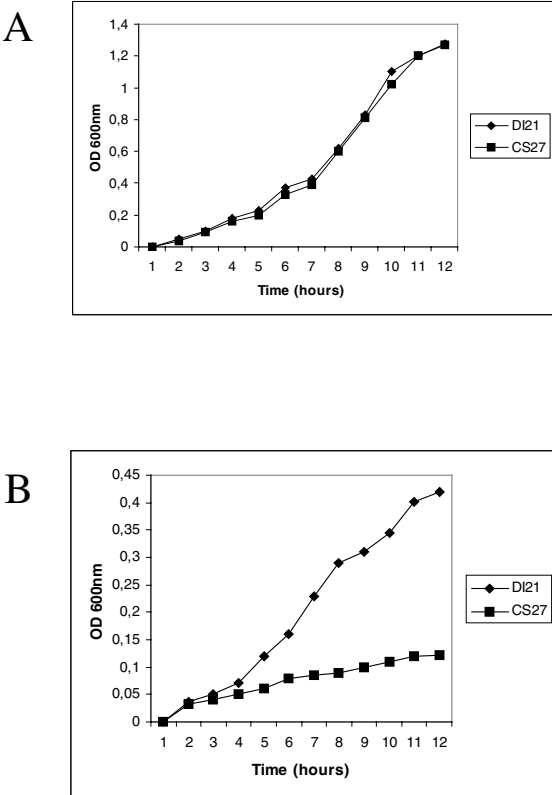


Figure 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

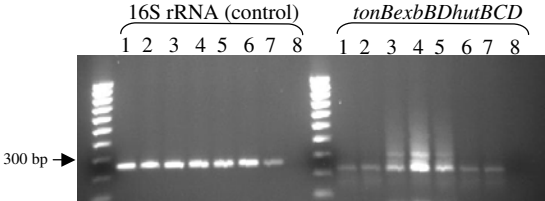


Figure 3

Identification of a subspecies-specific gene cluster involved in siderophore production in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: similarity to the *Yersinia* spp. High Pathogenicity Island

Carlos R. Osorio, Sandra Juiz-Río and Manuel L. Lemos*

Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía, Instituto de Acuicultura e Facultade de Bioloxía, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15782, Galicia, Spain

Running title: siderophore synthesis genes in *P. damsela*

Key words: *Photobacterium damsela*, iron uptake, siderophores, NRPS,

Submitted to: *Molecular Microbiology*

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía, Instituto de Acuicultura, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15782, Galicia, Spain. Phone: 34-981563100. e-mail: mlemos@usc.es

Abstract

Photobacterium damsela is a marine gram-negative bacterium that includes strains classified into two distinct subspecies, namely subsp. *piscicida* and subsp. *damsela*. Strains of subsp. *piscicida* are known to produce a siderophore of unknown structure which possesses neither hydroxamate- nor catecholate-chelating groups, whereas subsp. *damsela* strains produce a siderophore with hydroxamic groups. In the present study, two high molecular weight proteins were found to be induced under conditions of iron limitation in subsp. *piscicida* strain DI21 but not in subsp. *damsela* strain RM-71. Using Suppression Subtractive Hybridisation, we identified a subsp. *piscicida*-specific clone which was found to encode a partial ORF homologous to described high molecular weight non-ribosomal peptide synthetases involved in siderophore biosynthesis. Chromosome walking was employed to clone a DNA region of ca. 35 Kb, and 11 genes with the same transcriptional polarity could be defined on this cluster: *dahP*, *araC1*, *araC2*, *frpA*, *irp8*, *irp2*, *irp1*, *irp3*, *irp4*, *irp9* and *irp5*. Protein sequence comparisons revealed significant similarity with genes described in the high pathogenicity island (HPI) of pathogenic *Yersinia* species, which encodes the genes for the synthesis and transport of the siderophore yersiniabactin. AraC1 and AraC2 encode proteins with identity to AraC-family transcriptional activators. FrpA was found to have similarity to outer membrane ferrisiderophore receptors. Irp8 shows identity to *Y. pestis* YbtX. Irp1 and Irp2 were 50 and 45% identical to the high molecular weight non-ribosomal peptide synthetases HMWP1 and HMWP2 of *Yersinia enterocolitica*, respectively, and their molecular weight values were coincident with the two subsp. *piscicida*-specific iron-regulated protein bands mentioned above. Irp3, Irp4, Irp9 and Irp5 showed similarity to the Irp3, Irp4, Irp9 and Irp5 proteins described in *Y. enterocolitica* as part of the yersiniabactin biosynthetic gene cluster. Two conserved Fur

binding sequences were evidenced upstream the translational start points of *dahP* and *araC2* genes, suggesting the existence of two Fur-regulated promoters, although RT-PCR results indicated that the 11 genes can be co transcribed. Insertional inactivation of the *irp1* gene rendered *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 impaired for growth under iron limiting conditions, and unable to produce detectable amounts of siderophore on Chrome-azuroil S (CAS) indicator plates. Similarly, the *irp1* mutant showed a ca. 100-fold increase in the 50% infectious dose for fish, indicating that siderophore production via this gene operon contributes to virulence. Southern hybridisation evidenced that this gene cluster is exclusive of some European subsp. *piscicida* isolates, being absent in two avirulent strains and in all the subsp. *damsela* isolates analyzed. Cross-feeding assays as well as the *in silico* analysis of the adenilation domains of Irp1, Irp2 and Irp5 suggest that the *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 siderophore, which we named *piscibactin*, might be functionally and structurally related to yersiniabactin, and would be synthesized by means of a non-ribosomal peptide synthetase-mediated mechanism. The low similarity to other siderophore synthesis gene clusters described in *Vibrionaceae*, and the homology to *Yersinia* spp. HPI suggests that this genetic system might have been gained by lateral transfer.

Introduction

Iron is an essential element for most bacteria; however, most of the iron in biological systems is chelated by high-affinity iron binding proteins. Therefore, pathogens have developed efficient mechanisms to obtain iron from the host and to establish an infection (Ratledge and Dover 2000). The ability to obtain iron from free heme or heme proteins from the host tissues constitutes an important source of iron for many bacterial pathogens (Lee 1995; Genco and Dixon 2001; Osorio and Lemos 2002). However, one

of the main strategies to obtain iron is the synthesis and secretion of Fe(III) chelators, named siderophores, which are low molecular weight iron-chelating molecules that can remove iron from host iron-binding proteins (Crosa 1989), and then enter the cell through outer membrane receptor proteins. Many siderophores are small peptides synthesized by nonribosomal peptide synthetases (NRPS), which are multimodular enzymes that produce peptide products of a particular sequence without an RNA template (Marahiel *et al.* 1997; Schwarzer *et al.*, 2003).

The concentration of intracellular iron must be strictly regulated, since it can catalyze the formation of dangerously reactive radicals (Touati, 2000). The ferric uptake regulator (Fur) protein is the major repressor of iron uptake systems in gram-negative bacteria. When the protein is complexed with iron, it is able to bind to conserved sequences within the promoter regions called Fur boxes, repressing transcription of the genes and thus limiting the entry of excess iron into the cell (Escolar *et al.* 1999). Genes involved in siderophore biosynthesis are also subjected to transcriptional activation. This positive regulation can be exerted by members of the AraC family of transcriptional activators, and most of them become active upon binding an effector molecule, which in many cases has proved to be the cognate ferri-siderophore complex (Tanabe *et al.* 2005; Michel *et al.* 2005).

P. damsela subsp. *piscicida* is the causative agent of fish pasteurellosis, a disease affecting wild and cultured marine fish worldwide (Magariños *et al.* 1996a). The pathogenesis of this microorganism is believed to be a multifactor process not yet fully understood, but it is believed that the main virulence factors consist of polysaccharide capsular material (Magariños *et al.* 1996b), and a high affinity siderophore-mediated iron-sequestering system (Magariños *et al.* 1994). This bacterium is able to obtain iron from hemin and hemoglobin as unique iron sources *in vitro* (Magariños *et al.* 1994), and

a genetic system for heme uptake has been recently described (Juíz-Río *et al.* 2005). It was reported that strains of this subspecies can efficiently obtain iron from human transferrin, and this is achieved by a mechanism involving the production of siderophores (Magariños *et al.* 1994). However, the nature of this siderophore is still unknown and the genes involved in its biosynthesis have not been ascertained yet, although preliminary chemical assays and bioassays indicated that it is neither a phenolate nor a hydroxamate (Magariños *et al.* 1994).

P. damsela subsp. *damsela* (formerly *Vibrio damsela*) is currently included under the same species epithet with *P. damsela* subsp. *piscicida* (Gauthier *et al.* 1995). *P. damsela* subsp. *damsela* has been reported to cause wound infections and fatal disease in a variety of marine animals (Buck *et al.* 1991; Fouz *et al.* 1992) and also in humans (Morris *et al.* 1982; Fraser *et al.* 1997; Goodell *et al.* 2004). Strains of this subspecies harbour a genetic system for utilization of heme as iron source, which is nearly identical to that described in subsp. *piscicida* (Juíz-Río *et al.* 2005). Similarly, *P. damsela* subsp. *damsela* strains are able to utilize iron from transferrin, and secrete siderophores which have proved to be of hydroxamic type (Fouz *et al.* 1997).

This study was undertaken to get an insight into the genetic basis of the siderophore-mediated iron uptake system of the fish pathogenic bacterium *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, to study its role in virulence for fish and to assess if genetic differences exist among *P. damsela* subspecies and strains.

RESULTS

Presence of iron-regulated high molecular weight proteins in *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21

P. damsela subsp. *piscicida* DI21 and *P. damsela* subsp. *damsela* RM71 have previously been reported as siderophore-producing strains. DI21 produces a siderophore which has neither catechol nor hydroxamate groups, whereas RM71 is known to produce a siderophore of hydroxamate type. The profiles of total membrane proteins extracted from cells grown in iron-rich and iron-limited media in these two strains were compared (Fig. 1). In subsp. *piscicida* DI21, two high molecular weight protein bands were observed when the cells were cultured in iron-restricted media, whereas those bands were not evidenced under conditions of iron sufficiency. Interestingly, these two protein bands were absent under both iron-limiting and iron-sufficient conditions in the subsp. *damsela* strain RM71. These results indicated the existence of differentially-occurring iron-regulated proteins between the two *P. damsela* subspecies.

Isolation of DNA fragments specific of *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 using Suppression Subtractive Hybridisation

We hypothesized that the differential pattern of iron-regulated high-molecular weight proteins between subsp. *piscicida* DI21 and subsp. *damsela* RM71 strains could be due to a differential gene content, and these genes could be part of a genetic system involved in an iron-sequestering mechanism. Therefore, the suppression subtractive hybridisation procedure was carried out, in order to isolate DNA fragments encountered uniquely in DI21 genome, but absent from RM71 genome. For this purpose, subsp. *piscicida* DI21 was employed as the tester strain, and subsp. *damsela* RM71 as the driver. About 100 clones were analyzed after two rounds of hybridisation, duplicated clones were discarded on the basis of their restriction patterns, and the remaining clones were analyzed by automated DNA sequencing. Some of the subtracted clones contained DNA sequences encoding transposases, tRNA hydroxylases and hypothetical proteins

(data not shown). One clone, pSSH1, was selected for further studies, as the preliminary sequence analysis showed that the cloned fragment encoded a 508 amino acid- partial ORF which showed significant similarity (63%) to the *Yersinia enterocolitica* High Molecular Weight Protein 2 (HMWP2) (Table 1). This *Yersinia* protein is a member of the family of the non-ribosomal peptide synthetases, and is involved in the synthesis of siderophore yersiniabactin. Based on this similarity, the *P. damsela* subsp. *piscicida* gene was named *irp2* (iron regulated protein 2).

Cloning of the chromosomal regions surrounding the *irp2* locus.

The *Y. enterocolitica irp2* homologue is part of a gene cluster which constitutes a pathogenicity island (HPI), and includes all the genes necessary for the biosynthesis of the siderophore yersiniabactin. We hypothesized that the *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 *irp2* gene could be part of an iron-regulated operon including additional genes, and thus Inverse-PCR and chromosome walking were carried out in order to sequence the DNA surrounding the *irp2* gene.

The DNA insert of clone pSSH1 was used as a probe to screen blots of DI21 chromosomal DNA digested with various enzymes, and showed to hybridise to a ca. 9 Kb *XbaI-XbaI* DNA fragment (data not shown). This DNA fragment was further cloned and sequenced to completion, and the complete sequence of *irp2* was established as an ORF encoding a protein of 1979 amino acids with a predicted molecular mass of 221 kD. The 5'-end of the *irp2* sequence overlapped with that of a partial ORF which had been identified in a previous work (Osorio *et al.*, 2004) as part of a group of putative Fur-regulated genes, and that had been preliminarily described as a AngR-like protein. Inverse-PCR was accomplished to amplify additional DNA sequences upstream and downstream of *irp2* gene, which were cloned and sequenced to completion. A gene

cluster spanning ca. 35 Kbp and including 11 putative open reading frames was established (Fig. 2a).

Predicted protein sequences

The first ORF identified in this gene cluster, *dahP*, codes for a putative 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase. It showed the highest similarity with a DAHP synthase of *V. vulnificus* (Table 1). Homologues of this enzyme are responsible for the condensation of the pentose phosphate pathway intermediate D-erythrose 4-phosphate and the glycolytic pathway intermediate phosphoenolpyruvate to DAHP, a step in the biosynthesis of chorismate. Chorismate is an intermediate in the biosynthesis of aromatic compounds, some of which are precursors of aryl groups and aromatic amino acids which are part of the structure of certain siderophores. A DAHP synthase homologue has actually been described as part of the gene cluster involved in siderophore anguibactin biosynthesis in *V. anguillarum* (Di Lorenzo *et al.* 2003; Alice *et al.* 2004).

The second ORF of this gene cluster, located downstream of *dahP*, showed similarity to members of the AraC family of transcriptional regulators, and was termed *araC1*. The closest relatives of AraC1 (Table 1) showed to be a putative AraC-family transcriptional regulator annotated in the completed genome of *P. profundum*, and an AraC-type DNA-binding domain-containing protein of *V. cholerae* RC385 (GenBank Ac no. ZP_00753343), a strain whose genome project is being completed at TIGR. Other homologues of this ORF included putative transcriptional regulators of several bacterial species (Table 1), but the homology was restricted to the C-terminal part of the protein (data not shown). A protein domain prediction carried out using PFAM database (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) showed that there is an helix-turn-helix motif

within the ca. last 100 residues of the C-terminal part of the deduced AraC1 protein, which is a conserved domain typical of this family of regulators. This same conserved motif was encountered in the C-terminal part of the third ORF of the cluster, that was termed AraC2: this is a predicted protein of 323 amino acids with homology to putative AraC-family transcriptional regulators (Table 1). With the exception of *P. profundum* and *V. cholerae* RC385 homologues, the homology between AraC2 and other proteins of the same family was restricted to the C-terminal part of the protein (data not shown). The fourth ORF of the cluster was termed *frpA*, encoding a predicted 660-amino acid protein which showed similarity to a series of TonB-dependent receptors (Table 1). Significant similarity was evidenced between FrpA and the *Y. pestis* and *P. fluorescens* yersiniabactin and quinolobactin outer membrane receptors, respectively. With the exception of *P. profundum* and *V. cholerae*, none of the FrpA homologues retrieved in a BLAST search corresponded to members of the family *Vibrionaceae*.

The fifth ORF, *irp8*, encodes a predicted 412-amino acid protein which showed homology to putative proteins whose function has not been ascertained in any species. A search conducted using the COG database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>) places this protein within the group of permeases of the major facilitator superfamily. Actually, two of the closest homologues to ORF5 have been annotated as putative permeases of that family. A high similarity percentage was found between this protein and YbtX, a highly hydrophobic cytoplasmic membrane protein described as part of the HPI of pathogenic *Yersinia* species (Fetherston *et al.* 1999).

The sixth ORF of the cluster corresponds to the *irp2* gene, isolated by subtractive hybridization between DI21 and RM71 strains (see above). This gene encodes a predicted high molecular weight non-ribosomal peptide synthetase of 1979 amino acids. The seventh ORF was termed *irp1*, whose start codon was located 50 bp downstream

the TAA stop codon of *irp2*. Irp1 is a protein of 3996 amino acids, with a predicted MW of 442 kDa. The first N-terminal 430 amino acids of Irp1 are part of a PKS (polyketide synthase) domain, and the identity percentage in this region alone, was 79% to *P. profundum* and *V. cholerae* RC385, and 67 and 62% to *P. luminescens* and *Yersinia* spp., respectively, being the most conserved between Irp1 and their closest homologues. Among the first 50 homologues retrieved in a Blast Search, none of them were members of the family *Vibrionaceae*, except *P. profundum* and *V. cholerae* RC385. Interestingly, the ca. last 500 amino acid residues of the C-terminal end of *irp1* showed similarity to a putative AMP-binding enzyme of *P. profundum*, which is the ORF located immediately downstream of the *irp1* homologue in this species (Vezzi *et al.* 2005).

The eighth ORF was termed *irp3*, and encodes a putative oxidoreductase. Homologues of Irp3 have been described in the HPI of pathogenic *Yersinia* species, as thiazolinyl reductase components of the siderophore biosynthesis pathway (YbtU component).

Irp4 was found to be 43% identical to *Y. pestis* YbtT, described as a thioesterase-like protein involved in yersiniabactin biosynthesis (Pelludat *et al.* 1998), and 36% identical to a thioesterase-like protein located in the anguibactin biosynthetic gene cluster of *V. anguillarum* (Farrell *et al.* 1990).

The tenth ORF encodes a protein which we termed Irp9. It showed similarity to members of the family of chorismate-binding enzymes, particularly to anthranilate synthases. Among the first 50 candidates in a Blast Search, none of them were members of the family *Vibrionaceae*, except *P. profundum* and *V. cholerae* RC385, and, interestingly, apart from those cited in Table 1, the closest homologues included species of the genera *Bifidobacterium*, *Methylococcus*, *Geobacter* (data not shown), indicating that this gene does not have close homologues within the finished *Vibrio* genomes. Irp9 is similar to *Y. enterocolitica* Irp9, an enzyme which directly converts chorismate into

salicylate, which is further used as a precursor in the synthesis of yersiniabactin (Pelludat *et al.* 2003).

Irp5, encoded by the last ORF of this cluster, was found to be homologous to a series of aryl-activating enzymes, involved in the adenilation and activation of aryl groups and amino acids (Table 1). It is 47% identical to *Y. pestis* YbtE, a salicyl-AMP ligase which activates salicylic acid and transfers the activated molecule to the first ArCP domain of the non-ribosomal peptide synthetase HMWP2 (Gehring *et al.* 1998). Interestingly, Irp5 is 44% identical to *V. cholerae* VibE, the vibriobactin-specific 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase (Wyckoff *et al.* 1997).

Transcriptional organization of the cluster

The eleven genes of the cluster described in this study have the same transcriptional polarity. Downstream of *irp5* it was evidenced an open reading frame, which we termed *orf12*, with opposite transcriptional polarity respect to the 11-gene cluster described (Fig. 2a), and its predicted protein product showed similarity to putative ATPase components of ABC transporters (data not shown). Upstream of *dahP* gene we sequenced three additional kilobases, but no ORFs were evidenced (data not shown).

Preliminary sequence analysis identified a conserved putative Fur-binding site (Fur boxes), upstream of *dahP* gene, which shared 17 out of 19 identical nucleotides with the *E. coli* Fur-box consensus sequence. Similarly, a potential Fur-box with identity in 16 of 19 positions with the consensus was evidenced upstream of *araC2* gene (Fig. 2a). This would suggest the existence of at least two iron-regulated promoter sequences within this cluster. We first hypothesized that the eight genes downstream of *araC2* would be transcribed from the promoter upstream of this gene. To test this, we conducted a reverse-transcriptase reaction with a primer (RT-1) targeted to the 3'-end of *irp5*, and

PCR reactions were performed with 2 different primer combinations, A and B, that amplified internal fragments of *araC2* and *irp1* genes respectively (Fig. 2a). The two reactions yielded a product of the expected size, indicating the existence of a mRNA molecule which spans from *araC2* to *irp5* (Fig. 2b). To assay the cotranscription of *dahP* and *araC1* from a putative promoter sequence upstream of *dahP*, a primer (RT-3) targeted to the 3'-end of *araC1* gene was used in the reverse-transcriptase reaction, and a PCR reaction was performed with primer combination C, targeted to the *dahP* gene. The results indicated that *araC1* is transcribed from the *dahP* promoter (Fig. 2b). Interestingly, when a primer (RT-2) targeted to the 3'-end of *araC2* was used in the reverse-transcriptase reaction and the further PCR was carried out with primer combination C (targeted to *dahp*), an amplification product was obtained, indicating that transcription from *dahP* promoter also could run through *araC1* (data not shown). When the product of the reverse-transcriptase reaction conducted with primer RT-1 targeted to the 3'-end of *irp5* was used as a template in a PCR reaction with primer pair C, an amplification product of the expected size was obtained (Fig. 2b). This clearly indicates that the transcript originated from *dahP* promoter reaches the end of the 11-gene cluster.

Negative and positive controls (see Material and Methods) corroborated the accuracy of the RT-PCR results (Fig. 2b). These results demonstrate that the 11 genes of the cluster described in this study can be co transcribed from the promoter upstream of *dahP* gene, although we cannot rule out the existence of additional promoters, particularly upstream of *araC2*.

***irp1* insertional inactivation renders *P. damsela* subsp. *piscicida* unable to produce siderophores and to grow under iron-limiting conditions, and decreases the virulence for fish**

The possible relationship between the CAS phenotype and the production of a siderophore molecule mediated by the gene cluster described in this study, was analyzed by generating an operon disruption caused by inserting a suicide plasmid in the *irp1* gene. The *irp1* insertional mutant, which was termed CS31, was tested on CAS agar, and found to be CAS negative, indicating loss of siderophore production (Fig. 3a). Parental and mutant strains were cultivated in CM9 minimal medium with addition of the iron chelator 2,2-Dipyridyl at a concentration of 60 µM. Under these iron-limiting conditions, the *irp* insertional mutant CS31 was impaired for growth with respect to the parental strain (Fig. 3b). In addition, when the protein profiles of CS31 and the parental strain, both under iron-sufficient and iron-limiting conditions were compared, it was evidenced that the mutant lacked the iron-regulated protein of 442 kDa (Fig. 1).

To analyse the role of siderophore-mediated iron uptake in the virulence of *P. damsela* subsp. *piscicida* for fish, we inoculated the parental strain and the CS31 mutant in turbot. The LD50 obtained with the CS31 mutant ($>2.6 \times 10^7$) was 100-fold higher than with the parental strain (8×10^5).

These results altogether demonstrate that the gene cluster described in this work is involved in the production of the *P. damsela* subsp. *piscicida* siderophore, and that this siderophore is necessary for growth under iron limitation and contributes to virulence for fish.

Distribution of *irp1* in *P. damsela* subsp. *piscicida* and subsp. *damsela* isolates

The presence of some of the genes of the cluster described in this study in various *P. damsela* isolates of the two subspecies and with diverse isolation origins was tested by Southern hybridization. Chromosomal DNA samples were digested with *HindIII*, and Southern blot was individually performed with probes internal to *dahP*, *araC1*, *frpA*, *irp2*, *irp1*, *irp9* and *irp5* genes. For all the assayed probes, the results were equivalent: all these genes showed to be absent in all the subsp. *damsela* strains, and were present uniquely in subsp. *piscicida* strains DI21, B51, 666.1, PC.554-2, PC.435.1 and ATLIT 2 (Fig. 4). All the positive strains are recognized as virulent for fish (Table 4), and were isolated from Spain and Portugal, with the exception of ATLIT2, which was isolated in Israel. These results suggest that all the strains harbouring this gene operon share a same clonal origin. In a previous study (Magariños *et al.* 2000), it was proposed the possibility that two distinct clonal lineages exist within *P. damsela* subsp. *piscicida*, represented by the European isolates in one hand, and the Japanese isolates in the other hand. These data are of special interest for the epidemiological typing of strains of this fish pathogen.

Similarity to gene clusters of other species

We searched DNA databases for both completed and unfinished bacterial genome projects to find homologues of the *P. damsela* subsp. *piscicida* siderophore biosynthesis gene cluster. The 11-gene cluster described in this work shows some similarities with the high-pathogenicity island (HPI) of *Yersinia* spp., encoding genes involved in siderophore yersiniabactin-mediated iron uptake. For comparative purposes we selected the well-studied *Y. enterocolitica* HPI. This is integrated within an *asn*-tRNA locus, and contains homologues of all the *P. damsela* genes with the exception

of *dahP* and *araCI* although the arrangement of genes differs considerably between the two species (Fig. 5).

The highest similarity in sequence and gene arrangement of the *P. damsela* cluster corresponds to a region of the *P. profundum* genome (Vezzi *et al.* 2005). This DNA region contains homologues of all the *P. damsela* subsp. *piscicida* genes, with the exception of *dahP*. Although the *P. profundum* PBPA1666 gene (Fig. 5), which is annotated as a putative AMP-binding enzyme, does not have a gene counterpart in subsp. *piscicida*, it encodes a protein that is highly homologous to the C-terminal part of *P. damsela* subsp. *piscicida* Irp1, suggesting that the subsp. *piscicida* Irp1 protein is actually the counterpart the *P. profundum* proteins Irp1 and PBPA1666. The *P. profundum* cluster is located immediately downstream of an asn-tRNA locus (Fig. 5), suggesting that it might have been integrated in this gene constituting a laterally-transferred pathogenicity island, in a similar way as described in the *Yersinia* spp. HPI (Buchrieser *et al.* 1998; Rakin *et al.* 2001; Lesic and Carniel, 2005). None of the finished *Vibrio* genome projects showed to contain a gene cluster homologous to that described in this study. However, partial DNA sequences of *V. cholerae* strain RC385 have been recently deposited in GenBank database, and we found two database entries of this strain that together account for a gene cluster similar to that of *P. damsela* subsp. *piscicida*. The *V. cholerae* RC385 cluster includes homologues of all the *P. damsela* genes, with the exception of *dahP*, and it does not contain an asn-tRNA locus upstream of the *araCI* homologue, but rather an ORF coding for an hypothetical protein. Similarly, when we analyzed the sequence of *P. damsela* subsp. *piscicida*, we could not find evidence of sequences related to asn-tRNA genes in the three kilobases upstream of *dahP* gene (data not shown).

Irp1, Irp2 and Irp5 are members of the NRPS family.

Nonribosomal peptide synthetases are modularly organized multi-enzyme complexes, which represent at the same time template and biosynthetic machinery (Schwarzer *et al.*, 2003). A module is a section of the NRPS that is responsible for the incorporation of one carboxy- or amino acid into the final product (Marahiel *et al.* 1997). The modules are further subdivided into domains which represent the enzymatic units that catalyse the individual steps, and can be identified on the protein sequence by highly conserved motifs called core-motifs. Three domains are essential for the non ribosomal synthesis: adenylation-(A)-domains for substrate recognition and activation; peptidyl-carrier-protein (PCP) domains for transport of the activated substrate to the respective catalytic centers; and condensation-(C)-domains for the formation of the peptide backbone. Using the PFAM database we detected conserved domains typical of nonribosomal peptide synthetases in the amino acid sequences of Irp1, Irp2 and Irp5 proteins of *P. damsela* subsp. *piscicida* (Fig. 6). Irp2 has six predicted catalytic domains: two C-domains, one A-domain, two PCP-domains and one methylation domain. Irp also shows a multimodular organization, and ten catalytic domains are predicted: one N-terminal ketoacyl-synthetase domain, followed by one acil-transferase domain; one dehydrogenase domain, two PCP-domains, two condensation domains, one A-domain, two C-domains, one methylation domain and a C-terminal thioesterase domain. Irp5, the putative salicyl-AMP ligase, has a unique A-domain (Fig. 6).

It has been reported that the substrate specificity of the A-domains is mostly determined by ten residues of the substrate binding pocket, and these residues can be considered as the codons of nonribosomal peptide synthesis (Stachelhaus *et al.* 1999; Schwarzer *et al.* 2003). Thus, it is possible to predict the substrates that will be recognized and adenylated by the three putative A-domains predicted in this study: one in Irp5, and one

in each Irp2 and Irp1. We carried out a sequence alignment of these three predicted A-domains, with that of the gramicidin S synthetase (GrsA) from *Bacillus brevis*, and determined the ten conserved residues of the substrate binding pocket. As it is shown in Table 3, the Irp5 Adenylation domain is predicted to select salicylate, whereas the A-domains of Irp2 and Irp1 are predicted to select and activate cysteine.

Cross-feeding assays

The assays using purified yersiniabactin showed that both the parental *P. damsela* subsp. *piscicida* and the CS31 mutant were able to use this siderophore (Table 2). Similarly, the bioassays showed that *Y. enterocolitica* WA *fyuA2*, which produces yersiniabactin but lacks the yersiniabactin FyuA receptor (Brem *et al.*, 2001), is able to cross-feed *P. damsela* subsp. *piscicida*, whereas *Y. enterocolitica* WA-CS *irp1::Kan^r*, which has the yersiniabactin FyuA receptor but is unable to synthesize yersiniabactin (Pelludat *et al.*, 1998), is not. We also tested if piscibactin can stimulate the growth of *Y. enterocolitica irp1*-. Results showed that *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 promoted the growth of *Y. enterocolitica irp1* but not that of *Y. enterocolitica fyuA*, whereas *P. damsela* subsp. *piscicida* CS31 could not cross-feed any of the indicator strains (Table 2). These results clearly suggest that piscibactin and yersiniabactin could be structurally and functionally related.

DISCUSSION

Siderophore production by *P. damsela* subsp. *piscicida* strains has been described in the last years, and it is believed that this high-affinity ferric iron uptake system significantly contributes to virulence for fish (Magariños *et al.* 1994). However, little is known on the genetic basis for biosynthesis of the siderophore produced by this species.

The genetic content can vary considerably between strains of the same species, and this variation is particularly frequent in genes that encode virulence factors. In this scenario, suppression subtractive hybridisation (SSH) has been successfully applied to the identification of genomic differences between bacterial strains (Mahairas *et al.*, 1996; Calia *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2000), and it has been recently applied to the assessment of genetic diversity among *P. damsela* subsp. *piscicida* strains (Juíz-Río *et al.*, 2005).

Previous studies reported that *P. damsela* subsp. *piscicida* strains produce a siderophore which is different to that synthesized by subsp. *damsela* strains (Magariños *et al.*, 1994; Fouz *et al.*, 1997). By using SSH, we have identified a gene in *P. damsela* subsp. *piscicida* with homology to the non-ribosomal peptide synthetase gene *irp2* involved in yersiniabactin biosynthesis. This suggested that additional genes involved in siderophore production in *P. damsela* subsp. *piscicida* might be clustered in the same region of the chromosome. A large DNA fragment of ca. 35 Kbp was characterized, and included 11 putative ORFs which could be co transcribed from a promoter upstream of *dahP* gene. However, we understand that this does not exclude the possibility that additional promoter sequences exist upstream of other genes of this cluster.

The largest ORF, *irp1*, comprising ca. 10 Kb, encoded a 442-kDa polypeptide. The insertional inactivation of this gene lead to loss of siderophore production as tested on CAS agar. This provided evidence that this gene cluster is involved in the biosynthesis of the *P. damsela* subsp. *piscicida* siderophore. The *irp1* insertional mutant was also impaired for growth under conditions of iron limitation, suggesting that the gene cluster described in this study encodes a siderophore-based mechanism which is crucial for iron uptake. The absence of a halo in the CAS-agar plates around the CS31 mutant indicates that this is the only high-affinity iron-scavenging system present in *P. damsela* subsp.

piscicida DI21. This mutant showed to be reduced in its virulence for fish, and the lethal dosis 50 increased two logarithms with respect to the parental strain. These results demonstrate that the presence of this siderophore-mediated iron acquisition mechanism contributes significantly to the virulence of *P. damsela* subsp. *piscicida*. The connection between siderophore-mediated iron acquisition mechanisms and bacterial virulence has been well established (Faraldo-Gómez and Sanson, 2003), and recent studies have demonstrated the importance of siderophore production in the virulence of fish pathogens (Fernández *et al.*, 2004). Similarly, mutants in *irp1* gene of extra intestinal pathogenic *E. coli* carrying HPI, demonstrated to be less virulent than the parental strain (Schubert *et al.*, 2002).

We predicted a modular organisation based on typical domains of NRPS in three proteins encoded within this cluster: Irp5 is the candidate to carry out the activation of the carboxylate group of salicylic acid via ATP-dependent PPi exchange reactions, preparing that molecule for the final stages of siderophore synthesis. Similarly, both Irp2 and Irp1 contain adenylation-(A)-domains whose predicted substrate is cysteine. Based on the *in silico* analysis of these domains, we predict that the yet uncharacterised siderophore produced by *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 might contain at least one salicylate and two cysteine residues in its structure. Additional domains predicted in Irp2 and Irp1 suggest that methylation reactions also occur during siderophore biosynthesis. This suggested that the DI21 siderophore might be structurally related to yersiniabactin, which contains a salicylate residue plus three cysteine residues (Drechsel *et al.*, 1995).

The results obtained in the cross-feeding assays support the hypothesis that the siderophore of DI21 is functionally related to yersiniabactin. In this sense, the subsp. *piscicida* parental strain was able to stimulate the growth of a *Y. enterocolitica irp1*

mutant under conditions of iron limitation, and this stimulation was dependent on the presence of the yersiniabactin receptor FyuA. Similarly, a *Y. enterocolitica fyuA* mutant, but not a *irp1* strain, cross-fed the *P. damsela* subsp. *piscicida* CS31 mutant.

The gene cluster described in this study showed to be absent in subsp. *damsela* strains, and was present uniquely in subsp. *piscicida* strains isolated from Spain, Portugal and one isolate from Israel. These results suggest that all the strains harbouring this gene operon share a same clonal origin. The two subsp. *piscicida* avirulent strains showed to lack this system, although they have been reported to produce siderophores (Magariños *et al.*, 1994). In a previous study (Magariños *et al.*, 2000), it was proposed that two distinct clonal lineages exist within *P. damsela* subsp. *piscicida*, represented by the European isolates in one hand, and the Japanese isolates in the other hand. These data are of special interest for the epidemiological typing of strains of this fish pathogen.

The *Yersinia* HPI is widespread among both pathogenic and nonpathogenic taxa of *Enterobacteriaceae*, and has been described in *E. coli* as well as in *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* and *Serratia* (Schubert *et al.*, 1998; Bach *et al.*, 2000; Schubert *et al.*, 2000; Gophna *et al.*, 2001; Olsson *et al.*, 2003). The differential occurrence among *P. damsela* strains of this gene cluster, together with the genetic organization of this DNA region and its similarities to the *Yersinia* spp. HPI, suggest that the *P. damsela* subsp. *piscicida* siderophore biosynthesis gene cluster is part of a pathogenicity island similar to other islands described in gram-negative bacteria.

METHODS

Bacteria, plasmids and media

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 4. *P. damsela* subsp. *damsela* and *P. damsela* subsp. *piscicida* cells were routinely grown at 25°C in either Tryptic Soy Agar or Tryptic Soy Broth (Difco) supplemented with 1% NaCl (TSA-1 and TSB-1, respectively), and in CM9 minimal medium (Mouriño *et al.*, 2004). *Escherichia coli* strains were grown at 37°C in Luria Bertani (LB) broth or LB agar, as well as in CM9 minimal medium, supplemented with antibiotics when appropriate. *Yersinia enterocolitica* strains were routinely grown at 37°C in LB, Nutrient Broth (NB) and Nutrient Agar (NA). All strains were stored frozen at -80°C in LB broth with 20% glycerol. Antibiotics were used at the following final concentrations: Kanamycin (Km) at 25 µg ml⁻¹; Ampicillin sodium salt (Ap) at 50 µg ml⁻¹; Cloranphenicol (Cm) at 20 µg ml⁻¹; Rifampicin (Rif) at 50 µg ml⁻¹. All stocks were filter sterilized and stored at -20°C. 2,2'-Dipyridyl (Sigma) to chelate iron was prepared at 10 mM in water. Production of siderophores was tested by the universal chemical assay of Schwyn and Neilands (1987) in solid medium. The assay was performed by spotting 20 µl of supernatant of each bacterial culture previously grown in CM9 onto chrome azurol S (CAS) agar plates.

Analysis of Proteins

P. damsela subsp. *piscicida* DI21 and subsp. *damsela* RM71 cells were grown in CM9 supplemented with either Cl₃Fe 10µM or 2,2'-Dipyridyl 60 µM (iron-sufficient and iron-restricted conditions, respectively). This concentration of 2,2'-Dipyridyl was lowered to 30 µM in the case of the DI21 *irp1*- mutant strain (CS31). Cells were centrifuged and total membrane proteins were obtained as previously described (Toranzo *et al.*, 1983). Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-

polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The protein bands were visualized by staining with Coomassie brilliant blue.

Suppression subtractive hybridization

Bacterial genome subtraction was performed using the PCR-Select Bacterial Genome Subtraction Kit (Clontech). In brief, tester (DI21) and driver strain (RM71) genomic DNA (2 µg) were each digested with 10 units *RsaI* for 5 h. The tester DNA was aliquoted into two tubes, and each was ligated to a different adaptor provided with the kit. Two hybridisation rounds were carried out: in the first hybridisation, an excess of driver DNA was added to each adaptor-ligated tester DNA, and samples were then heat denatured and allowed to anneal. In the second hybridisation round, the two samples from the first hybridisation were mixed together without denaturation. The product of this last hybridisation was then used as a template in a PCR reaction to amplify the tester-specific sequences, using Advantage cDNA polymerase mix (Clontech). The obtained PCR products were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega) and recombinant clones were screened by restriction analysis prior to DNA sequencing.

Recombinant DNA techniques

Recombinant DNA methods including restriction-enzyme digestions, ligation reactions, agarose-gel electrophoresis and plasmid analysis were performed following standard protocols (Sambrook and Russell, 2001). Chromosomal DNA was isolated using the Easy-DNA kit (Invitrogen). Plasmid purification and elution of DNA fragments from agarose gels was performed using kits from Qiagen. Southern blot analysis was performed using Hybond-N+ membranes (Amersham Biosciences) using the ECL Direct Nucleic Acid labeling and detection system (Amersham Biosciences), following

manufacturer's instructions. *E. coli* strains were transformed using a standard calcium chloride method (Sambrook and Russell, 2001). PCR reactions were carried out using the Expand Long Template Kit (Roche). For inverse PCR, chromosomal DNA was digested with a single restriction enzyme, the fragments self-ligated, and the ligation products subsequently used as templates in PCR reactions with suitable primers.

DNA sequencing and data analysis

The DNA sequence was determined by the dideoxy chain termination method using the CEQ DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter) using a capillary DNA sequencer CEQ 8000 (Beckman Coulter). Restriction maps and DNA translation were generated by the BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Comparison of the sequence data with published sequences in EMBL/GenBank was performed with the blast software via the Internet (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> and <http://www.ebi.ac.uk/blast/index.html>). Prediction of protein domains was carried out by using the Pfam database online facilities (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). The EMBL accession number for the sequences described in this article is AJ699306.

RNA isolation and RT-PCR

P. damsela subsp. *piscicida* DI21 was grown in TSB-1 and then subcultured on CM9 minimal medium. Total RNA was prepared using the RNeasy Isolation Reagent (Ambion), according to the manufacturer's instructions. RNA preparations were then subjected to standard treatments with RNase-free DNaseI. Reverse transcription reaction was performed by using the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). For each reaction, 1 µg of total RNA was used. Subsequent PCR amplification was carried out with Taq polymerase (Bioline) using suitable primers. As negative controls, DNA

contamination of the RNA samples was ruled out by PCR using *Taq* DNA polymerase without reverse transcriptase. As positive controls, each primer combination was tested in PCR reactions carried out using chromosomal DNA as a template.

Construction of a irp1-targeted disruptant of P. damsela subsp. piscicida

A *EcoRI-XbaI* fragment of 4672 bp including the 3'-end of *irp2* and the 5'-end of *irp1* was ligated into vector pWKS30. The DNA insert was further excised with *NotI-SalI* and ligated into the suicide vector pNidKan (Mouriño *et al.*, 2004), to generate pSJR52. As a pCVD442 derivative, pNidKan contains R6K *ori*, requiring the *pir* gene product for replication. Insertion of the suicide vector into the chromosome by a single crossover results in a Kan^R phenotype. The pSJR52 plasmid was transformed into *E. coli* S17-1 λpir followed by mobilization into DI21-Rif. Conjugation was done basically as described by Thune *et al.*, (2003). Insertional mutants were selected on agar plates containing kanamycin (50 µg/ml) and rifampycin (50 µg/ml), and presence of the inserted plasmid into the *irp1* gene was confirmed by Southern hybridization (data not shown).

Assay methods for siderophore production and growth under iron-limiting conditions, and virulence experiments

Siderophore production by *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21-Rif and its *irp1* disruptant CS31, was tested by incubation on chrome azurol S (CAS) agar plates (Schwyn and Neilands, 1987). The ability of *P. damsela* subsp. *piscicida* strains to grow under conditions of iron limitation was evaluated by using M9 minimal medium

supplemented with 0.2% casaminoacids (wt/vol), in the presence of the iron chelator 2,2'-Dipyridyl (Sigma) at a concentration of 60 μ M.

The pathogenicity of *P. damsela* subsp. *piscicida* strains was assayed for turbot (*Scophthalmus maximus*), using 9 fish (average weight, 15 g) per dose, as previously described (Magariños *et al.*, 1992). Fish were inoculated with bacterial doses ranging from 10^4 to 10^6 cells. Mortalities were recorded daily for 10 days, and the LD₅₀ was calculated according to the Reed and Muench method (Reed and Muench, 1938).

Screening of the presence of cluster genes in P. damsela strains

To test the presence of the *dahP*, *araC1*, *frpA*, *irp2*, *irp1*, *irp9* and *irp5* genes, DNA from a collection of *P. damsela* subsp. *piscicida* and subsp. *damsela* strains was digested with *HindIII*, gel-electrophoresed and subjected to Southern blot hybridization. Internal regions of each of the assayed genes were PCR-amplified using suitable primers and used as DNA probes.

Bioassays

Cross-feeding assays were utilized to test the ability of *Y. enterocolitica* and *P. damsela* subsp. *piscicida* strains to induce the growth of the same strains subjected to iron starvation. Two mutants of *Y. enterocolitica* that were deficient in the biosynthesis of yersiniabactin (strain WA-CS *irp1*::Kan^r), and in the synthesis of the yersiniabactin receptor (strain WA.*fyuA2*) respectively, were used. *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21-Rif and CS31 were used for detection of yersiniabactin utilization. Yersiniabactin was purchased from EMC microcollections GmbH (Tübingen, Germany). One hundred μ l of overnight cultures of each indicator strain were added to 3 ml of molten TSA-1 (*P.*

damsela subsp. *piscicida* strains) or NBA (*Yersinia enterocolitica* strains) agar and plated onto appropriate prepoured TSA or NBA plates supplemented with 200 μ M 2,2'-Dipyridyl. Sterile filter-paper disks were loaded with 10 μ l of cultures of different strains previously grown in TSC-1 (*P. damsela* subsp. *piscicida*) or NB (*Yersinia enterocolitica*) supplemented with 60 and 100 μ M 2,2'-Dipyridyl, respectively, to induce siderophore production. In addition, disks loaded with 10 μ l of yersiniabactin (0.1 mg ml⁻¹) were also tested. Results were annotated as positive or negative after 24 h of incubation.

Nucleotide sequence accession number

The DNA sequences determined in this study have been submitted to the EMBL database under Accession number AJ699306.

Acknowledgements

We thank J. Heesemann and A. Rakin for providing *Y. enterocolitica* strains.

This work was supported by grant AGL2003-00086 from the Ministry of Science and Technology of Spain (grants cofunded by the FEDER Programme from the European Union), and grant PGIDIT04PXIC23501PN from Xunta de Galicia to M.L.L. S.J.R also thanks the Spanish Ministry of Science and Technology for a Predoctoral Fellowship.

References

- Bach, S., de Almeida, A., and Carniel, E. (2000) The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol Lett* **183**: 289-294.
- Brem, D., Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C.A., and Heesemann, J. (2001) Functional analysis of yersiniabactin transport genes of *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology* **147**: 1115-1127.
- Buchrieser, C., Brosch, R., Bach, S., Guiyoule, A., and Carniel, E. (1998) The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal asn tRNA genes. *Mol Microbiol* **30**: 965-978.
- Buck, J.D., Overstrom, N.A., Patton, G.W., Anderson, H.F., and Gorzelany, J.F. (1991) Bacteria associated with stranded cetaceans from the northeast USA and southwest Florida Gulf coasts. *Dis Aquat Org* **10**:147-152
- Crosa, J.H. (1989) Genetics and molecular biology of siderophore mediated iron transport in bacteria. *Microbiol Rev* **53**: 517-530.
- Di Lorenzo, M., Stork, M., Tolmasky, M. E., Actis, L. A., Farrell, D., Welch, T. J., Crosa, L. M., Wertheimer, A. M., Chen, Q., Salinas, P., Waldbeser, L., and Crosa, J. H. (2003) Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain 775. *J Bacteriol* **185**: 5822-5830.
- Drechsel, H., Stephan, H., Lotz, R., Haag, H., Zahner, H., Hantke, K., and Jung, G. (1995) Structural elucidation of yersiniabactin, a siderophore from highly virulent *Yersinia* strains. *Liebigs Ann* **10**: 1727-1733.
- Faraldo-Gómez, J., and Sanson, M.S.P. (2003) Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nat Rev* **4**: 105-116.
- Farrell, D.H., Mikesell, P., Actis, L.A., and Crosa, J.H. (1990) A regulatory gene, *angR*,

- of the iron uptake system of *Vibrio anguillarum*: similarity with phage P22 cro and regulation by iron. *Gene* **86**: 45-51.
- Fernández, L., Márquez, I., and Guijarro, J.A. (2004) Identification of specific in vivo-induced (*ivi*) genes in *Yersinia ruckery* and analysis of ruckerbactin, a catecholate siderophore iron acquisition system. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5199-5207.
- Fouz, B., Conchas, R.F., Magariños, B., Amaro, C., and Toranzo, A.E. (1992) *Vibrio damsela* strain virulence for fish and mammals. *FHS/AFS Newslett* **20**: 3-4.
- Fouz, B., Biosca, E.G., and Amaro, C. (1997) High affinity iron-uptake systems in *Vibrio damsela*: role in the acquisition of iron from transferrin. *J Appl Microbiol* **82**: 157-167.
- Fraser, S.L., Purcell, B.K., Delgado, B. Jr., Baker, A.E., and Whelen, A.C. (1997) Rapidly fatal infection due to *Photobacterium (Vibrio) damsela*. *Clin Infect Dis* **25**: 935-936.
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J.L., Gauthier, M., and Christen, R. (1995) Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb.nov. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 139-144.
- Genco, C.A., and Dixon, D.W. (2001) Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol* **39**: 1-11.
- Goodell, K.H., Jordan, M.R., Graham, R., Cassidy, C., and Nasraway, S.A. (2004) Rapidly advancing necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium (Vibrio) damsela*: a hyperaggressive variant. *Crit Care Med* **32**: 278-81.
- Gophna, U., Oelschlaeger, T.A., Hacker, J., and Ron, E.Z. (2001) *Yersinia* HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts. *FEMS Microbiol*

Lett **196**: 57-60.

- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**: 95-98.
- Hantke, K. (1987) Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol Gen Genet* **210**: 135-139.
- Lee, B.C. (1995) Quelling the red menace: haem capture by bacteria. *Mol Microbiol* **18**: 383-390.
- Lesic, B., and Carniel, E. (2005) Horizontal transfer of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* **187**: 3352-3358.
- Magariños, B., Santos, Y., Romalde, J.L., Rivas, C., Barja, J.L., and Toranzo, A.E. (1992) Pathogenic activities of the live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *J Gen Microbiol* **138**: 2491-2498.
- Magariños, B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Barja, J.L., and Toranzo, A.E. (1994) Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2990-2998.
- Magariños, B., Toranzo, A.E., and Romalde, J.L. (1996a) Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annu Rev Fish Dis* **6**: 41-64.
- Magariños, B., Bonet, R., Romalde, J.L., Martínez, M.J., Congregado, F., and Toranzo, A.E. (1996b) Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microb Pathog* **21**: 289-297.
- Magariños, B., Toranzo, A.E., Barja, J.L., and Romalde, J.L. (2000) Existence of two geographically-linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium*

damselae subsp. *piscicida* evidenced by random amplified polymorphic DNA analysis. *Epidemiol Infect* **125**: 213-219.

- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M., and Iida, T. (2003) Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* **361**: 743-749.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., and Mootz, H.D. (1997) Modular peptide synthetases involved in non-ribosomal peptide synthesis. *Chem Rev* **97**: 2651-2673.
- Michel, L., González, N., Jagdeep, S., Nguyen-Ngoc, T., and Reimann, C. (2005) PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Mol Microbiol* **58**: 495-509.
- Mouriño, S., Osorio, C.R., and Lemos, M.L. (2004) Characterization of the heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **186**: 6159-6167.
- Olsson, C., Olofsson, T., Ahrné, S., and Molin, G. (2003) The *Yersinia* HPI is present in *Serratia liquefaciens* isolated from meat. *Lett Appl Microbiol* **37**: 275-280.
- Osorio, C.R., Romalde, J.L., Barja, J.L., and Toranzo, A.E. (2000) Presence of Phospholipase-D (*dly*) gene coding for damselysin production is not a pre-requisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Microb Pathog* **28**: 119-126.
- Osorio, C.R., and Lemos, M.L. (2002) Haeme iron acquisition mechanisms in *Vibrionaceae*. In S.G. Pandalai (ed.), Recent Research Developments in Microbiology, vol. 6. Research Signpost, Kerala, India. pp. 419-436
- Osorio, C.R., Lemos, M.L., and Braun, V. (2004) Identification of Fur regulated genes

in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* using the Fur titration assay. *Biometals* **17**: 725-733.

Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C.A., Schubert, S., and Heesemann, J. (1998). The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J Bacteriol.* **180**: 538-546.

Pelludat, C., Brem, D., and Heesemann, J. (2003). Irp9, encoded by the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*, is able to convert chorismate into salicylate, the precursor of the siderophore yersiniabactin. *J Bacteriol.* **185**: 5648-5653.

Rakin, A., Noelting, C., Schropp, P., and Heesemann, J. (2001) Integrative module of the high-pathogenicity island of *Yersinia*. *Mol Microbiol* **39**: 407-415.

Ratledge, C., and Dover, L.G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**: 881-941.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E., and Heesemann, J. (1998) Prevalence of the "High Pathogenicity Island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun* **66**: 480-485.

Schubert, S., Cuenca, S., Fischer, D., and Heesemann, J. (2000) High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. *J Infect Dis* **182**: 1268-1271.

Schubert, S., Picard, B., Gouriou, S., Heesemann, J., and Denamur, E. (2002) *Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Infect Immun* **70**: 5335-5337.

Schwarzer, D., Finking, R., and Marahiel, M.A. (2003) Nonribosomal peptides: from

genes to products. *Nat Prod Rep* **20**: 275-287.

Schwyn, B., and Neilands, J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**: 47-56.

Stachelhaus, T., Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**: 493-505.

Tanabe, T., Takata, N., Naka, A., Moon Y.H., Nakao, H., Inoue, Y., Narimatsu, S., and Yamamoto, S. (2005) Identification of an AraC-like regulator gene required for induction of the 78-kDa ferrioxamine B receptor in *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett* **249**: 309-314.

Thune, R.L., Fernández, D.H., Hawke, J.P., and Miller, R. (2003) Construction of a safe, stable, efficacious vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Dis Aquat Org* **57**: 51-58.

Touati, D. (2000) Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* **373**: 1-6.

Vezzi, A., Campanaro, S., D'Angelo, M., Simonato, F., Vitulo, N., Lauro, F.M., Cestaro, A., Malacrida, G., Simionati, B., Cannata, N., Romualdi, C., Bartlett, D.H., Valle, G. (2005) Life at depth: *Photobacterium profundum* genome sequence and expression analysis. *Science* **307**: 1459-1461.

Wang, R.F., and Kushner, S.R. (1991) Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing, and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**: 195-199.

Wyckoff, E.E., Stoeckner, J.A., Reed, K.E., and Payne, S.M. (1997) Cloning of a *Vibrio cholerae* vibriobactin gene cluster: identification of genes required for early steps in siderophore biosynthesis. *J Bacteriol* **179**: 7055-7062.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Total membrane proteins purified from *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21, *P. damsela* subsp. *damsela* RM71 and *P. damsela* subsp. *piscicida* CS31 mutant, under conditions of iron excess (Fe+) and iron limitation (Fe-).

Fig. 2- A Physical map of the siderophore biosynthesis and transport gene cluster of *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21, and primer design for RT-PCR operon mapping. Open reading frames are depicted as arrows, which indicate the direction of transcription. RT-1, RT-2 and RT-3 are the primers used in reverse transcription. Arrow pairs located on top of A, B and C letters denote primer pairs used in the subsequent PCR reactions. Predicted Fur boxes identified in *dahP* and *araC2* putative promoters are shown. **B** Results of PCR amplifications carried out with primer pairs A, B and C using as template the products of RT reactions obtained with primers RT-1, RT-2 and RT-3. M is the molecular mass marker (100 bp). Positive and negative controls are indicated.

Fig. 3- A Phenotype of CS31 mutant (irp1-) and DI21-Rif parental strain on CAS agar plates. **B** Growth of CS31 mutant (irp1-) and DI21-Rif parental strain under iron-limiting conditions.

Fig. 4 Results of Southern hybridisation for screening of the presence of *dahP*, *araC1*, *frpA*, *irp2*, *irp1*, *irp9* and *irp5* genes, using *Hind*III-digested chromosomal DNA from a collection of *P. damsela* strains. Lanes 1-12, *P. damsela* subsp. *piscicida* strains DI21, B51, ATCC 17911, 10831, ATCC29690, 666.1, 10831, MP-7801, EPOY 8803-II, MZS-8001, PC554.2, PC435.1, ATLIT 2. Lanes 13-19, *P. damsela* subsp. *damsela*

strains RM-71, ATCC 33539, ATCC 35083, CDC 2227-81, RG-214, LD-07, 158. M, molecular size marker.

Fig. 5 Comparative analysis of gene arrangement in the *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 siderophore biosynthesis and transport gene cluster, and related clusters in *Yersinia enterocolitica* HPI, *Photobacterium profundum* and *Vibrio cholerae* RC385.

Fig. 6 Schematic representation of the functional domains predicted for the *P. damsela* subsp. *piscicida* Irp5, Irp2 and Irp1 proteins.

Table 1. Proteins with homology to products of *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 genes of the siderophore biosynthesis cluster described in this study.

<i>P.damsela</i> protein (Size in a.a.)	EMBL/GenBank Ac no	Identity	Similarity
DAHPh-synthase (354)			
<i>Vibrio vulnificus</i> DAHP synthase	Q8D5S3	54	68
<i>Escherichia coli</i> Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	Q8FIY4	51	67
<i>V. cholerae</i> phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	Q9KRX6	50	64
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	Q66A12	53	68
AraC1 (327)			
<i>Photobacterium profundum</i> hypothetical transcriptional regulator, AraC family	Q6LRJ3	59	75
<i>V. cholerae</i> RC385 AraC-type protein	ZP_00753343	58	77
<i>Ralstonia solanacearum</i> probable transcription regulator	Q8XEY5	35*	56*
<i>Pseudomonas syringae</i> transcriptional regulator, AraC family.	Q882M0	35*	61*
AraC2 (323)			
<i>P.profundum</i> hypothetical transcriptional regulator, AraC family	Q6LRJ4	63	77
<i>V. cholerae</i> RC385 AraC-type DNA-binding domain-containing protein	ZP_00753342	60	77
<i>Bacteroides fragilis</i> putative AraC family transcriptional regulatory protein	Q5LHP7	41*	61*
<i>Synechocystis</i> sp. regulatory protein PcrR	P72600	36*	59*
FrdA (660)			
<i>P. profundum</i> hypothetical outer membrane receptor	Q6LRJ5Q6LRJ5	65	81
<i>V. cholerae</i> RC385 outer membrane receptor protein	ZP_00753341	65	81
<i>Photobacterium luminescens</i> putative ferrisiderophore receptor FyuA	Q7N4L5	40	60
<i>Y. pestis</i> yersiniabactin receptor	Q8CZU1	26	46
<i>Ps. fluorescens</i> quinolobactin receptor	Q84HG2	25	42
Irp8 (412)			
<i>P. profundum</i> hypothetical protein	Q6LRJ6	57	75
<i>V. cholerae</i> RC385 putative permease of the major facilitator superfamily	ZP_00753340	57	74
<i>Photobacterium luminescens</i> hypothetical protein	Q7N4L4	41	61
<i>E. coli</i> putative cytoplasmic transmembrane protein.	Q8FGF7	35	52
<i>Y. pestis</i> YbtX	Q7BS85	35	52
Irp2 (1979)			
<i>P. profundum</i> hypothetical non-ribosomal peptide synthetase	Q6LRJ7	55	70
<i>V. cholerae</i> RC385 non-ribosomal peptide synthetase	ZP_00753339	56	70
<i>P. luminescens</i> HMWP2-like protein	Q7N4L1	47	63
<i>Ps. syringae</i> yersiniabactin non-ribosomal peptide synthetase	Q48HQ4	47	61
<i>Y. pestis</i> yersiniabactin biosynthetic protein Irp2	Q9Z399	45	61
<i>Y. enterocolitica</i> yersiniabactin biosynthetic protein HMWP2	P48633	45	61
Irp1 (3996)			
<i>P. profundum</i> putative Beta-ketoacyl synthase	Q6LRJ8	50	67
<i>V. cholerae</i> RC385 polyketide synthase	ZP_00753338	52	66
<i>P. luminescens</i> HMWP1-like protein	Q7N4L0	45	60
<i>Ps. syringae</i> yersiniabactin polyketide/non-ribosomal peptide synthetase	Q882M6	51	64
<i>Y. pestis</i> yersiniabactin biosynthetic protein Irp1	Q3V8D5	50	63
<i>Y. enterocolitica</i> HMWP1		49	62
Irp3 (361)			
<i>V. cholerae</i> RC385, oxidoreductase	ZP_00753422	61	74
<i>P. profundum</i> putative reductase component	Q6LRK0	59	76
<i>Ps. syringae</i> yersiniabactin synthetase, thiazolanyl reductase component	Q882M7	44	62
<i>Y. pestis</i> thiazolanyl-S-HMWP1 reductase (YbtU).	Q8D0C4	43	59
<i>Y. pseudotuberculosis</i> yersiniabactin biosynthetic protein YbtU.	Q3V7P7	43	59
Irp4 (233)			
<i>P. profundum</i> hypothetical thioesterase	Q6LRK1	60	77

<i>V. cholerae</i> RC385 predicted thioesterase	ZP_00753421	53	62
<i>P. luminescens</i> hypothetical protein similar to <i>Yersinia enterocolitica</i> Irp4	Q7N4K8	50	62
<i>Ps. syringae</i> yersiniabactin synthetase, thioesterase component	Q882M8	45	57
<i>Y. pestis</i> yersiniabactin biosynthetic protein YbtT	Q7BS79	43	56
<i>V. anguillarum</i> thioesterase for anguibactin biosynthesis	Q79JZ0	36	53
Irp9 (480)			
<i>P. profundum</i> hypothetical anthranilate synthase	Q6LRK2	64	76
<i>V. cholerae</i> Rc385 anthranilate/para-aminobenzoate synthases component	ZP_00753420	61	72
<i>P. luminescens</i> hypothetical protein	Q7N4K7	45	62
<i>Streptomyces coelicolor</i> putative lyase	Q9EWN6	41	54
<i>Desulfotobacterium hafniense</i> Anthranilate synthase	Q429X2	39	57
<i>Nocardia farcinica</i> Putative hydroxybenzoate synthase	Q5Z277	38	57
<i>Y. pestis</i> YbtS protein (Anthranilate synthase; Putative salicylate synthetase, Irp9)	Q9Z396	39	53
<i>M. tuberculosis</i> putative isochorismate synthase MBTI	Q7D785	37	54
Irp5 (532)			
<i>V. cholerae</i> RC385 peptide arylation enzyme	Q6LRK3	60	78
<i>P. profundum</i> putative peptide arylation enzyme	Q7MCT0	60	74
<i>V. vulnificus</i> vulnibactin-specific 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase	Q5Z276	49	64
<i>Nocardia farcinica</i> putative hydroxybenzoate-AMP ligase	P71716	46	61
<i>M. tuberculosis</i> salicyl-AMP ligase	Q07899	44	60
<i>V. cholerae</i> vibriobactin-specific 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase	Q56950	46	62
<i>Y. pestis</i> salicyl-AMP ligase YbtE	Q56950	46	62

Table 2. Results of the bioassays performed with different strains and with purified yersiniabactin.

Tester	Ability to cross-feed			
	<i>P. damsela</i> s. <i>piscicida</i>		<i>Y. enterocolitica</i>	
	DI21	CS31	WA <i>f</i> _{yu} A2	WA-CS irp1
Yersiniabactin	+	+	-	+
DI21	+	+	-	+
CS31	-	-	-	-
WA <i>f</i> _{yu} A2	+	+	-	+
WA-CS irp1::Kanr	-	-	-	-

Table 3.-Prediction of the substrate specificity of A-domains in Irp1, Irp2 and Irp5 proteins of *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21, according to the nonribosomal code, and comparative alignment with A-domains described in *Y. enterocolitica* HMWP2, *V. anguillarum* AngR, *B. brevis* GrsA (Gramicidine S synthetase), and *E. coli* EntF and EntE. Cys: cysteine; Sal: salicylate; Phe: phenylalanine; Ser: seryne; Dhb: 2,3-dihydrobenzoate.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Protein	135	236	239	278	299	301	322	330	331	517	Domain
Irp2	D	L	Y	N	L	S	M	I	W	K	Cys
Irp1	D	L	F	N	M	S	L	I	W	K	Cys
Irp5	N	F	C	A	Q	G	V	I	C		Sal
HMWP2	D	L	Y	N	N	S	M	I	W	K	Cys
GrsA	D	A	W	T	I	A	A	V	C	K	Phe
AngR	D	L	Y	N	M	S	M	I	W	K	Cys
EntE	D	L	E	H	N	T	Y	V	S	K	Ser
EntF	D	V	W	H	L	S	L	I	D	K	Dhb/Sal

Table 4.- Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic*	Source/Reference
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>		
DI21	Highly virulent	Seabream, Spain
DI21-Rif	DI21 derivative, spontaneous rifampicin-resistant mutant	This study
PC554.2	Highly virulent	Sole, Spain
PC435.1	Highly virulent	Sole, Spain
10831	Highly virulent	<i>Dicentrarchus labrax</i> , France
IT-1	Highly virulent	Seabream, Italy
MP-7801	Highly virulent	Yellowtail, Japan
MZS-8001	Highly virulent	Yellowtail, Japan
ATCC17911	Moderately virulent	White perch, USA
ATCC29690	Avirulent	Yellowtail, Japan
EPOY 8803-II	Avirulent	Red grouper, Japan
ATLIT 2	ND	<i>Morone</i> sp., Israel
666.1	ND	Seabass, Portugal
B51	ND	Seabream, Spain
CS31	DI21 with the suicide plasmid pSJR52 inserted in the chromosome	This study
<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>		
RM-71	Highly virulent	Turbot, Spain
CDC-2227-81	Highly virulent	Human, USA
RG-153	Highly virulent	Turbot, Spain
RG-214	Highly virulent	Turbot, Spain
ATCC33539	Moderately virulent	Damselfish, USA
LD-07	Moderately virulent	Seabream, Spain
ATCC35083	Avirulent	Brown shark, USA
158	Avirulent	European eel, Belgium
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	Cloning strain	Laboratory stock
S17-1 λ pir	<i>Tpr Smr recA, thi, pro, hsdR-M+RP4; 2-Tc:Mu: Km Tn7 λpir</i>	Herrero <i>et al.</i> , 1990
H1717	<i>araD139 AlacU169 rspL150 relA1 flb5301 deoC1 ptsF25 rbsR aroB fhuF::λ placMu</i>	Hantke 1987
<i>Yersinia enterocolitica</i>		
WA <i>fyuA2</i>	<i>fyuA</i> mutant	Brem <i>et al.</i> , 2001
WA-CS <i>irp1::Kan^r</i>	<i>irp1</i> mutant	Pelludat <i>et al.</i> , 1998
Plasmids		
pGEMT-Easy	PCR cloning vector, Ap ^r	Promega
pWKS30	Low-copy-number plasmid vector, Ap ^r	Wang and Kushner 1991
pNidKan	Suicide vector, derived from pCVD442, Km ^r	Mouriño <i>et al.</i> , 2004
pSJR52	A 4672-bp <i>EcoRI-XbaI</i> fragment including the 3'-end of <i>irp2</i> and the 5'-end of <i>irp1</i> , cloned into pNidKan	This study

*Virulence data for fish obtained from Magariños *et al.*, 1992; Osorio *et al.*, 2000.

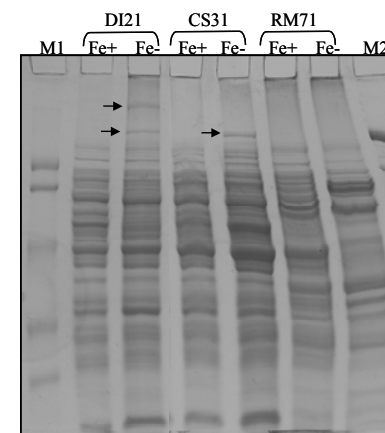


Figure 1

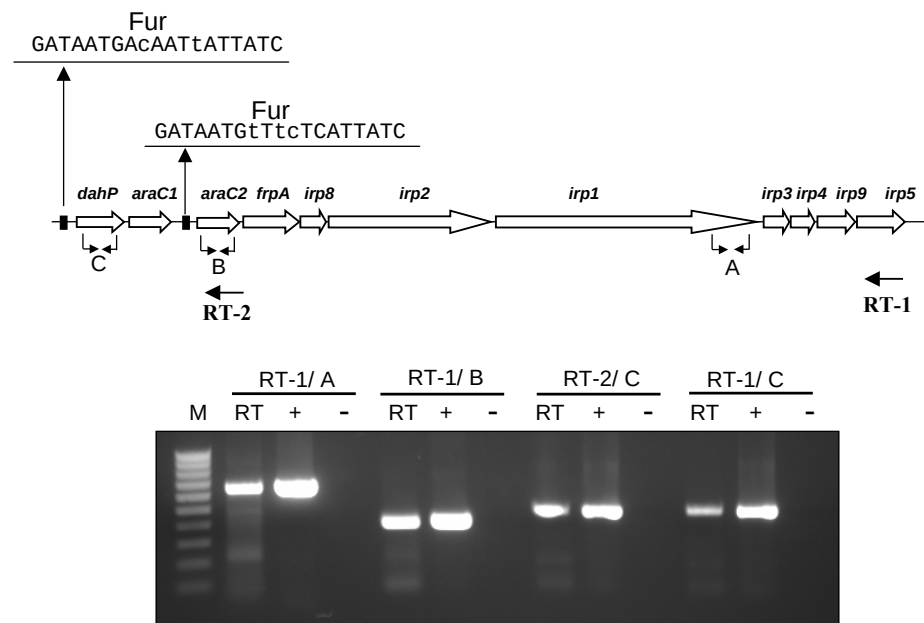
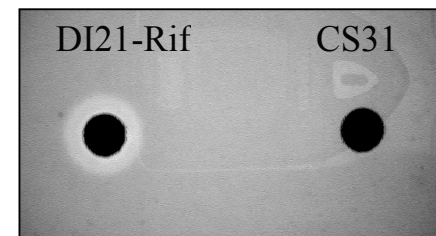
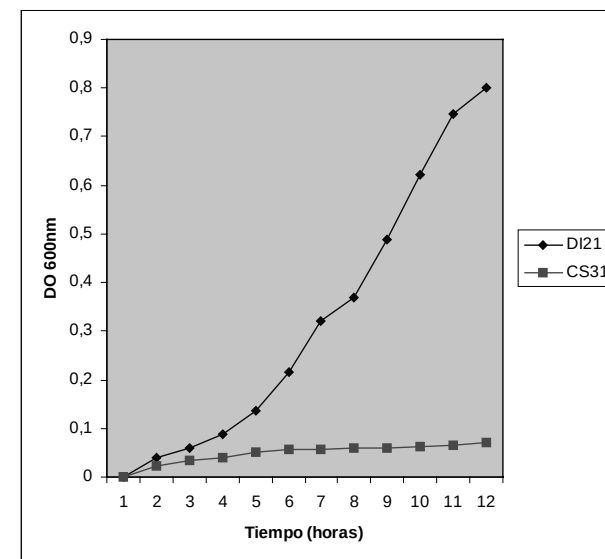


Figure 2

A



B



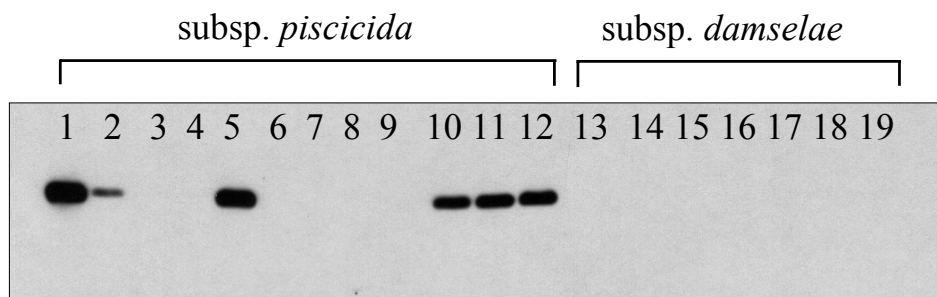
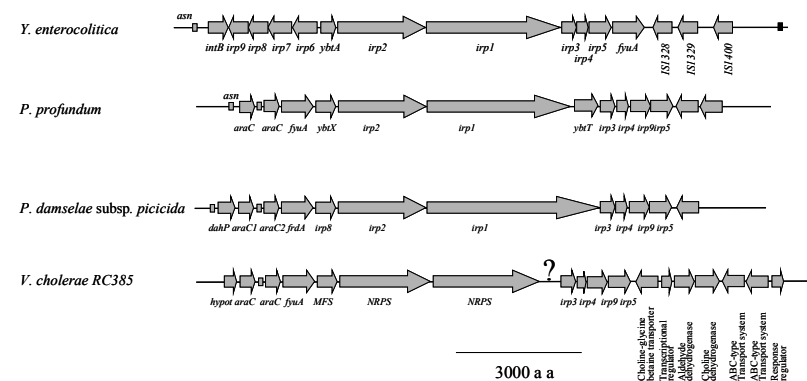


Figure 4



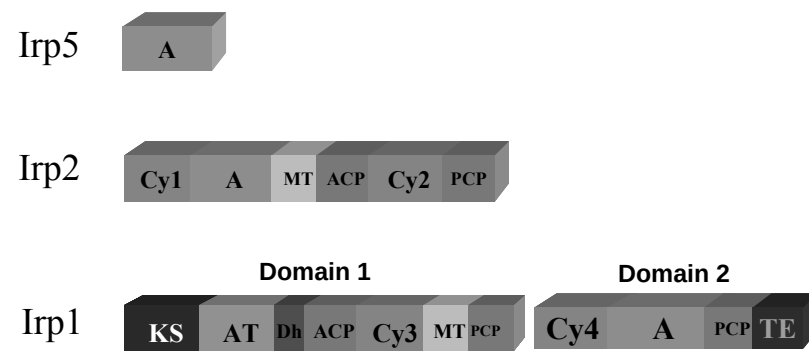


Figure 6

