Departamento de Microbiología y Parasitología

Instituto de Acuicultura-Facultad de Biología

Universidad de Santiago de Compostela

Diversidad de los sistemas de adquisición de hierro mediante sideróforos en *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*

Memoria que presenta

Beatriz Puentes Corral

Para optar al Grado de Doctora en Biología

Santiago de Compostela, Mayo 2015

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía

Facultade de Bioloxía e Instituto de Acuicultura

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

Carlos Rodríguez Osorio, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMAN: Que la presente Tesis Doctoral titulada "Diversidad de los sistemas de adquisición de hierro mediante sideróforos en *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*" que presenta ***Dña. Beatriz Puentes Corral*** 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 20 de mayo de 2015.

Fdo.: Dr. Manuel L. Lemos Ramos

Fdo.: Dr. Carlos Rodríguez Osorio

La doctoranda,

Fdo.: Beatriz Puentes Corral

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Financiación recibida:

El trabajo descrito en esta memoria ha sido financiado con los siguientes proyectos:

- Proyectos AGL2009-12266-C02-01 y Consolíder Aquagenomics CSD2007-00002 del Ministerio de Ciencia e Innovación, cofinanciados con fondos FEDER de la UE.
- Proyecto AGL2012-39274-C02-01 del Ministerio de Economía y Competitividad, cofinanciado con fondos FEDER de la UE.
- Proyecto EM2012/043 de la Xunta de Galicia.

Durante su realización la autora ha disfrutado de una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación, asignada al proyecto con referencia AGL2009-12266-C02-01.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Resumen:

Photobacterium damselae subsp. *damselae* es una bacteria Gram-negativa, de la familia *Vibrionaceae*, que causa un tipo de vibriosis en una amplia variedad de especies marinas, y puede afectar también a animales homeotermos. El hierro desempeña un papel fundamental en el metabolismo y la virulencia de esta bacteria, pero los mecanismos que utiliza para su adquisición, y especialmente los basados en la síntesis de sideróforos, son todavía en gran medida desconocidos. Por tanto, en este trabajo nos propusimos como objetivo principal desentrañar la base genética de la síntesis y transporte de sideróforos en esta bacteria, así como aportar los datos biológicos necesarios para la determinación de su naturaleza química.

Los resultados obtenidos indican que en *P. damselae* subsp*. damselae* existe una variabilidad entre las diferentes cepas con respecto a la capacidad de crecimiento en déficit de hierro, pudiendo clasificarlas, de mayor a menor capacidad de crecimiento y producción de sideróforos, en tres grupos: tipo A, tipo B y tipo C. El trabajo descrito en esta memoria permite explicar este comportamiento en base a diferentes mecanismos de adquisición de hierro, basados en sideróforos. Así, mediante estudios de proteómica y secuenciación de ADN demostramos que las cepas de tipo A han adquirido por transferencia horizontal una isla genómica que contiene todos los genes de síntesis y transporte del sideróforo vibrioferrina organizados en dos operones: *pvsABCDE* (síntesis) y *psuA-pvuABCDE* (transporte). Los análisis químicos y los bioensayos realizados demuestran que estos genes son activos y que la vibrioferrina está presente en los cultivos de las cepas de tipo A. Sin embargo, los experimentos de mutagénesis demuestran que cuando se interrumpe la síntesis de vibrioferrina (por mutación del gen *pvsD*) la cepa mutante mantiene, aunque en menor medida, la capacidad de crecer en condiciones de limitación de hierro y de producir sideróforos, mostrando valores equivalentes a los de las cepas de tipo B. Todo ello sugiere que las cepas tipo A sintetizan dos sideróforos, la vibrioferrina y un segundo sideróforo común con las cepas tipo B.

Para identificar la base genética de este sideróforo común se han seguido diferentes estrategias: búsquedas *in silico* de posibles genes relacionados con la síntesis y transporte de sideróforos, genómica comparada de los tres tipos de cepas y mutagénesis por transposición. Con ninguna de estas estrategias se ha logrado identificar de forma concluyente las secuencias génicas que podrían codificar este sistema de adquisición de hierro, por lo que se dedujo que probablemente los genes biosintéticos estarían relacionados con la síntesis de metabolitos esenciales, y que pasarían por tanto desapercibidos en las estrategias de búsqueda utilizadas.

Puesto que todas las cepas pudieron utilizar citrato férrico como única fuente de hierro y que se demostró que tanto las cepas de tipo B, como el mutante de las de tipo A deficientes en la síntesis de vibrioferrina, acumulan una notable cantidad de citrato en el medio cuando crecen en déficit de hierro, se llegó a la conclusión de que probablemente el citrato, o una molécula que lo contenga, sea el sideróforo común a todas las cepas. Esta hipótesis viene apoyada por el hecho de que en las cepas de tipo A se reprime la acumulación de citrato cuando sintetizan vibrioferrina, y porque se logró demostrar la presencia de citrato en una fracción activa procedente de cultivos en déficit de hierro.

Los resultados de infecciones experimentales indican que la síntesis de vibrioferrina no parece proporcionar una mayor virulencia para rodaballo a las cepas tipo A. Posiblemente la adquisición de este sistema de asimilación de hierro podría proporcionar otras ventajas de tipo ecológico. Así, las cepas de tipo A sintetizarían el sideróforo común basado en citrato cuando se encuentran dentro del hospedador y, en cambio, sintetizarían vibrioferrina de forma preferente cuando se encuentran compartiendo nichos marinos con otros vibrios.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Agradecimientos:

Quería aprovechar este espacio para dar las gracias a todas aquellas personas que directa o indirectamente han ayudado en la realización de este trabajo:

A mis directores de tesis: Manuel Lemos Ramos y Carlos Rodríguez Osorio, gracias por su confianza y disposición, han sido una gran ayuda en mi formación.

A mis compañeros de trabajo, muchos de ellos ahora grandes amigos: A Arturo, por sus ideas locas y su filosofía de vida (un gran apoyo en estos años); a Amable, por su entusiasmo con los pequeños avances; a Miguel, por su aguante y sus conocimientos (esta tesis no sería la misma sin él); a Sol, por su ayuda no sólo laboral; a Mateus, a las compañeras de viro María y Sandra, y en especial a Ana, por su alegría, paciencia y generosidad, una excelente compañera de trabajo y congresos.

A mis amigos "Los Nice", por nuestras reuniones cuando necesitaba un momento de relax, por los grandes momentos que hemos pasado juntos y porque con vosotros lo malo se hace pequeño y lo bueno enorme, en especial a Yisus, Angy, Vero y Toxín. A mis amigos de siempre Marcos y Lucía, por estar ahí aunque haya distancia entre nosotros.

Por último los más importantes mi familia: A mi madre, por su honestidad, fortaleza y por esos consejos que siempre son acertados; a mi padre, por su nobleza, paciencia y por ser el artista de la preciosa portada de este trabajo, y a mi hermana, por ser ese gran apoyo en mi vida que me ayuda a seguir adelante.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Abreviaturas:

A: Absorbancia

Amp: Ampicilina

CAS: Cromo Azurol S

CBB: Azul brillante de Coomassie

DHBA: Ácido 2,3-dihidroxi-benzoico

CM9: Medio mínimo M9 de Miller suplementado con Casaminoácidos al 0,2%

CMI: Concentración mínima inhibitoria

Dipiridil: 2,2´-dipiridil

DMSO: Dimetil-sulfóxido

DO: Densidad Óptica

DTT: Ditiotreitol

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

IEF: Isoelectroenfoque

IPA: Isla de Patogenicidad

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido

Kan: Kanamicina

LB: Medio Luria Bertani

MALDI-TOF: Espectrometría de masas con ionización por desorción por láser asistida por matriz, con detección por tiempo de vuelo

NIS: Sistema independiente de NRPS

NRPS: Sintetasa de péptidos no ribosómicos

MS: Espectrometría de masas

ORF: Pauta de lectura abierta

pI: Punto isoeléctrico

Rif: Rifampicina

SDS: Dodecil Sulfato Sódico

TBDT: Transportador dependiente de TonB

TFA: Ácido tri-fluoro-acético

Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano

TSA-1: Agar de Soja y Triptona + 1% NaCl

TSC-1: Caldo de Soja y Triptona + 1% NaCl

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranósido

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

I.INTRODUCCIÓN

Prefacio: Importancia de la acuicultura **7**

1. *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* **8**

1.1. Características morfológicas y bioquímicas 8

1.2. Posición taxonómica 10

1.3. *P. damselae* subsp. *damselae* como patógeno de animales poiquilotermos y homeotermos 11

2. Factores de virulencia **16**

2.1 Colonización e invasión 16

2.2 Factores agresivos que provocan daño en el hospedador 18

2.3 Elementos genéticos móviles: Islas genéticas 20

3. Importancia del hierro en las infecciones bacterianas **22**

3.1 Biodisponibilidad del hierro 22

3.2 Disponibilidad del hierro en el hospedador 22

3.3 Sistemas de captación de hierro en las bacterias 23

4. Asimilación de hierro basada en la síntesis de sideróforos **26**

4.1 Sideróforos 26

4.2 Síntesis de sideróforos 28

4.3 Transporte de los sideróforos 31

4.4 El hierro en el citoplasma bacteriano 36

5. Homeostasis del hierro y regulación transcripcional **37**

5.1 Regulación transcripcional mediante la proteína Fur 37

5.2 Genes regulados por Fur 38

6. Mecanismos de asimilación del hierro en *Photobacterium damselae* **40**

II. OBJETIVOS **45**

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo **49**

2. Purificación de ADN **52**

3. Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) **52**

4. Clonación de fragmentos de ADN **53**

5. Transformación por electroporación **54**

6. Obtención de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina **55**

7. Mutagénesis por intercambio alélico **55**

8. Ensayos de crecimiento en condiciones de limitación de hierro y producción de sideróforos **60**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9. Bioensayos de alimentación cruzada **62**

10. Proteómica **63**

10.1 Extracción de proteínas totales 64

10.2 Separación de proteínas por electroforesis bidimensional 64

10.2.1 Primera dimensión 64

10.2.2 Segunda dimensión 65

10.3 Análisis de los spots 66

11. Obtención de genoteca de cósmidos **67**

12. Secuenciación de ADN y herramientas de bioinformática **68**

13. Mutagénesis por transposición del mini-Tn*10* **69**

13.1 Clonación y secuenciación de las zonas que flanquean el transposón Tn*10* 70

14. Ensayos de virulencia en rodaballo **70**

15. Determinación de la estructura química del sideróforo **71**

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Crecimiento en condiciones de déficit de hierro: existencia de 3 tipos de cepas de *P. damsela*e subsp. *damselae* **75**

2. Genética y bioquímica de la síntesis de sideróforos en cepas tipo A: producción de vibrioferrina. **80**

2.1. Estudio proteómico de la respuesta de la cepa RG91 frente a la disponibilidad de hierro 80

2.1.1. Proteínas hierro-reprimidas 86

2.1.2. Proteínas hierro inducidas 94

2.2. Las cepas tipo A sintetizan vibrioferrina como sideróforo 96

2.2.1. Detección de vibrioferrina en la cepa RG91 97

2.2.2. Identificación de la región genómica que codifica la síntesis y transporte de vibrioferrina 98

2.2.3. Distribución de los genes de síntesis y transporte y la producción de vibrioferrina en cepas de *P. damselae* subsp. *damselae*. 106

2.2.4. El gen *pvsD* es responsable de la biosíntesis de vibrioferrina 112

2.2.5. La vibrioferrina podría ser transportada por más de un receptor en la cepa RG91 115

2.3. Los genes de la vibrioferrina forman parte de una isla genómica 116

2.3.1. Inserción de la isla genómica en la cepa RG91, con respecto a la cepa tipo ATCC33539 117

2.3.2. Predicción de ORFs y estudios de homología 122

2.3.3. Distribución de la isla de patogenicidad en las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* 125

2.4 Virulencia de las cepas de tipo A 128

3. Análisis de la base genética de la producción de sideróforos en la cepa tipo B (RM71) de *P. damselae* subsp*. damselae* **130**

3.1 Evidencias de un sideróforo común en la subespecie *damselae* 130

3.2 Búsqueda de genes candidatos relacionados con síntesis y transporte de sideróforos en RM71 132

3.2.1 Análisis funcional de genes posiblemente relacionados con la biosíntesis de sideróforos 135

3.2.2 Análisis funcional de genes relacionados con el transporte 136

3.3 Estudio de una colección de mutantes por transposición en la cepa RM71 142

3.3.1 Obtención de mutantes por transposición mini-Tn*10* 143

3.3.2 Crecimiento en déficit de hierro de los mutantes 144

3.3.3. Análisis de los genes inactivados en mutantes por inserción de mini Tn*10* 145

3.4. Comparación de genomas de las cepas ATCC33539, RG91 y RM71 148

3.5. Evidencias de un sideróforo basado en citrato en *P. damselae* subsp*. damselae* 154

V. CONCLUSIONES **175**

VI. BIBLIOGRAFÍA **181**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

I. INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Prefacio: Importancia de la acuicultura

Según las últimas estadísticas disponibles recopiladas por la FAO, la producción acuícola mundial alcanzó en 2012 un máximo histórico de 90,4 millones de toneladas (equivalente en peso vivo) con un valor de 144.400 millones de dólares, de los que 66,6 millones de toneladas correspondieron a peces comestibles (137.700 millones de dólares). Según la información más reciente, la FAO calcula que la producción acuícola mundial de peces comestibles aumentó hasta los 70,5 millones de toneladas en 2013. La tendencia mundial es que se incremente cada vez más el peso de la acuicultura en el suministro total de pescado. Así, del total de 158 millones de toneladas de pescado consumido en el mundo en 2012 (incluidos usos no alimentarios), los peces comestibles cultivados supusieron un porcentaje sin precedentes del 42,2%, frente al 13,4% en 1990 y el 25,7% en el año 2000.

Según el Ministerio español de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, en el año 2013 el 94% de la producción acuícola comercial en España correspondió a cultivos de lubina, dorada y rodaballo, que son los principales hospedadores del patógeno *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* (Botella et al., 2002; Fouz et al., 1992), por lo que consideramos que las investigaciones sobre las infecciones producidas por este microorganismo son de un elevado interés aplicado. Esta bacteria será por tanto el objeto de estudio principal de la presente tesis doctoral.

1 *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*

La especie *Photobacterium damselae* está formada por bacterias Gram negativas, que se incluyen dentro de la familia *Vibrionaceae*, perteneciente al subgrupo gamma-3 del Phyllum *Proteobacteria* (Gauthier et al., 1995). Se divide en dos subespecies, *P. damselae* subsp. *damselae y P. damselae* subsp. *piscicida,* antiguamente denominadas *Vibrio damsela* (familia *Vibrionaceae*) y *Pasteurella piscicida* (familia *Pasteurellaceae*), respectivamente. Las dos subespecies presentan amplias diferencias fenotípicas (Tabla I.1), pero tras la secuenciación del ARN ribosómico 16S y ensayos de hibridación ADN-ADN, se consideró que las dos especies podrían encuadrarse en una única especie: *Photobacterium damselae.*

1.1 Características morfológicas y bioquímicas

Morfológicamente las células de *P. damselae* subsp. *damselae* se caracterizan por tener forma bacilar (0,3-0,5 x 1,4-2,6 µm) ligeramente curvada, no ser formadoras de esporas y ser móviles con presencia de un flagelo polar monotrico (Figura I.1). Todos los miembros del género *Photobacterium* son móviles, a excepción de *P. damselae* subsp. *piscicida,* siendo ésta una de las características fenotípicas que diferencian a las dos subespecies (Tabla I.1).

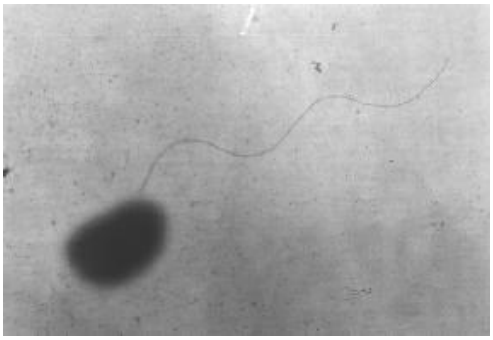

Figura I.1: Fotografía mediante microscopía electrónica de transmisión de *P. damselae* subsp. *damselae.*

Desde el punto de vista bioquímico *P. damselae* subsp. *damselae* se caracteriza por ser una bacteria anaerobia facultativa, oxidasa positiva, crecer en el medio diferencial para vibrios TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa) sin utilización de sacarosa, ser sensible al agente vibriostático 0/129 (2,4–diamino-6,7-diisopropil fosfato de pteridina), ser fermentadora de D-glucosa con producción de gas, fermentadora de manosa y maltosa, positiva para los test rojo de metilo y Voges-Proskauer, y producir ureasa, lipasa, amilasa, quitinasa, fosfolipasa, condroitinasa, hialuronidasa y hemolisinas. Es además positiva para la descarboxilación de arginina y negativa para la

descarboxilación de lisina y ornitina (Figura I.2). Crece en medios con 1% de NaCl, aunque puede tolerar concentraciones de hasta el 5% (Fouz et al., 1992). Presenta unos rangos de temperatura de crecimiento amplios, desde 12 ºC hasta 37 ºC. Como hemos mencionado *P. damselae* subsp. *damselae* tiene diferencias con *P. damselae* subsp. *piscicida* a nivel fenotípico (Tabla I.1), siendo las más destacadas la motilidad flagelar, la hemólisis de eritrocitos de cordero y la capacidad de crecer a 37 ºC, caracteres todos ellos positivos en la subsp. *damselae* y negativos en la subsp. *piscicida*, presentando ésta última un rango de temperatura de crecimiento que oscila entre los 15 y los 30 ºC.

Tabla I.1: Variabilidad fenotípica entre las dos subespecies de *Photobacterium damselae.* Se resaltan en amarillo las diferencias fenotípicas más importantes.

	Photobacterium damselae	
Carácter	**subsp. *piscicida***	**subsp. *damselae***
Movilidad	-	+
Tinción bipolar	+	-
Nitrato reductasa	-	+
Crecimiento en TCBS	-	+
Gas de glucosa	-	+
Ureasa	-	+
Lipasa	-	+
Amilasa	-	+
Crecimiento en 5% de NaCl	-	+
Producción de ácido de Maltosa	-	+
Hemolisis de eritrocitos de:		
cordero	-	+
trucha	+	+
Crecimiento a 37ºC	-	+
Diversidad Serológica	**No**	**Sí**

Figura I.2: Resultado de la identificación bioquímica de *P. damselae* subsp. *damselae* mediante un sistema de identificación rápida API-20E.

Aún a pesar de las homologías encontradas por Smith et al. (1991) y Fouz et al. (1992), en algunos estudios (Fouz et al., 1997) se demuestra la elevada diversidad fenotípica de *P. damselae* subsp. *damselae*, confirmando la presencia de cuatro serogrupos diferentes y distintos patrones de proteínas de membrana con diferencias que oscilaban entre los 20 y 90 kDal. Se encontraron además cepas ureasa-negativas, las

cuales habían sido identificadas como *P. damselae* subsp*. damselae* de acuerdo con el resto de características (reducción de nitritos, gas, lisina descarboxilasa y crecimiento en TCBS), que la diferencian de la subespecie *piscicida* (Tabla I.1) (Thyssen et al., 1998; Botella et al., 2002). Otra de las variabilidades encontradas fue la capacidad de crecer a 4 ºC o a 40 ºC (Botella et al., 2002). También se encuentran controversias en la literatura en cuanto a la actividad amilasa, positiva para Thyssen et al. (1998) y negativa para Smith et al. (1991) y Botella et al. (2002). Esta variabilidad es apoyada por los análisis genéticos realizados mediante diferentes técnicas como AFLP, que dio como resultado 24 perfiles diferentes en 33 cepas analizadas, con un 45% de similitud (Botella et al., 2002) y por estudios posteriores de tipificación basados en técnicas de PCR como RAPD, ERIC-PCR y REP-PCR, las técnicas más utilizadas en estudios epidemiológicos (Labella et al., 2010a).

1.2 Posición taxonómica

Cuando se aisló por primera vez *P. damselae* subsp. *damselae* se asignó al género *Vibrio* (familia *Vibrionaceae*) como *Vibrio damsela* (Love et al., 1981). Posteriormente en 1985 se hizo un estudio filogenético con la secuencia del ARNr 5S de 31 cepas que pertenecían a la familia *Vibrionaceae*, comparándolas con las 11 secuencias de ARNr 5S publicadas, proponiéndose una reestructuración de la familia, y estableciendo el nuevo género *Listonella* en el que se encontrarían *V. damsela* y *V. anguillarum*, que pasarían a denominarse *Listonella damsela* y *L. anguillara* respectivamente. Este estudio creó mucha controversia al no haberse incluido muchas secuencias de ARNr 5S de especies pertenecientes al género *Vibrio* (McDonell et al., 1985). Más tarde, en 1991 *Listonella damsela* fue reasignada al género *Photobacterium* como *Photobacterium damselae,* basándose en estudios comparativos de las características fenotípicas con distintas especies del género *Photobacterium*, como la ausencia de vaina flagelar o la acumulación de PHB (poli-ß-hidroxibutirato) (Smith et al., 1991).

Por otro lado *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* se clasificaba inicialmente dentro del género *Pasteurella* como *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al., 1964). En 1990 estudios filogenéticos de la familia *Pasteurellaceae* ya hablaban de la

posible incorporación de esta especie a la familia *Vibrionaceae* (De Ley et al., 1990), aunque fue Gauthier en 1995 quien incorporó definitivamente *Pasteurella piscicida* a la familia *Vibrionaceae* a partir de un estudio comparativo de la secuencia del ARNr 16S de *Pasteurella piscicida* con secuencias de especies de los géneros *Vibrio* y *Photobacterium*. Gauthier realizó también estudios de hibridación ADN-ADN entre *Pasteurella piscicida* y *Photobacterium damselae*, observando un nivel de similitud del 80%, por lo que propuso considerarlas como dos subespecies dentro de la especie *P. damselae* (Gauthier et al., 1995).

1.3 *P. damselae* subsp. *damselae* como patógeno de animales poiquilotermos y homeotermos

P. damselae subsp. *damselae* es una bacteria marina ampliamente distribuida en todo el mundo. En 1981 se obtuvo el primer aislado de esta bacteria a partir de lesiones ulcerosas en la piel de un pez ángel salvaje (*Chromis punctipinnis*) en las aguas templadas del sur de California (Love et al., 1981). La patogenicidad se confirmó mediante infecciones experimentales en peces ángel. A partir de este primer aislamiento se demostró que esta bacteria puede infectar un elevado número de especies de animales marinos.

En peces marinos, *P. damselae* subsp. *damselae* es el agente causal de un tipo de vibriosis (Fouz et al., 1992; Labella et al., 2010b), siendo patógeno tanto de peces salvajes como de peces cultivados. Los signos clínicos más remarcables son la distensión abdominal, la presencia de áreas hemorrágicas en ojos, boca, ano y en la base de las aletas, úlceras epidérmicas, acumulación interna de líquido ascítico en la cavidad peritoneal y en algunos casos hígado con apariencia pálida y con abundantes petequias hemorrágicas (Figura I.3).

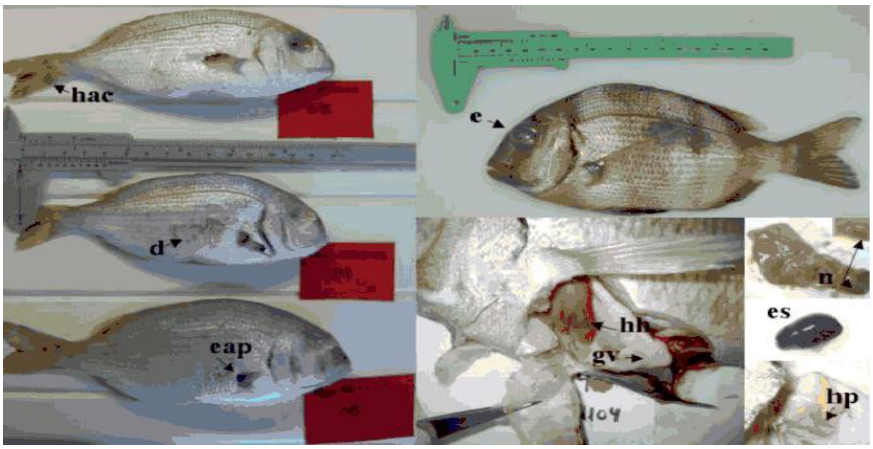

Figura I.3: Ejemplos de algunos signos de vibriosis por *P. damselae* subsp*. damselae en peces* (Labella et al., 2010b).

Los brotes de vibriosis por *P. damselae* subsp*. damselae* en piscifactorías dan lugar a grandes pérdidas económicas, habiéndose aislado a partir de cultivos de dorada (*Sparus aurata*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Botella et al., 2002), de rodaballo (*Scophthalmus maxim*us) (Fouz et al., 1992), dentón común (*Dentex dentex*) (Company et al., 1999), pargo (*Pagrus auriga*) y sargo (*Diplodus sargus*) (Labella et al., 2006; Garcia-Rosado et al., 2007) en diversas partes de España. Se ha aislado también de anguila (*Anguilla reinhardtii*) en Australia (Ketterer & Eaves, 1992), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en Dinamarca (Pedersen et al., 1997; Pedersen et al., 2009), de perca gigante (*Lates calcarifer*) en Tailandia (Kanchanopas-Barnette et al., 2009), medregal en Japón (*Seriola quinqueradiata*) (Sakata et al., 1989), de palometa blanca (*Trachinotus ovatus*) (Zhao et al., 2009) y de lenguado (*Cynoglossus semilaevis*) (Zhang et al., 2011) en China, así como de tiburón (*Carcharhinus plumbeus*) (Grimes et al., 1984), de raya látigo (*Dasyatis pastinaca*) o del tiburón alfombra jaspeado (*Orectolobus ornatus*) (Pedersen et al., 1997).

P. damselae subsp*. damselae* es también patógeno de otros animales como pulpo (*Octopus joubini*) (Hanlon et al., 1984), tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) (Obendorf & Carson, 1987), delfín (*Tursiops truncatus*) (Fujioka et al., 1988), ballena (*Balaenoptera edeni*) (Buck et al., 2006), langostino (*Penaeus monodon)* (Song et al., 1993) o moluscos bivalvos (Garcia Cortes & Antillon, 1990). El continuo aislamiento de

este patógeno a partir de especies tan diferentes es indicativo de la clara ausencia de una especificidad de hospedador, así como de su extensa distribución geográfica.

Además de afectar a animales poiquilotermos, al tener la capacidad de crecer a 37 ºC, *P. damselae* subsp*. damselae* puede afectar también a animales homeotermos incluyendo el hombre, en el que puede causar fascitis necrotizante de tipo 3 (Green et al., 1996), que se caracteriza por necrosis generalizada de la piel y del músculo subyacente, acompañada de dolor local, fiebre y toxicidad sistémica, pudiendo llegar a la muerte por septicemia generalizada y fallo orgánico múltiple. Aunque puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo, la pared abdominal, el peritoneo y las extremidades son las zonas más comunes donde se presenta la infección (Figura I.4). Los primeros aislados en humanos datan de 1971, a partir de lesiones en la piel en hombres que habían estado en contacto con agua salada (Morris et al., 1982; Tison & Kelly, 1984).

Figura I.4: Lesiones externas en hombres infectados por *P. damselae* subsp. *damselae* (Yamane et al., 2004; Nakamura et al., 2008; Hundenborn et al., 2013).

Los casos clínicos suelen relacionarse con infecciones ulcerosas externas causadas por heridas producidas por peces, utensilios de pesca o por la contaminación con aguas marinas de heridas abiertas. La enfermedad se presenta con más frecuencia en los diabéticos, alcohólicos y pacientes inmunodeprimidos o con enfermedad vascular periférica, aunque también se puede producir en individuos jóvenes sanos (Green et al., 1996) (Tabla I.2).

Tabla I.2: Casos clínicos publicados de infecciones por *P. damselae* subsp. *damselae* .

Paciente	Procedencia	Modo de infección	Historial clínico	Resultado	Referencia
6 casos	N/D	Herida contacto con agua marinas	Individuos sanos	N/D	(Morris et al., 1982; Tison & Kelly, 1984)
Hombre 61 años	EE.UU	Herida manipulando peces	Diabetes y pancreatitis	Muerte	(Clarridge et al., 1985)
Hombre 38 años	EE.UU	Herida manipulando peces	Individuo Sano	Infección necrotizante	(Coffey et al., 1986)
N/D	Australia	Herida	N/D	N/D	(Dryden et al., 1989)
Hombre	SE Asiático	Herida manipulando peces	Individuo sano	Muerte (Fascitis necrotizante)	(Yuen et al., 1993)
Hombre 70 años	N/D	Herida manipulando peces	Individuo sano	Muerte (Septicemia)	(Perez-Tirse et al., 1993)
Hombre 64 años	EE.UU	Herida con anzuelo	Enfermedad cardiaca	Muerte (Fallo múltiple)	(Fraser et al., 1997)
N/D	N/D	N/D	N/D	Fascitis necrotizante	(Tang & Wong, 1999)
Hombre 43 años	EE.UU	Herida manipulando peces	N/D	Muerte (Fascitis necrotizante)	(Barber & Swygert, 2000)
Hombre 69 años	Reino Unido	N/D	N/D	Muerte (Fallo múltiple)	(Goodell et al., 2004)
Hombre 58 años	Japón	Pescando	Diabetes	Muerte (Paro cardiaco)	(Asato & Kanaya, 2004)
Hombre 72 años	Japón	Herida manipulando peces	Individuo sano	Muerte (Fallo múltiple)	(Yamane et al., 2004)
Niño	Jamaica	N/D	Anemia falciforme	N/D	(Knight-Madden et al., 2005)
Mujer 22 años	EE.UU	N/D	Embarazada	Infección urinaria	(Álvarez et al., 2006)
Hombre 68 años	Japón	Herida de arpón	Diabetes	Fascitis necrotizante	(Nakamura et al., 2008)
Niño 14 años	EE.UU	Herida haciendo surf	N/D	Septicemia	(Aigbivbalu & Maraqa, 2009)
Hombre 64 años	Australia	Lesión en tibia por una quilla	Individuo sano	Herida infecciosa	(Hundenborn et al., 2013)

N/D: no disponible

Se ha demostrado que *P. damselae* susbp. *damselae* es un miembro común de la microbiota natural de animales sanos como el tiburón (*Carcharhinus plumbeus*) (Grimes et al., 1984), la tortuga verde (*Chelonia mydas*) (Aguirre et al., 1994), el pargo rojo (*Lutjanus guttatus*) (Gomez-Gil et al., 2007; Arias et al., 2013), el delfín (*Tursiops truncatus*) (Buck et al., 2006) y el atún rojo (*Thunnus maccoyii*) (Valdenegro-Vega et al., 2013). Esto sugiere que *P. damselae* subsp*. damselae* puede actuar como patógeno oportunista en un momento de inmunodepresión, sobre todo cuando surgen cambios fisiológicos importantes. Se sabe por ejemplo que en la época de la madurez sexual disminuye la resistencia a los patógenos (Austin, 2010). Además se suele aislar *P. damselae* subsp*. damselae* en los meses de verano (Company et al., 1999), relacionándose los brotes con temperaturas más cálidas del agua, siguiendo una distribución estacional (Austin, 2010), aumentando también la probabilidad de infección por otros vibrios al elevarse la temperatura.

Diversos estudios sugieren asimismo que el agua y los sedimentos actúan como reservorio de esta bacteria. Además hay evidencias de que el agua actúa como vehículo de transmisión del patógeno (Pedersen et al., 1997; Fouz et al., 1998; Fouz et al., 2000; Boiko, 2000; Martins et al., 2013), que puede utilizar la piel y las heridas como portal de entrada al hospedador (Lehane & Rawlin, 2000).

Curiosamente existen dos casos clínicos en los que los pacientes no presentaban lesiones cutáneas ni habían estado en contacto con el agua marina, pero habían consumido pescado crudo (Shin et al., 1996; Kim et al., 2009). Desde que en los años 90 comenzaron los estudios para evaluar el riesgo de la transmisión de la enfermedad entre animales y humanos se han aislado cepas de *P. damselae* subsp*. damselae* en mariscos y pescado de zonas comerciales en distintos puntos del mundo (Elhadi et al., 2004; Richards et al., 2008; Yucel & Balci, 2010; Serracca et al., 2011; Chiu et al., 2013). La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) estima que no menos del 60% de los patógenos humanos y del 75% de las enfermedades de reciente aparición son enfermedades zoonóticas, y muchas de ellas se transmiten a través del consumo de productos animales. En términos de salud y seguridad alimentaria, los productos pecuarios son una categoría más susceptible a los patógenos que otros productos

alimenticios. Se puede decir que los animales marinos son transmisores del patógeno a humanos, tanto por el contacto físico como por el consumo de animales crudos (Kim et al., 2009).

2 Factores de virulencia

La patogenicidad es la capacidad de una bacteria para multiplicarse y producir daños en un hospedador, siendo la infección el resultado de un desequilibrio entre los factores de virulencia de la bacteria y los mecanismos de defensa del hospedador (Figura I.5), pudiendo influir también las condiciones ambientales.

Figura I.5: Desequilibrio en un hospedador debido a la presencia de un patógeno. Consecuencia: una infección bacteriana.

La virulencia de una bacteria viene determinada por tanto por la posesión de diferentes factores de virulencia. La expresión en mayor o menor grado de los diferentes factores de virulencia determina la variabilidad entre cepas y la mayor o menor virulencia de una cepa concreta, por lo que puede considerarse la virulencia como un carácter cuantitativo. Se pueden clasificar los distintos factores de virulencia según el papel que juegan en el proceso infeccioso. Se relacionan a continuación algunos de los más importantes.

2.1 Colonización e invasión

Durante las fases de inicio de la infección las bacterias deben sortear las barreras pasivas (mucus, piel y membranas mucosas), adherirse específicamente y reproducirse en los tejidos, lo que se conoce como colonización. La adhesión también promueve la liberación de toxinas y la posterior invasión en las células. Los factores de virulencia que favorecen la colonización son las **adhesinas**, moléculas de la superficie bacteriana que suelen ser parte constitutiva de las fimbrias y se encargan de anclarse a proteínas

celulares específicas de la superficie de las células hospedadoras (Klemm et al., 2010). Se ha demostrado la presencia de adhesinas de naturaleza glicoproteica en *P. damselae* subsp*. piscicida* (Magariños et al., 1996), con una adherencia débil frente a distintas líneas celulares de peces pero mayor a la mucosa intestinal. Estudios similares en *P. damselae* subsp*. damselae* mostraron una adherencia moderada o débil frente a líneas celulares incluso de mamíferos, no encontrándose ninguna relación entre la hidrofobicidad celular propia de esta subespecie y la adherencia, por lo que ésta podría estar relacionada con interacciones no hidrofóbicas (Fouz et al., 1992; Fouz et al., 1993).

Por otro lado los animales secretan en las mucosas glicoproteínas que contienen ácidos siálicos, lo que sugiere que aquellas bacterias que producen **transialidasas** tendrán una mayor capacidad para colonizar y estabilizarse en la piel, escamas e intestino. Se ha descrito asimismo la utilización por las bacterias patógenas del ácido siálico del hospedador para formar una capa protectora que les proporciona resistencia a la respuesta inmune (Severi et al., 2007; Cheng et al., 2010). Dichas sialidasas se han podido localizar en cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* aisladas de intestino de peces en Japón (Sugita et al., 2000).

Aunque la **motilidad** por flagelos no es considerada un factor de virulencia propiamente dicho, se sabe que es esencial para la colonización en los primeros estadios de la infección (Ormonde et al., 2000).

Las bacterias pueden ser patógenos intracelulares o extracelulares. La capacidad de un microorganismo para penetrar en el citoplasma de las células no fagocíticas (epiteliales y endoteliales de los vasos sanguíneos) se conoce como invasividad. Dicha capacidad favorece la posterior diseminación y proporciona un ambiente protegido contra los mecanismos de defensa del hospedador (Falkow et al., 1992). Los resultados de Magariños et al. (1996) indican que *P. damselae* subsp. *piscicida* es capaz de invadir líneas epiteliales de pez y permanecer viable en la célula infectada durante al menos 2 días. La internalización de la subsp. *piscicida* en células epiteliales de pez es un proceso mediado por interacciones de tipo ligando-receptor. Una vez en el interior no se aprecian evidencias de multiplicación intracelular, pero sí extracelularmente, ya que la replicación viene dada después de la lisis celular (Lopez-Doriga et al., 2000). Por otro

lado la capacidad invasiva de *P. damselae* subsp. *damselae* en líneas celulares de peces y mamíferos resultó débil e incluso negativa en la mayor parte de los casos (Fouz et al., 1993).

Una vez en el interior del hospedador, y situados en un órgano o tejido para poder reproducirse, los microorganismos necesitan superar los mecanismos de defensa del hospedador. Uno de los factores clave en este sentido es la presencia de la **cápsula,** una red de polisacáridos que forma una capa uniforme alrededor de la bacteria, que está formada por una repetición de monosacáridos y se une a la célula bacteriana mediante enlaces con los fosfolípidos o los lípidos A de los LPS (Whitfield & Valvano, 1993). Bonet et al. (1994) demostraron la síntesis *in vitro* de una cápsula en *P. damselae* subsp. *piscicida*, identificada como una línea fina de material capsular que confiere resistencia al suero y aumenta el grado de virulencia. Hasta la fecha no se ha descrito la producción de cápsula en la subespecie *damselae*.

2.2 Factores agresivos que provocan daño en el hospedador

Según Wang et al. (1998) *P. damselae* subsp*. damselae* no se adhiere ni invade las células de líneas celulares, por lo que los cambios morfológicos provocados en ellas se deberían únicamente a los **ECPs** (*Extracellular Products*), como las enzimas proteolíticas, lipolíticas, polisacaridasas o las enzimas con actividad hemolítica o citotóxica. Sin embargo, se ha encontrado una bajísima actividad proteolítica en las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae*, estando ausente la producción de proteasas típicas como caseinasas o elastasas. Por el contrario se encontró una alta actividad de enzimas tales como lipasas, fosfolipasas, condroitinasas y hialuronidasas, así como actividad hemolítica frente a eritrocitos de peces y mamíferos (Fouz et al., 1997; Labella et al., 2010b). La producción de polisacaridasas no se pudo relacionar con la virulencia, pero las cepas no virulentas no producían hialuronidasa ni condroitinasa. Los ECPs presentaban un perfil de actividad enzimática similar al asociado con las células, aunque no se pudo establecer ningún tipo de relación entre un perfil enzimático determinado y la virulencia.

En *P. damselae* subsp*. piscicida* parece existir una diversidad en cuanto a las actividades enzimáticas presentes en los ECPs, aunque la producción de una fosfolipasa termoestable es común a todas las cepas. Se ha podido demostrar la relación de los ECPs de *P. damselae* subsp*. piscicida* con la patogenicidad en las cepas que tienen la capacidad de invadir y de proliferar en los tejidos del hospedador (Magariños et al., 1992). Bakopoulos et al. (2004) confirmaron que la mortalidad producida en los peces era causada por los productos secretados por la bacteria.

Kreger (1984) describió la existencia de una relación entre la producción de una citotoxina *in vitro* y la capacidad de *P. damselae* subsp*. damselae* para producir una infección en ratones. Esta toxina, que presentaba una gran actividad hemolítica contra los eritrocitos de una variedad de especies (Kothary & Kreger, 1985), fue posteriormente purificada y nombrada como damselisina (Dly), una fosfolipasa-D activa contra la esfingomielina, con actividad hemolítica (Kreger et al., 1987) y codificada por el gen *dly* (Cutter & Kreger, 1990). En un principio se pensó que Dly era el principal factor de virulencia y la única hemolisina existente en *P. damselae* subsp*. damselae,* pero aunque todas las cepas patógenas eran hemolíticas, no todas poseían el gen *dly* (Osorio et al., 2000), lo que sugería que la presencia de Dly no era un requisito indispensable para la actividad hemolítica y la patogenicidad para peces y ratones (Labella et al., 2010b). Rivas et al. (2011) demostraron que Dly se encontraba codificada en un plásmido denominado pPHDD1, un plásmido de unas 153 kb cuyo contenido es un mosaico de genes adquiridos por transferencia horizontal y reorganizados por recombinaciones y transposiciones. Además este plásmido contiene un gen que codifica una toxina formadora de poros denominada $HlyA_{pl}$ (Rivas et al., 2011). En 1985 se describieron dos posibles fenotipos hemolíticos en *P. damselae* subsp*. damselae*, uno fuerte y otro débil (Clarridge & Zighelboim-Daum, 1985), encontrándose el gen *dly* únicamente en aquellas cepas con mayor hemólisis (Cutter & Kreger, 1990). Rivas et al. (2013) demostraron que existe una clara correlación entre la presencia del plásmido pPHDD1 y el fenotipo de mayor hemólisis y que tanto Dly como $HlyA_{pl}$ contribuyen a la hemólisis y son necesarias para la máxima virulencia en peces y ratones, existiendo además una sinergia entre ambas toxinas (Rivas et al., 2013). Se demostró asimismo la existencia de una

hemolisina cromosómica ($HlyA_{ch}$) presente en todas las cepas hemolíticas de *P. damselae* subsp. *damselae* con una similitud del 92% con $HlyA_{pl}$.

Estas hemolisinas no están presentes en la subespecie *piscicida*. Sin embargo sí se ha identificado en ésta una citotoxina de unos 56 kDal (AIP56) que es una zinc-metaloproteasa que presenta actividad apoptótica contra macrófagos y neutrófilos (do Vale et al., 2005). La toxina purificada produce los mismos efectos en peces que la infección natural (Silva et al., 2010) y es considerada como el principal factor de virulencia de esta subespecie (Silva et al., 2013).

2.3 Elementos genéticos móviles: Islas genéticas

La transferencia horizontal y la adquisición de ADN foráneo son procesos fundamentales en la evolución de muchas especies patógenas. El intercambio de elementos genéticos móviles, como plásmidos, fagos e islas genéticas, permite a las bacterias adquirir secuencias génicas que pueden aumentar su potencial de virulencia (Dobrindt & Reidl, 2000).

Las islas genéticas se clasifican según las diferentes funciones que codifican, las cuáles incluyen, entre otras, la síntesis de distintos factores de virulencia, denominándose en este caso **islas de patogenicidad**. Un ejemplo es el sistema de transporte y síntesis del sideróforo yersiniabactina (YBT) cuya síntesis está codificada dentro de una isla de alta patogenicidad (HPI: *High-Pathogenicity Island)* en *Y. pestis* (Gao et al., 2008). Todas las islas genéticas presentan algunas características comunes: constituyen una secuencia de ADN que puede estar presente en unas cepas y ausente en otras dentro de una misma especie, asociación con un gen que codifica un ARNt, la presencia de elementos móviles como las integrasas o las transposasas que flanquean secuencias repetitivas, y un contenido diferente de G+C comparado con el genoma del organismo hospedador (Murphy & Boyd, 2008). La adquisición de las islas genéticas tiene lugar por mecanismos de conjugación, transducción o transformación.

Se han descrito varias islas de patogenicidad que contienen genes de virulencia en diferentes especies de *Vibrio*, como por ejemplo cuatro islas que fueron descritas en *V. cholerae* (Murphy & Boyd, 2008) asociadas con epidemias y pandemias, que son las

llamadas VPI-1 (*Vibrio Pathogenicity Island*), una región cromosómica de unas 40 kb flanqueada a ambos lados por una secuencia de unión de 20 pb. La isla, además de genes de transposones e integrasas, contiene genes que codifican un factor de colonización ACF y una adhesina o pilus TCP cuya expresión está co-regulada con la toxina CTX. Las islas VPI-2 tienen un tamaño de 57,3 kb y contienen un operón de genes que codifican neuraminidasas (NanH) y las islas VSP-1 y VSP-2 (*Vibrio Seventh Pandemic Island*) cuyos genes codifican proteínas de funciones que se presume son necesarias para la propagación de la epidemia (Faruque & Mekalanos, 2003). En *V. parahaemolyticus* también se han detectado islas de patogenicidad, la más estudiada presenta genes que codifican factores de virulencia como un sistema de secreción tipo 3 (SST3) y la hemolisina termoestable Tdh (Izutsu et al., 2008).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3 Importancia del hierro en las infecciones bacterianas

3.1 Biodisponibilidad del hierro

El hierro es un nutriente fundamental para el crecimiento bacteriano, ya que forma parte de numerosos procesos biológicos como el transporte de electrones, activación de oxígeno, reducción del peróxido, síntesis de aminoácidos, nucleótidos y ADN y fotosíntesis. Aunque el hierro es el cuarto elemento más abundante en la Tierra, en la mayoría de los ambientes no se encuentra en formas biológicamente asimilables, debido a que en medios aeróbicos y a pH neutro puede ser potencialmente tóxico o insoluble. El hierro se puede encontrar en dos estados redox: el reducido (Fe^{+2}) y el oxidado (Fe^{+3}). El ión ferroso (Fe^{+2}) es tóxico ya que puede activar la reacción de Fenton ($Fe^{+2} + H_2O_2 = Fe^{+3} + OH^- + OH$), produciéndose radicales hidroxilo que tienen efectos nocivos sobre la mayoría de las macromoléculas. En presencia de oxígeno y pH neutro el ión Fe^{+2} es rápidamente oxidado a la forma férrica trivalente (Fe^{+3}), una forma insoluble que formará complejos de hidróxido de hierro (Andrews et al., 2003).

3.2 Disponibilidad del hierro en el hospedador

Debido a su importancia como nutriente la adquisición de hierro es uno de los pasos esenciales en la supervivencia de un patógeno dentro del hospedador. Se ha comprobado que el aumento de la concentración de hierro en los tejidos del hospedador conlleva una mayor susceptibilidad a las infecciones por la mayoría de las bacterias patógenas invasivas. Por tanto la concentración de hierro es uno de los elementos más controlados dentro del hospedador, prácticamente no se encuentra en forma libre debido a las estrategias del propio hospedador para evitar su efecto tóxico y para impedir que los microorganismos dispongan de él. Los vertebrados unen el hierro a distintas glicoproteínas de la familia de las transferrinas (Tf), como la serotransferrina, que transporta el hierro por el plasma, la lactoferrina, que se encuentra en la mayoría de los fluidos extracelulares, o la ovotransferrina que se encuentra en la albúmina de huevo. Las Tfs nunca están saturadas de hierro, lo que les sirve para captar cualquier excedente de hierro que pueda aparecer en la sangre o en los fluidos durante la infección y así asegurarse de que no haya hierro libre en circulación. En el espacio

intracelular el hierro se encuentra almacenado en las ferritinas, moléculas que no sólo se encuentran en los animales, sino también en las plantas (fitoferritinas) e incluso en las bacterias (bacterioferrinas). La ferritina típica tiene un PM de aproximadamente 430-480 kDal, se compone de 24 subunidades proteicas y puede almacenar más de 4.000 átomos de Fe^{+3}. Juega un papel importante en la protección celular, pues almacena el hierro de forma inocua, evitando que intervenga en las reacciones que podrían dar lugar a la formación de radicales libres. La mayor cantidad de hierro presente en el hospedador se encuentra asociado al grupo prostético hemo, formando parte de hemoproteínas como las hemoglobinas, encargadas del transporte de oxígeno, los citrocromos, que se encuentran en las mitocondrias y el retículo endoplasmático y participan en las reacciones de transferencia de electrones, y las catalasas y peroxidasas, enzimas encargadas de la protección celular frente a especies químicas potencialmente dañinas (Bullen, 1981) (Figura I.6).

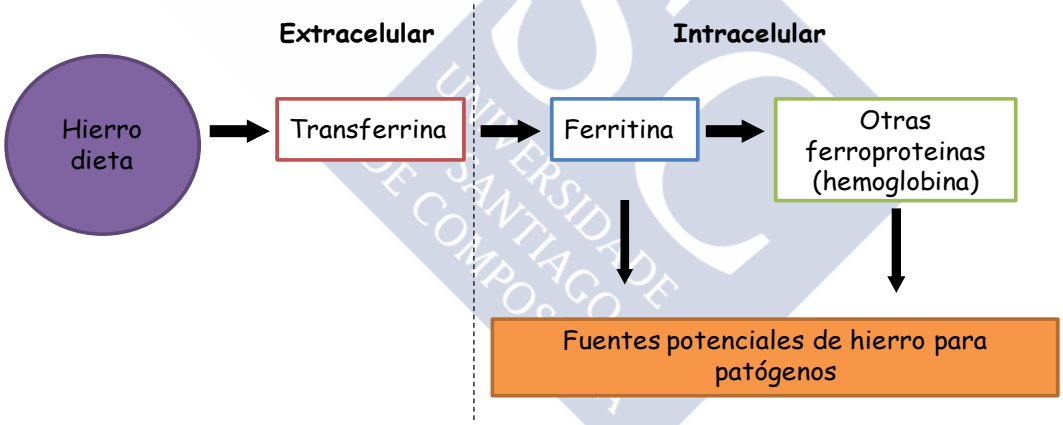

Figura I.6: Entrada y distribución del hierro en el interior del hospedador.

3.3 Sistemas de captación de hierro en las bacterias

El ión Fe^{+3} tiene una solubilidad de 10^{-17} M a pH 7, una concentración insuficiente para el crecimiento bacteriano, ya que las bacterias requieren del orden de 10^{-7} a 10^{-5} M para alcanzar un crecimiento óptimo. La escasa disponibilidad del hierro hace que este elemento actúe como factor limitante para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos patógenos, por lo que las bacterias han desarrollado distintas estrategias para poder captarlo. Por ejemplo *Clostridium perfringens* es capaz de captar

hierro creando un microambiente de pH más ácido, favoreciendo la formación de Fe^{+2}, más soluble y facilitando la liberación del metal por parte de las proteínas del hospedador (Neilands, 1995). Las bacterias patógenas pueden también poseer mecanismos de degradación de las proteínas almacenadoras de hierro, lo cual se ha podido comprobar al relacionar enfermedades como la hemocromatosis con la proliferación de patógenos como *Vibrio vulnificus, Escherichia coli* o *Listeria monocytogenes* (Ketterer & Eaves, 1992). Otros mecanismos pueden ser la interacción directa con las proteínas del hospedador que transportan hierro (transferrinas, lactoferrinas, hemoglobinas, etc.) o la unión y captación del ión Fe^{+3} por medio de un transportador de la membrana interna FbpABC (Amin et al., 2012). Se ha demostrado que los patógenos de mamíferos que tienen un rango estrecho de hospedadores, poseen sistemas de adquisición de hierro basados en receptores directos de superficie para las transferrinas (Morgenthau et al., 2013).

Otro sistema de captación de hierro presente en la mayoría de patógenos es la capacidad para utilizar el grupo hemo del hospedador, formado por un anillo de protoporfirina IX, que alberga en su interior un átomo de hierro Fe^{+2}. El hemo no suele encontrarse libre en el plasma sino unido a proteínas formando hemoproteinas como la hemoglobina, mioglobina y citrocromos (Stojiljkovic & Perkins-Balding, 2002), siendo necesaria la acción de las hemolisinas y citotoxinas bacterianas para facilitar el acceso al contenido celular y poder utilizar el grupo hemo, el cual se unirá a un receptor de membrana específico que se encuentra asociado a un sistema de transporte de tipo ABC en las bacterias Gram-negativas (Occhino et al., 1998).

Las bacterias también pueden adquirir hierro a través de citrato (citrato férrico). Se ha descrito en *E. coli* que el citrato se asimila mediante el receptor específico FecA dependiente de TonB, y un transportador ABC FecABCD en la membrana interna (Yue et al., 2003).

En las bacterias Gram-negativas todos los receptores de membrana externa implicados en la adquisición de hierro, bien a través del grupo hemo, de citrato férrico, o de transferrinas, son dependientes de TonB, una molécula que le proporciona la energía necesaria para atravesar la membrana externa hasta el espacio periplásmico (Figura I.7).

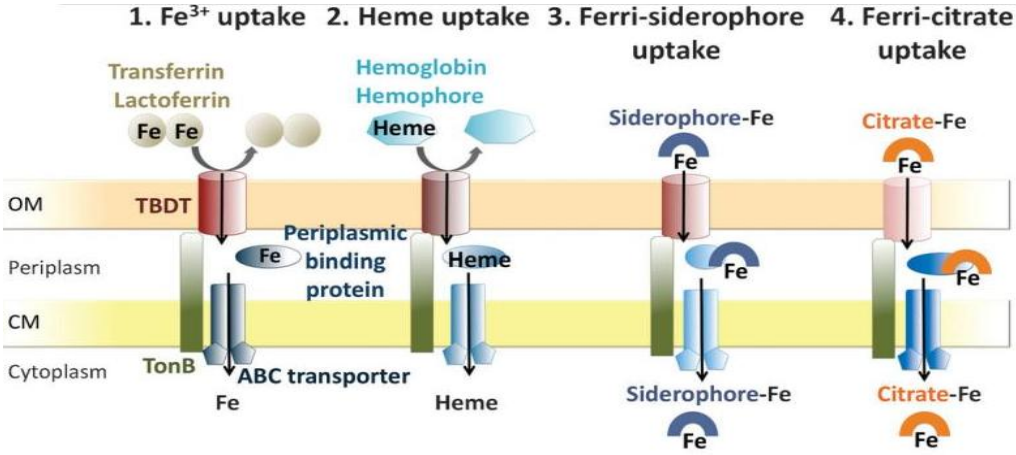

Figura I.7: Diversas vías de asimilación de hierro en bacterias Gram-negativas: (1) y (2). Utilización de transferrinas, lactoferrinas y hemoglobinas que entregan el hierro o el grupo hemo a un receptor para a continuación ser internalizado, (3) asimilación a través de sideróforos (4) captación del citrato férrico. Todos los sistemas tienen receptores específicos dependientes de TonB, que les proporciona la energía para el transporte hacia el espacio periplásmico. El transporte desde el espacio periplásmico al interior celular de cada uno de los complejos se lleva a cabo a través de un transportador de tipo ABC (Schalk, 2013).

Además de los sistemas mencionados, en algunas bacterias se ha descrito la captación directa del ión ferroso Fe^{+2} a través del sistema llamado Feo, codificado por un operón formado por tres genes, *feoABC* (Figura I.8). Este sistema fue identificado por primera vez en *E. coli* (Hantke, 1987), y se ha demostrado que existe también en otras bacterias como *V. cholerae* (Weaver et al., 2013).

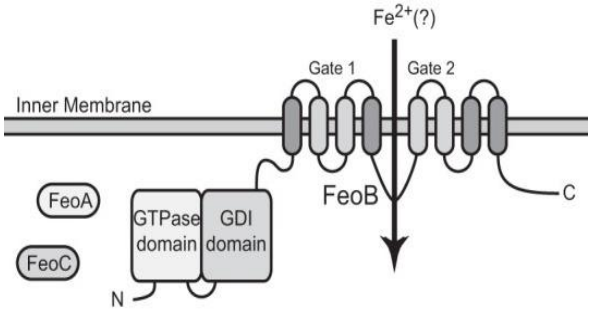

Figura I.8: Representación del sistema de transporte del ión ferroso, sistema Feo (Weaver et al., 2013).

Con todo, el mecanismo más utilizado por los microorganismos para la obtención de hierro, y uno de los más estudiados, es la secreción de moléculas denominadas sideróforos, que con una afinidad por el ión Fe^{+3} muy elevada (Ks entre 10^{30} y 10^{52}), pueden competir eficazmente y arrebatar el ión Fe^{+3} a las fuentes del hospedador como la ferritina o la transferrina, las cuales tienen constantes de afinidad menores. Estos mecanismos se describen en detalle a continuación.

4 Asimilación de hierro basada en la síntesis de sideróforos

4.1 Sideróforos

Los sideróforos (en griego *sidero phoros*, "portadores de hierro") son moléculas de bajo peso molecular (<1.000 Dal) sintetizadas por bacterias y hongos que actúan como agentes quelantes específicos para Fe^{+3} en respuesta al déficit de hierro. Hasta la fecha se han descrito aproximadamente 500 sideróforos y se pueden caracterizar según el grupo funcional que utilizan para unirse al hierro (Figura I.9). Habitualmente son hexadentados con tres grupos funcionales dobles dispuestos alrededor del ión férrico central. Los grupos funcionales principales son tres:

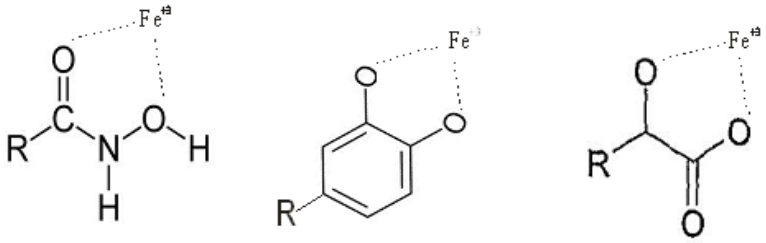

Figura I.9: Grupos funcionales presentes en los sideróforos: (1) Hidroxamato, (2) catecol y (3) Ácido hidroxicarboxílico.

➢ Catecoles: Su centro de unión deriva del corismato, que es un intermediario de la biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano; se clasifican en catecoles (formados por ácido 2,3-dihidroxibenzoico, DHBA) y fenolatos (compuestos por ácido salicílico). Como ejemplos de catecoles podemos citar la enterobactina (Figura I.10) de *E. coli,* que es el sideróforo que presenta mayor afinidad por el hierro ($Ks=10^{52}$), lo que le permite competir eficazmente con la transferrina (Ratledge & Dover, 2000), o la vibriobactina (Figura I.10) de *V. cholerae* (Henderson & Payne, 1994). La yersiniabactina de *Y. pestis* (Perry et al., 1999) o la pioquelina de *P. aeruginosa* (Ankenbauer et al., 1988) serían ejemplos claros de fenolatos. Habitualmente este tipo de sideróforos contienen también varios residuos aminoacídicos.

➢ Hidroxamatos: Son sideróforos no polipeptídicos, como por ejemplo la aerobactina (Figura I.10) producida por *Shigella flexneri* (de Lorenzo & Martinez, 1988),

con una constante de afinidad al hierro de aproximadamente 10^{25}, muy parecida a la de la transferrina.

➢ Ácidos α-hidroxicarboxílicos: El centro de unión deriva del citrato. Como ejemplos podemos citar la acromobactina de *Pseudomonas syringae* (Berti & Thomas, 2009) o la vibrioferrina (Figura I.10) de *V. parahaemolyticus* (Yamamoto et al., 1994).

➢ Sideróforos mixtos: Sideróforos que contienen en su estructura dos grupos de unión a hierro, como por ejemplo la pioverdina (Figura I.10), que presenta un grupo catecol y un grupo hidroxamato.

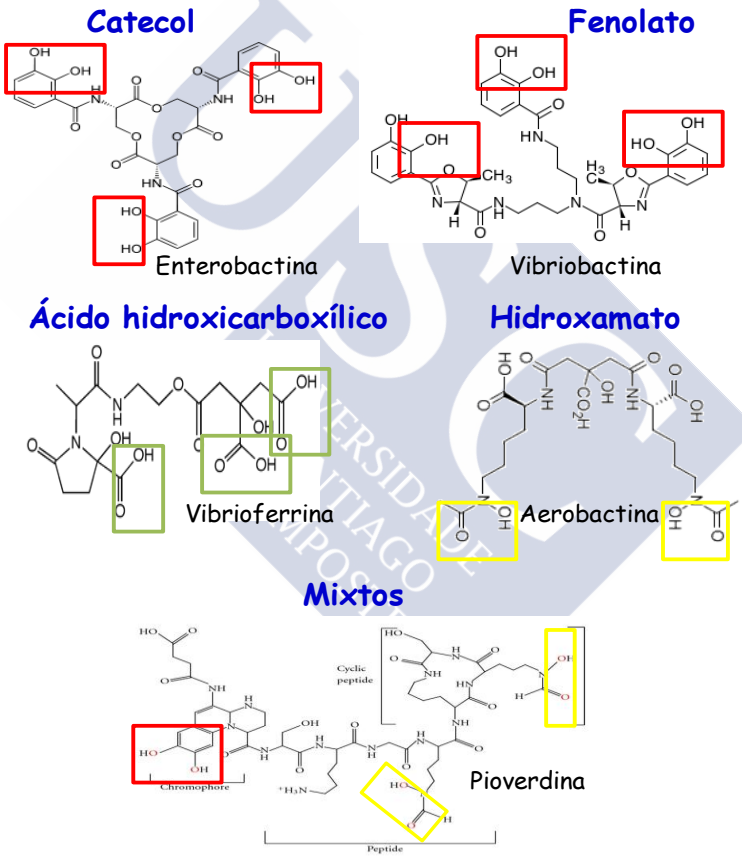

Figura I.10: Ejemplos de sideróforos. Rectángulo rojo: grupo funcional catecol, rectángulo verde: grupo funcional ácido hidroxicarboxílico y rectángulo amarillo: grupo funcional hidroxamato.

4.2 Síntesis de Sideróforos

La mayoría de los sideróforos de naturaleza peptídica, como los catecoles y los fenolatos, son sintetizados a través de una gran familia de enzimas llamadas péptido-sintetasas no ribosómicas (NRPS: *Non-Ribosomal Peptide Synthetase*). Estas enzimas forman grandes complejos enzimáticos multimodulares que seleccionan, activan y ensamblan una amplia gama de amino-, carboxi-, e hidroxi-ácidos para formar una gran diversidad de péptidos y polipéptidos. Las distintas funciones catalíticas de los complejos enzimáticos NRPS las desempeñan los dominios, que se pueden clasificar en 4: dominios de adenilación (A), de transporte (PCP/ArCP: *Peptidyl/Aryl Carrier Protein*), de condensación (C) y dominio tioesterasa (TE). Estos dominios a su vez se unen en tres tipos básicos de módulos: Módulo de iniciación, Módulo de elongación y Módulo de terminación (Figura I.11) (Schwarzer et al., 2003). A estos modelos básicos y esenciales se les pueden añadir otro tipo de módulos secundarios que catalizan modificaciones estructurales: metiltransferasa (MT), ciclación (Cy), epimerización (E), reducción (KR), y deshidratación (DH). Como paso previo al proceso de ensamblaje, los residuos de DHBA y ácido salicílico, que se van a incorporar a las NRPS, deben sintetizarse a partir de sus respectivas rutas biosintéticas.

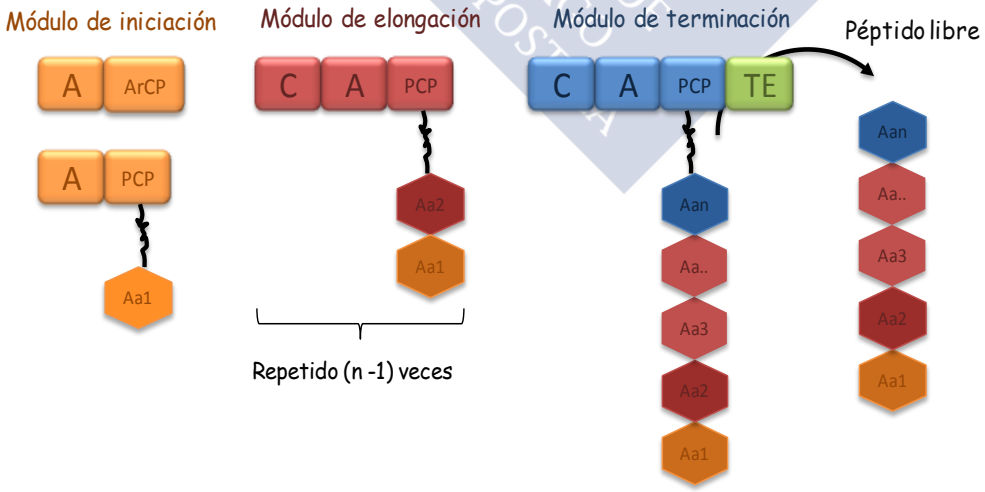

Figura I.11: Módulos y dominios de las NRPS.

Los sideróforos que no son polipéptidos y que están formados por ácidos dicarboxílicos, diaminas o aminoalcoholes unidos por enlaces amida o éster, se sintetizan a través de un sistema independiente de NRPS llamado NIS (*NRPS-Independent System*), formado por una serie de sintetasas. Durante muchos años las enzimas IucA e IucC, que intervienen en la síntesis de aerobactina, fueron los únicos ejemplos de enzimas NIS (de Lorenzo & Neilands, 1986). En los últimos años se han descrito rutas similares y se han comparado las enzimas de estas nuevas rutas con las enzimas IucA y IucC dando homologías del 37-77% de similitud. Además, diversos estudios mostraron que las enzimas NIS se podían clasificar en tres grupos según cuál es el principal sustrato carboxilato: tipo A, que unen ácido cítrico; tipo B que utilizan ácido oxalacético o ácido α-cetoglutárico y el tipo C que se une a un intermediario biosintético (Figura I.12). La actividad general de las enzimas implica la formación de un enlace éster o amida a través del grupo carboxilo final del sustrato y un alcohol o amina primarios (Figura I.12) (Challis, 2005).

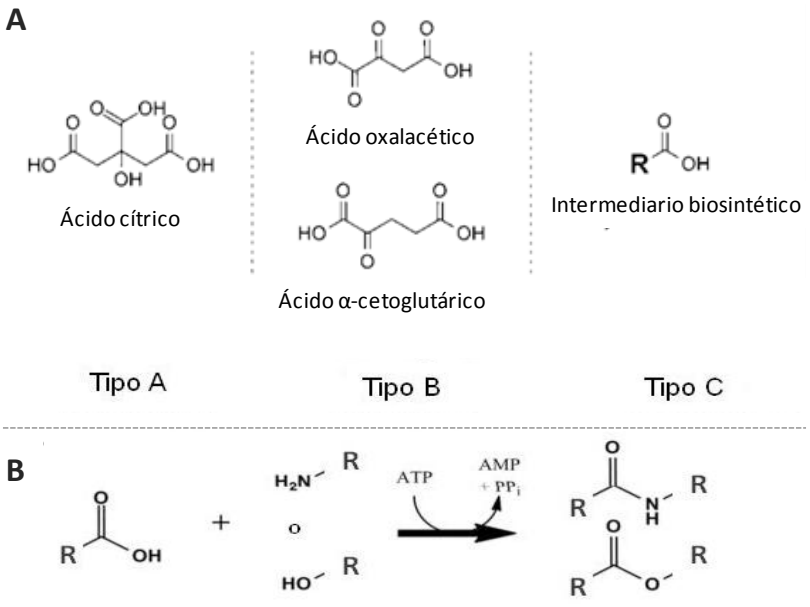

Figura I.12: (A): Tipos de NIS según su sustrato; (B): actividad catalítica de las enzimas NIS.

En la Figura I.13 se muestra un ejemplo de ruta de biosíntesis de un sideróforo de tipo hidroxicarboxilato, la vibrioferrina. Presenta una enzima de tipo A, PvsD, cuyo

principal sustrato es el ácido cítrico (cuadro verde) y la enzima tipo B, PvsB, cuyo sustrato es el ácido α-cetoglutárico (cuadro rojo) (Fujita et al., 2011).

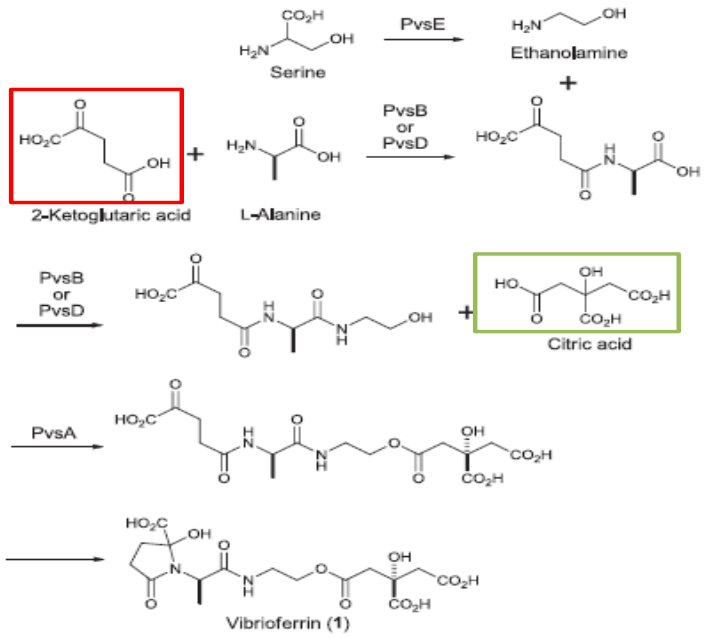

Figura I.13: Esquema de la ruta de biosíntesis de la vibrioferrina (Fujita et al., 2011).

Los genes que codifican los sistemas NIS se suelen agrupar en operones de biosíntesis, en los que cada uno codifica al menos un miembro de los 3 tipos de enzimas A, B o C, y frecuentemente contienen dos tipos distintos o los tres en el mismo operón. Varios de estos operones se muestran en la Figura I.14. Ejemplos de este tipo de genes son *iucA*, *rhbC, pvsD, acsD, sbnE* y *asbA,* que codifican enzimas de tipo A que intervienen en la biosíntesis de aerobactina, rizobactina, vibrioferrina, acromobactina, estafilobactina y antraquelina, respectivamente. Dentro de las enzimas de tipo B se incluyen los productos de los genes *iucD*, *alcA*, *desB*, *pvsB, acsA* o *sbnC* que codifican enzimas de la ruta de biosíntesis de aerobactina, alcaligina, desferrioxamina, vibrioferrina, acromobactina y estafilobactina, respectivamente. Algunos representantes de los enzimas de tipo C están codificados por los genes *iucC*, *rhbF, acsC, sbnF, asbB, alcC* o *desD*, que codifican enzimas de la biosíntesis de aerobactina, rizobactina, acromobactina, estafilobactina, antraquelina, alcaligina y desferrioxamina, respectivamente (Challis, 2005).

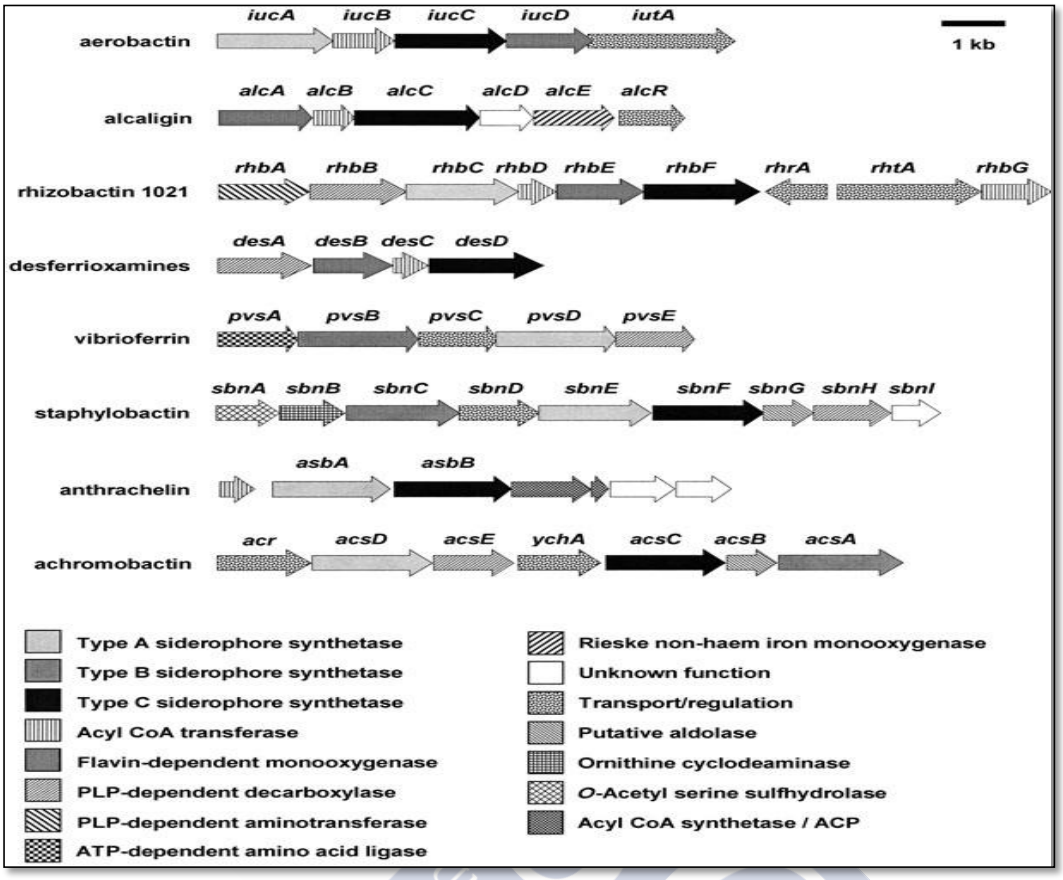

Figura I.14: Operones de genes que codifican sistemas NIS de síntesis de distintos sideróforos (Challis, 2005).

4.3 Transporte de los sideróforos

Los sideróforos son moléculas polares por lo que requieren un transporte específico para atravesar las membranas celulares. El sistema de transporte consta habitualmente de un receptor de membrana externa dependiente de TonB (TBDT: *TonB-dependent transport*) que transporta el complejo sideróforo-Fe^{+3} hacia el espacio periplásmico, el cual se une a una proteína de unión periplásmica (PBP) y un transportador del tipo ABC (*ATP binding cassette*) que lo transporta hacia el citoplasma (Figura I.15).

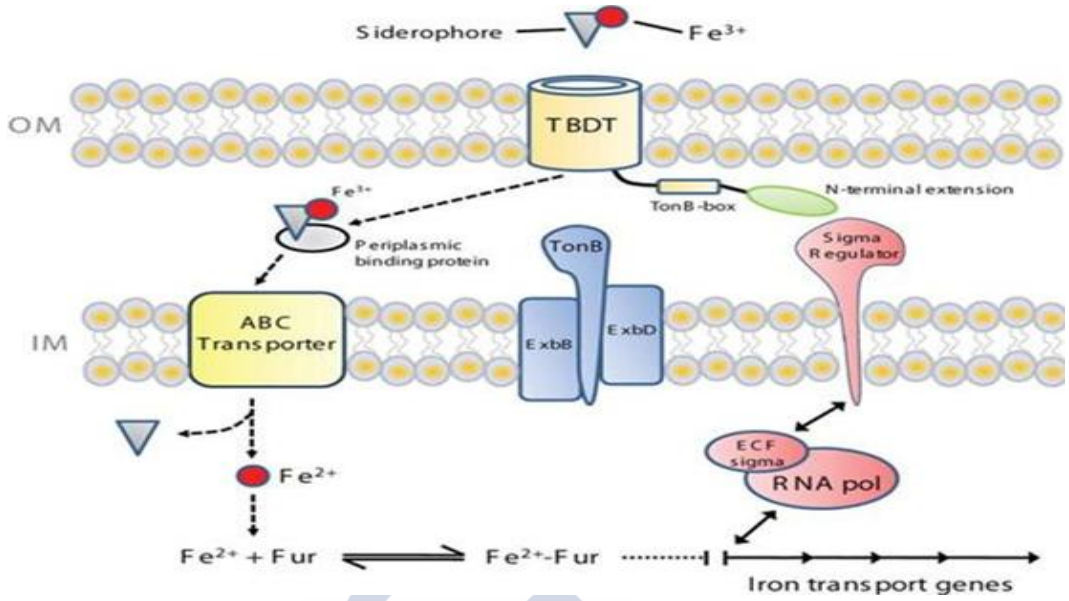

Figura I.15: Esquema del sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos, formado por un receptor dependiente de TonB (TBDT), las proteínas TonB y ExbB-ExbD, que proporcionan energía para transportar el complejo sideróforo-hierro al espacio periplásmico y un transportador ABC que transporta el complejo hacia el interior a través de la membrana interna. Todos los genes que codifican este sistema están regulados por la proteína Fur dependiente de hierro (Noinaj et al., 2010).

Los TBDT presentan 22 láminas-β transmembrana formando un canal cerrado con un dominio globular que da lugar a un tapón, el cual contiene una zona de unión específica para el complejo sideróforo-Fe (Figura I.16), que también se une a los *loops* extracelulares del canal. La unión ligando-receptor da lugar a un cambio conformacional en el tapón del receptor permitiendo el paso del complejo hacia el interior del canal. Para que el complejo sideróforo-Fe pase al espacio periplásmico es necesaria la energía proporcionada por la proteína TonB (Noinaj et al., 2010). La interacción del receptor con la proteína TonB se lleva a cabo a través de un dominio en la zona N-terminal denominado caja-TonB, aunque también puede interaccionar con el tapón.

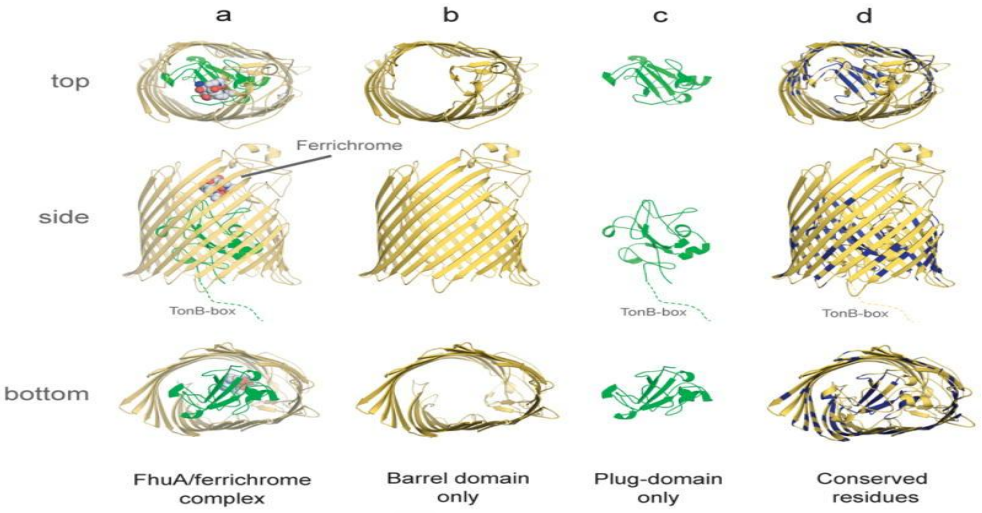

Figura I.16: Estructura del receptor dependiente de TonB (TBDT) FhuA del ferricromo en *E. coli*, desde tres perspectivas diferentes, la parte externa, el lateral y la parte interna situada hacia el espacio periplásmico: (a) estructura completa de FhuA, (b) láminas-β, transmembrana, (c) estructura del tapón con el extremo N-terminal y la caja-TonB y (d) residuos conservados del TBDT FhuA (Noinaj et al., 2010).

En las bacterias Gram-negativas el sistema TonB media la transducción de energía (generada en la membrana citoplasmática por la fuerza protón-motriz) a la membrana externa para ser utilizada en el transporte activo de sideróforos, hemo, vitamina B12, complejos de níquel y carbohidratos. El sistema TonB está formado por las proteínas TonB, ExbD y ExbB; la proteína TonB se encuentra unida a las dos membranas, y las proteínas ExbD y ExbB sólo se encuentran unidas a la membrana interna. En el extremo N-terminal TonB presenta varios dominios y secuencias conservadas por donde se une a la membrana interna y donde comienza el proceso de transducción de la energía. TonB presenta también un dominio transmembrana rico en prolina y es la zona de unión a las dos membranas; en el extremo C-terminal TonB se unirá a la caja-TonB del receptor. ExbB es necesaria para estabilizar la proteína TonB en la membrana interna cuando TonB interactúa con la caja-TonB del TBDT (Postle & Kadner, 2003).

Se ha demostrado en varias bacterias diferentes que existe más de un tipo de TonB, denominados TonB1 y TonB2. Se describieron inicialmente en *V. cholerae* (Occhino et al., 1998) y posteriormente han sido caracterizados múltiples sistemas TonB en otros vibrios incluyendo *V. vulnificus* (O'Malley et al., 1999), *V. alginolyticus* (Stork et al., 2004; Wang et al., 2007), *V. anguillarum* (Stork et al., 2004) y también en otras bacterias como *P. damselae* subsp*. piscicida* (Naka & Hirono, 2005), *Actinobacillus*

pleuropneumoniae (Liu et al., 2011) y *Pseudomonas aeruginosa* (Zhao et al., 2000). El sistema TonB1 tiene similitud con el único sistema TonB de *E. coli;* los genes *tonB1, exbD1* y *exbB1* se encuentran localizados dentro de un cluster que codifica el sistema de transporte del grupo hemo. El sistema TonB2, que se encuentra principalmente en vibrios, está compuesto por las proteínas TonB2, ExbD2 y ExbB2 y una cuarta denominada TtpC, que se encuentra en todos los sistemas TonB2 analizados hasta la fecha y que parece ser esencial para la interacción TonB2-receptor (Figura I.17) (Kustusch et al., 2012).

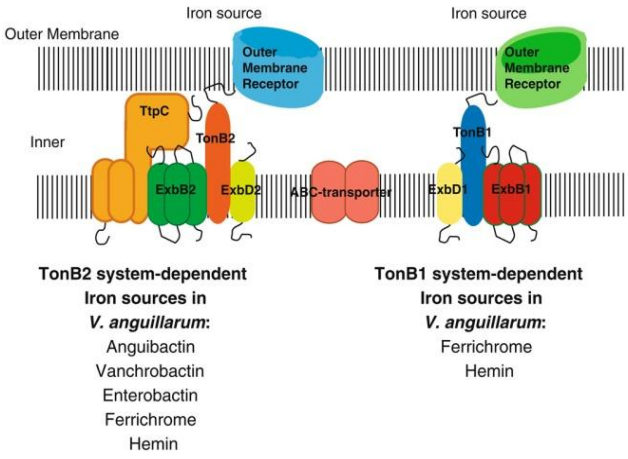

Figura I.17: Representación de los dos sistemas TonB en *V. anguillarum* (Kuehl & Crosa 2010).

Los dos sistemas TonB intervienen en el transporte activo de diversas fuentes de hierro como ferricromo y hemina, pero sólo el TonB2 actúa en el transporte de sideróforos como anguibactina, vancrobactina y enterobactina en *V. anguillarum* (Figura I.17). En general, TonB2 proporciona energía a un mayor número de transportadores que TonB1 (Kuehl & Crosa, 2010). En la familia *Vibrionaceae* se ha localizado un tercer sistema, el TonB3, cuyos genes *tonb3, exbD3*, *exbB3* y *ttpC3* forman también un operón. Aunque la función del TonB3 no está muy clara, en *Pseudomonas aeruginosa* lo relacionan con la producción de pili y la motilidad (Huang et al., 2004). Se ha demostrado que en *Campylobacter jejuni* existe un receptor de enterobactina (CfrA) que es dependiente de TonB3 (Naikare et al., 2013).

Las diferentes especies de *Vibrio,* además de producir sus propios sideróforos, tienen la capacidad de utilizar sideróforos producidos por otras especies del género e incluso los producidos por otras especies bacterianas y fúngicas, son los llamados xenosideróforos (sideróforos exógenos) (Kuehl & Crosa 2010). En *V. cholerae* existen dos sistemas de transporte de estos sideróforos exógenos, que también utilizan

receptores dependientes de TonB, como el sistema de transporte de ferricromo (*fhuABCD*) o de enterobactina (IrgA y *vctPDGC*) (Wyckoff et al., 2007).

Transportadores-ABC: Para atravesar la membrana interna se necesitan una permeasa y una ATPasa acoplada a un transportador de tipo ABC, que son los responsables del transporte activo de sideróforos, grupo hemo, citrato férrico y vitamina B12. Los transportadores ABC constan de tres componentes que normalmente están codificados por genes que se encuentran aguas arriba en el mismo operon que el gen del receptor. Un ejemplo es el sistema de transporte de ferricromo en *E. coli*, cuyo sistema de transporte está codificado por los genes *fhuABCD,* donde FhuA es el receptor y FhuBCD los componentes del transportador ABC (Koster & Braun, 1989). La proteína FhuD se encuentra en el espacio periplásmico y forma parte de las denominadas proteínas periplásmicas de unión (PBP) y determinan la dirección del transporte. La proteína FhuB, el transportador ABC, es muy hidrofóbica, se encuentra dentro de la membrana citoplasmática y presenta dos dominios que delimitan un canal por donde pasará el complejo hacia el citoplasma. FhuC es una ATPasa que se encarga de la unión e hidrólisis de ATP, proporcionando energía para el transporte a través de FhuB (Koster, 2001).

Hay algunos casos en los que el hierro también puede ser liberado del sideróforo en el espacio periplásmico, como en el caso de la pioverdina de *P. aeruginosa*, en la que el hierro se libera del sideróforo por un mecanismo que no requiere la modificación química del mismo (Yeterian et al., 2010) (Figura I.18).

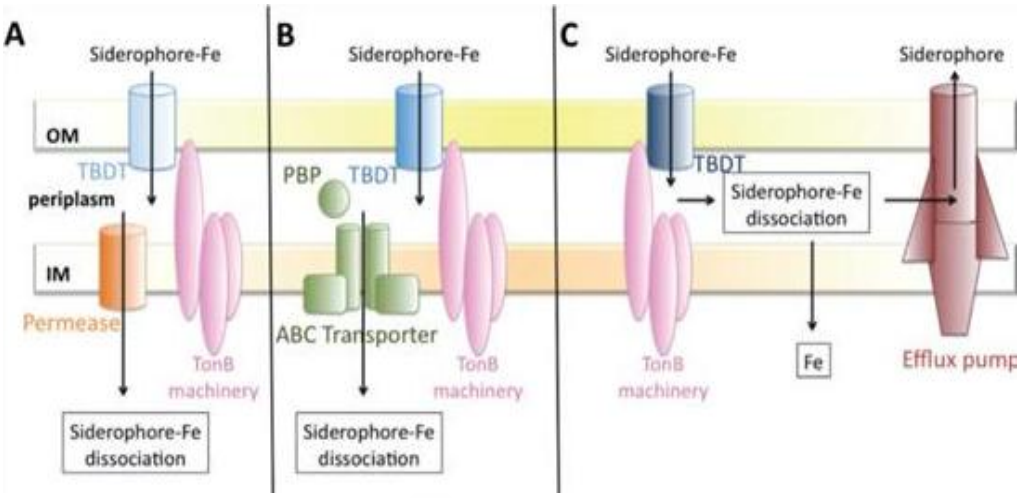

Figura I.18: Diferentes mecanismos y estrategias para el transporte de sideróforos en bacterias Gram-negativas. Todos (A, B y C) tienen en común el paso a través de la membrana externa, después de la unión específica a un receptor TBDT. En lo que difieren es en el paso a través de la membrana interna: A y B, el hierro puede separarse del sideróforo en el citoplasma (ferricromo y enterobactina en *E. coli*), o C, en el periplasma (pioverdina en *P. aeruginosa*) (Schalk et al., 2011).

4.4 El hierro en el citoplasma bacteriano

Una vez en el citoplasma el hierro Fe^{+3} debe ser liberado del complejo hierro-sideróforo. Así el metal puede ser almacenado o utilizado en el metabolismo y el sideróforo volverá a reutilizarse, siendo enviado de nuevo al exterior a través de un sistema de secreción. La liberación del Fe^{+3} tiene lugar mediante el uso de reductasas o a través de la hidrólisis del sideróforo.

Las ferri-reductasas han sido identificadas en un gran número de bacterias como *E. coli* (Fischer et al., 1990) o *P. aeruginosa* (Cox, 1980). En todos los casos el donador en la reducción es el NADH o NADPH y la reacción es la siguiente:

$$Fe^{+3}\text{-sideróforo} + NAD(P)H \rightarrow Fe^{+2} + NAD(P)^{+}$$

El Fe^{+2} liberado es almacenado en bacterioferritinas, incorporado a los anillos de porfirina por ferroquelatasas o incorporado a apoproteínas.

En algunos casos la liberación del ión Fe^{+3} no es posible vía reductasas, debido a que los sideróforos poseen un potencial redox muy negativo y la reacción no es favorable energéticamente. En este caso actúa una enzima denominada esterasa que cataliza la degradación del sideróforo por hidrólisis de los enlaces éster (Ratledge &

Dover, 2000). En el caso del sideróforo enterobactina la esterasa Fes es esencial para la utilización del hierro captado mediante este sistema (Brickman & McIntosh, 1992).

5 Homeostasis del hierro y regulación transcripcional

La homeostasis es una propiedad de los organismos vivos que consiste en su capacidad para mantener una condición interna estable, compensando los cambios en su entorno mediante el intercambio regulado de materia y energía con el exterior.

5.1 Regulación transcripcional mediante la proteína Fur

Las bacterias controlan la concentración del hierro en el interior celular a través de la regulación transcripcional de los genes que suelen actuar en la homeostasis del hierro. Esta regulación se lleva a cabo mediante una proteína denominada Fur (*Ferric-uptake regulator*), que actúa como regulador transcripcional. El complejo Fur-Fe^{+2} normalmente se une a una secuencia nucleotídica entre las posiciones -10 y -35 del promotor de los genes. Estas secuencias están formadas por unas 19 pb y normalmente son secuencias palindrómicas que se conocen con el nombre de "caja fur" (*Fur-box*) (Figura I.19) (Andrews et al., 2003). Fur es una molécula homodímera, compuesta por dos subunidades de 17 kDa, que actúa como un represor positivo, es decir, que cuando la concentración de Fe^{+2} aumenta en el citoplasma reprime la transcripción tras la interacción con su cofactor Fe^{+2} (un Fe^{+2} por subunidad de Fur) (Figura I.20). El número de moléculas de la proteína Fur puede ser del orden de 5.000 unidades por célula.

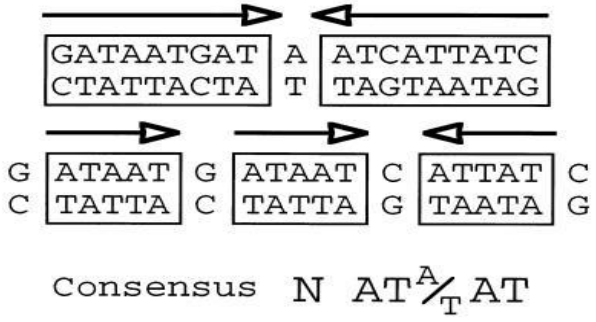

Figura I.19: interpretaciones alternativas de la secuencia de 19 pb denominada caja fur. (Escolar, 1999).

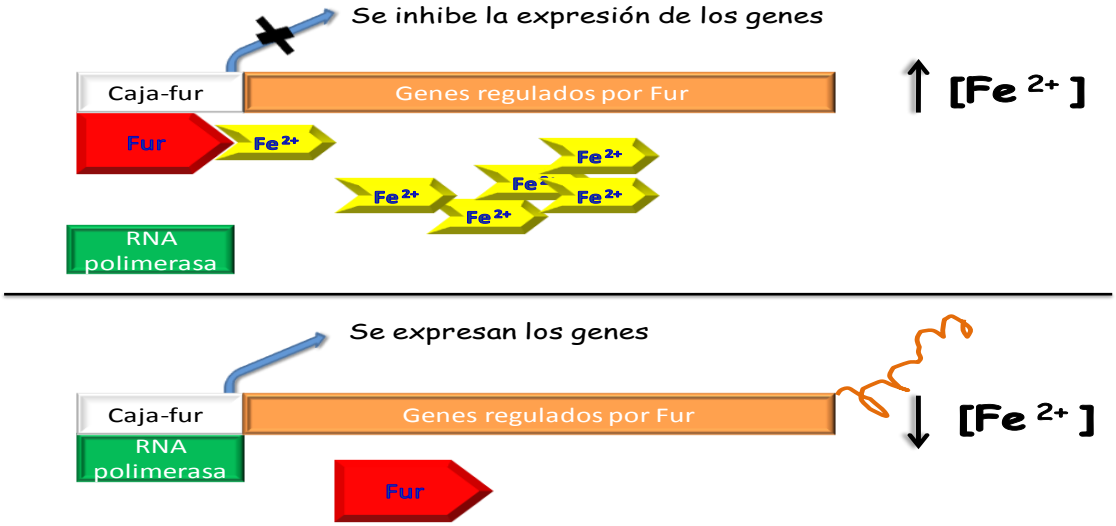

Figura I.20: La regulación de los genes relacionados con la homeostasis del hierro se lleva a cabo por el represor Fur. (A) Bajo condiciones de alta concentración de hierro, la proteína Fur se une al hierro adquiriendo una configuración capaz de unirse a la secuencia de ADN conocida como Caja fur, e inhibiendo la transcripción de los genes, (B) por el contrario cuando la concentración de hierro es baja, la ARN-polimerasa puede acceder al promotor y los genes son expresados.

El gen que codifica la proteína Fur ha sido caracterizado en las dos subespecies de *P. damselae* (Juiz-Rio et al., 2004).

5.2 Genes regulados por Fur

Se ha demostrado que todos los genes que forman parte de la homeostasis del hierro son regulados a través de la proteína Fur (Bagg & Neilands, 1987), como el receptor de ferricromo FhuA, el sistema de captación del citrato férrico FecABCD o la esterasa Fes de *E. coli* (Hantke, 1984), el receptor de la vulnibactina VuuA o del grupo hemo HupA en *V. vulnificus* (Carpenter & Whitmire, 2009), proteínas del sistema de transporte del ión ferroso FeoAB *en Y. pestis* (Gao et al., 2008) o las proteínas TonB1, TonB2, ExbB2, ExbD2 e Irp2 (péptido sintetasa del sistema de síntesis del sideróforo) en *P. damselae* subsp. *piscicida* (Osorio et al., 2004). Pero la proteína Fur no sólo regula genes relacionados con el metabolismo del hierro, sino que es también represor de procesos celulares tan variados como la respuesta a pH ácido (Hall, Foster 1996), defensa contra los radicales de oxígeno (Niederhoffer et al., 1990), quimiotaxis (Karjalainen et al., 1991), rutas metabólicas (Tolmasky et al., 1995) y producción de toxinas y otros factores de virulencia; de hecho la regulación de los factores de

virulencia por el hierro tiene sentido dada la escasa disponibilidad de éste en los fluidos y tejidos del huésped. Los mutantes deficientes en Fur, presentan en general una menor eficiencia en la colonización y una menor virulencia en experimentos con animales modelo (Carpenter et al., 2009). Fur regula negativamente la producción de la hemolisina HlyA en *V. cholerae* (Stoebner & Payne, 1988), también regula los genes *opA,* responsables de la interacción de la bacteria *Neisseria gonorrhoeae* con las células humanas (Sebastian et al., 2002), la toxina Shiga SltA y SltB, una adhesina fimbrial en *E. coli* (Calderwood & Mekalanos, 1987) o la citotoxina VacA en *H. pylori* (Gancz et al., 2006).

Aunque el papel de Fur como un represor está bien documentado, evidencias recientes demuestran que Fur puede funcionar también como un activador a través de tres vías: (1) indirectamente a través de ARN pequeños (ARNs) (Masse et al., 2007), (2) la unión a elementos reguladores *cis* que mejoran la unión de la holoenzima de ARN polimerasa (RNAP) (Ishihama, 1992) y (3) puede funcionar como un antirepressor mediante la eliminación o el bloqueo de la unión al ADN de un represor de la transcripción (Nandal et al., 2010). Durante el estrés redox se aumenta la concentración de Fur consiguiendo el aumento del transporte de hierro hacia los lugares de almacenamiento, disminuyendo así los niveles de hierro libre en el citoplasma y evitando su toxicidad (Andrews et al., 2003). Como ejemplos de regulación positiva podemos citar el gen *ftnA* de *E. coli*, que codifica una proteína de almacenamiento de hierro en donde la proteína Fur actúa como activador (Abdul-Tehrani et al., 1999), la bacterioferritina Bfr, que almacena hierro en *P. aeruginosa* (Wilderman et al., 2004), los genes metabólicos *sdhCDAB* que codifican una succinato deshidrogenasa (Park et al.,1995), el gen *sodB* que codifica una superóxido dismutasa (Fee, 1991) en *E. coli* y en *N. gonorrhoeae* (Sebastian et al., 2002), o el gen *norB* que codifica una reductasa de óxido nítrico. También puede activar la regulación de factores de virulencia como la proteína HilD, que activa la expresión del sistema de secreción de tipo 2 (SST2) en *Salmonella enterica* (Teixido et al., 2011).

6 Mecanismos de asimilación del hierro en *Photobacterium damselae*

Estudios previos han demostrado la capacidad de las cepas de *Photobacterium damselae* para captar hierro a partir de hemina, hemoglobina y el citrato férrico-amónico (Fouz et al., 1994; Magariños et al., 1994). Se han descrito en las dos subespecies 10 genes que codifican proteínas pertenecientes al sistema de captación del grupo hemo: las proteínas HutZ, HutX y HutW; los tres componentes del sistema TonB: TonB, ExbB y ExbD, los componentes del transportador ABC: HutBCD y el receptor de membrana HutA. Análisis transcripcionales demostraron la existencia de tres unidades transcripcionales reguladas por hierro. Aunque estos genes se han caracterizado en la subespecie *piscicida*, muestran una elevada similitud con los de la subespecie *damselae* (Rio et al., 2005). Se ha podido demostrar además la expresión *in vivo* en las cepas patógenas de los genes de captación del grupo hemo durante el proceso infeccioso en el pez (Osorio et al., 2010).

Posteriormente se demostró asimismo que todas las cepas de *Photobacterium damselae*, incluso las no virulentas, podían crecer en condiciones de déficit de hierro y, utilizar el hierro unido a la transferrina, lo que sugería la existencia de mecanismos de captación basados en la síntesis de sideróforos (Magariños et al., 1994; Fouz et al., 1997). Utilizando el método de CAS en placa todas las cepas de la subespecie *damselae* dieron resultados positivos en la producción de sideróforos. Se ha sugerido que pueden producir un sideróforo de tipo hidroxamato debido a la capacidad que tienen las cepas de esta subespecie de promover el crecimiento de cepas indicadoras deficientes en la síntesis de hidroxamatos (Fouz et al., 1997). Por otra parte, los ensayos de inducción de proteínas de membrana en medios con déficit de hierro mostraron la presencia de tres proteínas reprimidas por hierro que podrían estar implicadas en el sistema de captación del sideróforo en la subespecie *damselae* (Fouz et al., 1997).

P. damselae subsp. *piscicida* presenta un operón de 11 genes denominados *irp* (*iron regulated protein*) de síntesis y transporte de un nuevo sideróforo similar a la yersiniabactina, y que se encuentran localizados en una estructura típica de isla de patogenicidad (IPA) (Osorio et al., 2006). Posteriormente se determinó la estructura y el

ensamblaje biosintético de este nuevo sideróforo al que se denominó piscibactina (Souto et al., 2012), un sideróforo de tipo fenolato cuya síntesis se lleva a cabo mediante un sistema de enzimas NRPS (Figura I.21). Más tarde se descubrió que la IPA formaba parte de un plásmido de 68 Kb, pPHDP70, relacionado con la virulencia de esta subespecie en peces (Osorio et al., 2015).

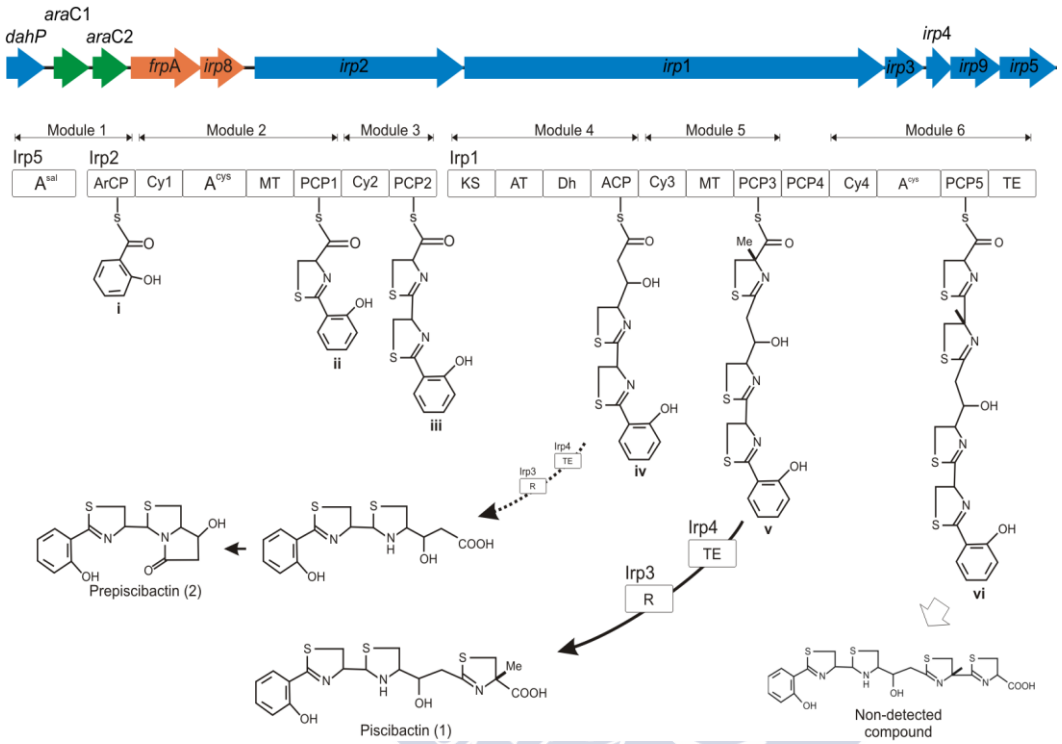

Figura I.21: Modelo del proceso de biosíntesis de piscibactina (Souto et al., 2012).

Sin embargo no todas las cepas contienen este plásmido, estando presente únicamente en las de la subespecie *piscicida* de origen europeo, y ausente en las cepas de origen japonés y americano, así como en todas las cepas de la subespecie *damselae*. Estas cepas que carecen del plásmido pPHDP70 deben poseer por tanto un sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos de estructura desconocida y cuya base genética no ha sido tampoco caracterizada hasta la fecha.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

II. OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Según los antecedentes bibliográficos mencionados en el capítulo anterior, los mecanismos de asimilación de hierro mediante sideróforos que utiliza *Photobacterium damselae* subsp*. damselae* son, en gran medida, desconocidos hasta el momento, tanto en lo que se refiere a la naturaleza del sideróforo o sideróforos sintetizados como a su base genética.

Por ello, en este trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

(1) Estudiar la capacidad de crecimiento en condiciones de limitación de hierro de las diferentes cepas de *P. damselae* subsp*. damselae* y su relación con la producción de sideróforos.

(2) Identificar y caracterizar estructural y funcionalmente los distintos genes involucrados en la síntesis y transporte de sideróforos en esta subespecie, así como su posible papel en la virulencia para peces.

(3) Aportar los datos genéticos y biológicos que faciliten la determinación de la naturaleza química de los sideróforos producidos por las cepas de *P. damselae* subsp*. damselae*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

III. MATERIAL Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1 Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo

En la Tabla III.1 se describen las cepas d*e P. damselae* subsp. *damselae* de distintas fuentes y orígenes de aislamiento que se han utilizado en este trabajo y en la Tabla III.2 se relacionan las cepas, plásmidos y sus derivados empleados en los experimentos genéticos que se llevaron a cabo. De manera rutinaria las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* se cultivaron a 25 ºC en el medio Agar de Soja y Triptona (Cultimed) suplementado con un 1% (p/v) de NaCl (TSA-1) y en el medio líquido Caldo de Soja y Triptona (Cultimed) suplementado con un 1% (p/v) de NaCl (TSC-1). Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio agar/caldo Luria Bertani (LB) (Pronadisa) suplementado con el antibiótico adecuado cuando se requería. Tanto las cepas utilizadas como sus derivados se conservaron a -80 ºC en LB líquido con un 20% (v/v) de glicerol.

En algunos de los ensayos descritos a continuación se utilizó el medio mínimo CM9 (Lemos et al., 1988) con la siguiente composición: Sales M9 (Na_2PO_4H 6 g/l; KPO_4H_2 3 g/l; NaCl 5 g/l; NH_4Cl 10 mg/l); glucosa 0,25%; casaminoácidos 0,2%; $CaCl_2$ 0,01 mM y $MgSO_4$ 0,1 mM.

Los antibióticos se utilizaron a unas concentraciones finales de: Ampicilina (Amp) 50 µg/mL (disolución stock 50 mg/mL en agua); Kanamicina (Kan) 50 µg/mL (disolución stock 50 mg/mL en agua); Rifampicina (Rif) 50 µg/mL (disolución stock 25 mg/mL en DMSO). Todas las disoluciones de antibióticos se esterilizaron mediante filtración utilizando filtros de 0,2 µm y se guardaron a 4 ºC.

Todas las medidas de crecimiento en medio líquido se realizaron mediante la determinación de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Hitachi U-2000.

Tabla III.1: Cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Origen	Hospedador	Referencia
ATCC33539	EE.UU.	Pez ángel (*Chromis punctipinnis*)	Cepa de referencia
RG-91	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	(Fouz et al., 1992)
LD-07	España	Dorada (*Sparus aurata*)	(Vera et al., 1991)
RM-71	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	(Fouz et al., 1992)
RG-214	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	(Fouz et al., 1992)
CDC2227-81	EE.UU.	Humano	CDC, Atlanta, USA
ATCC35083	EE.UU.	Tiburón (*Carcharhinus plumbeus*)	Cepa de referencia
ACR208.1	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	Colección del laboratorio
VIRO-RIÑÓN	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	Colección del laboratorio
AZ247.1	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	Colección del laboratorio
AZ245.1	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	Colección del laboratorio
ACRp-72.1	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	Colección del laboratorio
TW294 L2	España	Lubina (*Dicentrarchus labrax*)	Colección del laboratorio
TW250/03	España	Dorada (*Sparus aurata*)	Colección del laboratorio
TW462/02.1	España	Dorada (*Sparus aurata*)	Colección del laboratorio
J3G-801	Taiwán	Langostino (*Penaeus monodon*)	(Song et al., 1993)
238	EE.UU.	Delfín (*Tursiops truncatus*)	Colección del laboratorio
158	Bélgica	Anguila (*Anguilla anguilla*)	Colección del laboratorio
162	Bélgica	Anguila (*Anguilla anguilla*)	Colección del laboratorio
192	EE.UU.	Delfín (*Tursiops truncatus*)	Colección del laboratorio
RG-153	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	(Fouz et al., 1992)
309	España	Mejillón (*Mytilus edulis*)	Colección del laboratorio
PG-801	Taiwán	Langostino (*Penaeus monodon*)	(Song et al., 1993)
430	España	Agua de mar	Colección del laboratorio
ACRp72.1	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	Colección del laboratorio
H22060601R	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	(Labella et al., 2010b)
H01100403DI	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	(Labella et al., 2010b)
H29060602R	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	(Labella et al., 2010b)
C11080601R	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	(Labella et al., 2010b)
D20040408U	España	Dorada (*Sparus aurata*)	(Labella et al., 2010b)
H09060401H	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	(Labella et al., 2010b)
H29040401H	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	(Labella et al., 2010b)
H14060501H	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	(Labella et al., 2010b)
H011004020	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	(Labella et al., 2010b)
LB07070501R	España	Lubina (*Dicentrarchus labrax*)	(Labella et al., 2010b)
S04070503C	España	Sargo (*Diplodus sargus*)	(Labella et al., 2010b)
LCA24907	España	Barramundi (*Lates calcarifer*)	(Labella et al., 2010b)
H14060501B	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	(Labella et al., 2010b)
H14060501R	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	(Labella et al., 2010b)
H161203H	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	(Labella et al., 2010b)
9FT1M-3	EE.UU.	Tiburón (*Carcharhinus sp.*)	Donada por Grimmes, J.
RS80L1V1	EE.UU.	Pargo rojo (*Lutjanus campechanus*)	Donada por Grimmes, J.
ST-1	EE.UU.	Trucha	Donada por Grimmes, J.
RS78SPL1	EE.UU.	Pargo rojo (*Lutjanus campechanus*)	Donada por Grimmes, J.
9FT2B-2	EE.UU.	Tiburón (*Carcharhinus sp.*)	Donada por Grimmes, J.

Tabla III.2: Cepas y plásmidos utilizados en el trabajo.

Cepas/plásmidos	Característica(s) relevante(s)	Referencia
P. damselae* subsp. *damselae		
BP10	RM71 *ΔVDA_839*, Rif^r	Este trabajo
BP13	RM71 *ΔVDA_1206-1208* , Rif^r	Este trabajo
BP14	RM71 *ΔfhuE* , Rif^r	Este trabajo
BP18	RM71 *ΔtonB1*, Rif^r	Este trabajo
BP19	RM71 *ΔtonB2* , Rif^r	Este trabajo
BP22	RM71 *ΔfhuE ΔVDA_839*, Rif^r	Este trabajo
BP25	RM71 *ΔtonB1 ΔtonB2*, Rif^r	Este trabajo
BP32	RM71 *ΔtonB1ΔtonB2ΔtonB3*, Rif^r	Este trabajo
BP36	RG91 *ΔtonB1 ΔtonB2*, Rif^r	Este trabajo
BP52	RG91 *ΔpvsD* , Rif^r	Este trabajo
BP54	RG91 *ΔpvuA*, Rif^r	Este trabajo
BP56	RM71 con mini-Tn*10 VDA_461::*Tn*10,* Kan^r, Rif^r	Este trabajo
BP57	RM71 con mini Tn*10 vieA::*Tn*10,* Kan^r, Rif^r	Este trabajo
BP60	RM71 con mini-Tn*10 hisH::*Tn*10,* Kan^r, Rif^r	Este trabajo
BP62	RM71 *ΔaroA-trpCDEB,* Kan^r, Rif^r	Este trabajo
V. alginolyticus		
AR13	TA15 *ΔpvsA*	Colección del laboratorio
E. coli		
DH5α	supE4 *ΔlacU169* (Φ80lacZΔM15) *hsd* R17 redA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Colección de laboratorio
S17-1-λpir	*recA, thi, pro hsdR*-M+RP4*: 2-Tc:Mu:Km Tn7 λ*pir, Tp^R Sm^R	(Herrero et al., 1990))
XL1-Blue MR	Δ(*mcrA*) 183Δ(*mcrCB-hsdSmr-mrr*) 173 *endA1 supeE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac*	Stratagene
Plásmidos		
pWKS30	Vector de clonación de bajo número de copia, Amp^R	(Wang & Kushner, 1991)
pT7-7	Vector de clonación, Amp^R	(Tabor & Richardson, 1985)
pNidkan	Plásmido suicida derivado de pCVD442, pir, Kan^r	(Mouriño, et al., 2004)
SuperCos	Vector cosmídico, Amp^r Kan^r	Stratagene
pUC118	Vector de clonación, Amp^R	(Vieira & Messing, 1987)
pLOF-Km	Mini-Tn*10* transposon, Km^r	(Herrero et al., 1990)
BPcos194	Cósmido que contiene *pvsD*, Km^r, Amp^r	Este trabajo
pBP07	Construcción para mutar el gen *VDA_839* clonada en pNidkan, Km^r	Este trabajo
pBP29	Construcción para mutar el gen *tonB1* clonada en pNidkan, Km^r	Este trabajo
pBP30	Construcción para mutar el gen *tonB2* clonada en pNidkan, Km^r	Este trabajo
pBP37	Construcción para mutar el gen *tonB3* clonada en pNidkan, Km^r	Este trabajo
pBP17	Construcción para mutar los genes *ΔVDA_1206-1208* clonada en pNidkan, Km^r	Este trabajo
pBP78	Construcción para mutar el gen *pvsD* clonada en pNidkan, Km^r	Este trabajo
pBP79	Construcción para mutar el gen *pvuA* clonada en pNidkan, Km^r	Este trabajo
pBP80	Construcción para mutar los genes *aroA-trpCDEB* clonada en pNidkan, Km^r	Este trabajo

2 Purificación de ADN

Los protocolos básicos de manipulación del ADN se realizaron como se describen en Sambrook & Russell (2001). Las extracciones de ADN genómico se efectuaron con el *Easy-DNA kit* (Invitrogen) y el kit *G NOME®DNA KIT* (MP Biomedicals). Para la purificación rutinaria de cósmidos, plásmidos y limpieza de restricciones y productos de PCR se utilizaron los *Kits* de Thermo Scientific: *GeneJET™ Purification Kit, GeneJET™ Plasmid Miniprep kit y GeneJET™ Gel Extraction kit y* de Roche*: Genopure Plasmid Midi Kit.*

3 Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25 o 50 µL, utilizando 1 U de la Taq polimerasa *KAPA Taq* (Kapa Biosystems), con tampón de PCR 10X que contiene 2 mM de $MgCl_2$, 200 µM de cada desoxinucleótido 5´trifosfato (dNTPs) y 10 µM de cada cebador. Dependiendo de la Tm de cada pareja de cebadores las temperaturas de hibridación oscilaron entre 55 y 60ºC. Los tiempos de elongación utilizados se seleccionaron en función del tamaño esperado del amplicón (1 min kb^{-1}). En los casos en los que era conveniente que nuestro amplicón no contuviese mutaciones puntuales, como pueden ser los fragmentos que formarían parte de la construcción para realizar mutantes, fue necesario utilizar 1 U de Taq polimerasa *KAPA HiFi™ PCR Kit* (Kapa Biosystems), tampón 5X *KAPA HiFi* que contenía 2 mM de $MgCl_2$, 0,3 mM de cada dNTP y 0,3 µM de cada cebador; en este caso las temperaturas de hibridación oscilaron entre 65 y 72 ºC y el tiempo de elongación 15-30 s kb^{-1}. Las PCR se llevaron a cabo en un termociclador *Mycycler Thermal Cycler* (Bio-Rad). Para amplificar por PCR amplicones de más de 6 kb se utilizó el kit *Expand Long Template PCR System* (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Según el tamaño a amplificar se variaron las concentraciones finales de cada componente y el tiempo de elongación.

En todos los casos se incluyeron controles negativos para garantizar la ausencia de ADN en los componentes de PCR utilizados y cuando fue posible, se incluyeron también controles positivos para asegurar que las condiciones empleadas eran las adecuadas y descartar falsos negativos.

Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 0,5 - 2%, según el tamaño del fragmento, con tampón TAE 1X (Tris 40 mM, EDTA 0,5 mM a pH 8,0) y una concentración de 0,5 µg/mL de *Realsafe Nucleic Acid Staining Solution* (Intron biotechnology). Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Gelprinter Plus), a una longitud de onda de 254 nm.

4 Clonación de fragmentos de ADN

Para las reacciones de clonación se utilizaron fragmentos derivados de la digestión con enzimas de restricción y plásmidos previamente cortados y tratados con fosfatasa alcalina (Thermo Scientific), los fragmentos digeridos se limpiaron con el *GeneJET™ Purification Kit* (Thermo Scientific) o bien, en el caso de obtener múltiples fragmentos de amplificación, los fragmentos de interés se purificaron con el *GeneJET™ Gel Extraction kit* (Thermo Scientific) tras su separación electroforética en geles de agarosa.

La relación molar inserto/vector utilizada en la reacción de ligación fue 3:1, para un volumen final de 20 µL con 1 U de ADN ligasa T4 y 2 µL de tampón de reacción 10X (Thermo Scientific). Las reacciones se incubaron a 4 ºC durante toda la noche y se dializaron con filtros de membrana de 0,025 µm (Millipore) durante 15 min previamente a su transformación en las cepas correspondientes de *E. coli*. Los clones recombinantes se seleccionaron en base al marcador de resistencia codificado por el vector (Figura III.1) y se confirmaron por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

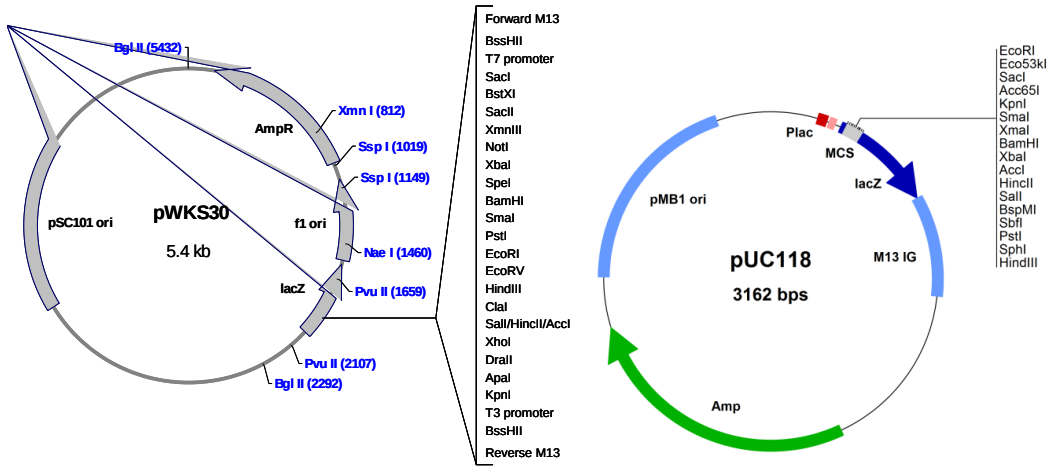

Figura III.1: Mapa de restricción de los principales vectores de clonación utilizados en este trabajo. Todos ellos se caracterizan por llevar genes que confieren resistencia específica a uno o más antibióticos, de modo que los clones recombinantes puedan ser fácilmente aislados a partir de su siembra en medios selectivos.

5 Transformación por electroporación

Para la obtención de células electrocompetentes de *E. coli* se partió de 30 mL de un cultivo en medio LB de la cepa correspondiente (DH5α o S17-1-λ*pir*) incubada a 37 ºC en agitación (150 rpm) hasta alcanzar una DO_{600} entre 0,2 y 0,4. Tras centrifugar a 4.000 g durante 20 min (4 ºC), se hicieron 2 lavados con 10 mL de agua ultrapura (*Milli-Q*, Millipore) estéril y previamente enfriada en hielo. Tras una nueva centrifugación, las células se resuspendieron en 10 mL de glicerol al 10%. Finalmente, esta suspensión se centrifugó a 4.000 g 10 min (4 ºC) y las células se resuspendieron en 1 mL de glicerol al 10%. La suspensión final se repartió en alícuotas de 50 µL que se guardaron a -80 ºC.

Para la transformación se añadieron 20 µL de la reacción de ligación previamente dializada a los 50 µL de las células electrocompetentes en una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad). La transformación se llevó a cabo en un electroporador *Gene Pulser* (Bio-Rad) ajustado con los siguientes parámetros: voltaje de 2,5 kV, resistencia a 200 Ω, 25 µF de capacitancia, con pulsos de 5 ms de duración.

Por último se añadió 1 mL de medio LB y se incubó a 37 ºC durante 1 h en agitación continua a 150 rpm. La mezcla se sembró en placas de LB suplementadas con

los antibióticos apropiados, según la resistencia conferida por el plásmido, y con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) 0,5 mM y X-gal 40 µg/mL. Las colonias de coloración blanca, potencialmente transformantes, se reaislaron para su confirmación.

6 Obtención de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina

Debido a la ausencia de resistencias estables en las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* utilizadas en este trabajo, fue necesario contar con algún fenotipo específico que nos permitiese seleccionar dichas cepas para realizar la mutagénesis por intercambio alélico. Para ello, se procedió a la obtención de un mutante espontáneo de resistencia al antibiótico rifampicina. Para el aislamiento del mutante se utilizó la técnica de gradiente en placa utilizando un gradiente de rifampicina de 0 a 100 µg/mL.

Las cepas se cultivaron durante 18 h a 25 ºC en agitación (150 rpm) en 5 mL de medio TSC-1 y se sembraron alícuotas de 0,1 mL en las placas con gradiente de rifampicina, incubándolas durante 36 h a 25 ºC. Las colonias obtenidas se sembraron en una nueva placa con gradiente de rifampicina para estimar el grado de resistencia al antibiótico y se incubaron de nuevo a 25 ºC durante 36 h.

7 Mutagénesis por intercambio alélico

La obtención de mutantes para los genes a estudiar en este trabajo se realizó utilizando la técnica de "*knock-out*" por intercambio alélico. Esta técnica consiste en el intercambio de la copia nativa del gen a mutar por una que contiene una deleción de la región central del gen. Se amplificaron por PCR aproximadamente 2 kb de los extremos 3' y 5' de cada gen junto con las regiones flanqueantes con KAPA *HiFi*^{TM} *PCR Kit* (Kapa Biosystems), de tal manera que al pegar cada extremo tengamos una mutación no polar por deleción del 90% del gen. Los cebadores utilizados para amplificar los extremos de cada gen, junto con las regiones flanqueantes, se numeran del 1 al 4. A cada cebador se le añade a modo de adaptador la secuencia diana de una enzima de restricción que garantizarán la correcta orientación de los fragmentos. Los

adaptadores 2 y 3 contienen igual diana de restricción (Tabla III.3). Ambos fragmentos (región 3´y 5´de cada gen) se clonan en el plásmido pWKS30 de modo secuencial utilizando la cepa electrocompetente *E. coli* DH5α. La construcción se libera del pWKS30 con *Not*I-*Apa*I (New England BioLabs) y se liga al vector suicida pNidKan (Figura III.2) linearizado con las mismas enzimas (Mouriño et al., 2004). El pNidKan, como derivado del pCVD442, contiene el origen de replicación R6K que requiere el gen *pir*, por eso se transforma en *E. coli* S17-1-λ*pir*; y el gen *sacB* que confiere sensibilidad a la sacarosa. Tras la conjugación de *E. coli* S17-1-λ*pir* y la cepa de *P. damselae* subsp. *damselae* Rif^r (ver apartado 6) en placas de Agar-Sangre (Oxoid) los exconjugantes se seleccionaron en placas de TSA-1 con los antibióticos Kan (pNidKan) y Rif.

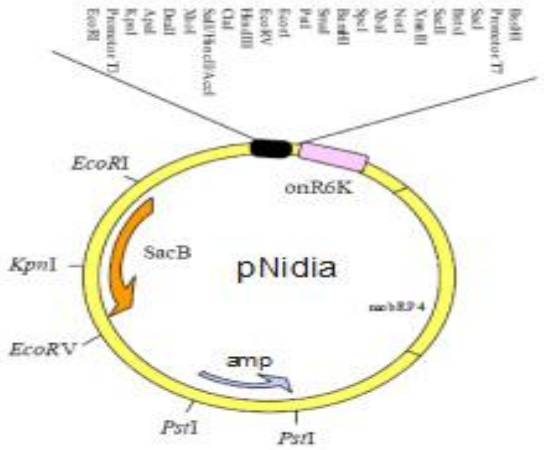

Figura III.2: Mapa del vector suicida pNidia, que al igual que el pNidkan es un plásmido derivado del pCVD442 (Donnenberg, 1991).

La característica primordial del plásmido utilizado es su incapacidad para replicarse en *P. damselae* subsp. *damselae,* al carecer ésta del gen λ*pir*, de modo que únicamente se perpetuará cuando se integre en el cromosoma bacteriano por un proceso de recombinación entre secuencias homólogas.

Se necesita un segundo evento de recombinación para que se libere el plásmido suicida (pNidKan), y con ello arrastre la copia completa y así dejar la copia delecionada en *P. damselae* subsp. *damselae*. Una vez integrada la construcción en el cromosoma, en el 50% de los casos la segunda recombinación sucederá en la misma región; en estos casos se libera el pNidKan junto con la versión delecionada, pero en el otro 50% de los casos la recombinación se producirá en el otro fragmento, con lo que el plásmido arrastrará la copia intacta de gen, dejando la copia delecionada en el cromosoma (Figura III.3). Tras realizar unos 5-6 pases en TSC-1, sin presión selectiva con kanamicina, se plaquean diluciones en LB suplementado con 15% de sacarosa. Las

células capaces de formar colonias son aquellas que han perdido el pNidKan y con ello el *sacB*. Se comprueba por PCR qué colonia es revertiente y cuál es mutante; habitualmente se utilizan los cebadores que amplifiquen unas pares de bases aguas arriba y abajo de la zona deleccionada (Tabla III.3), con lo que los mutantes darán productos de PCR de menor tamaño que los revertientes, que mostrarán tamaños similares a las zonas nativas del gen (Figura III.4).

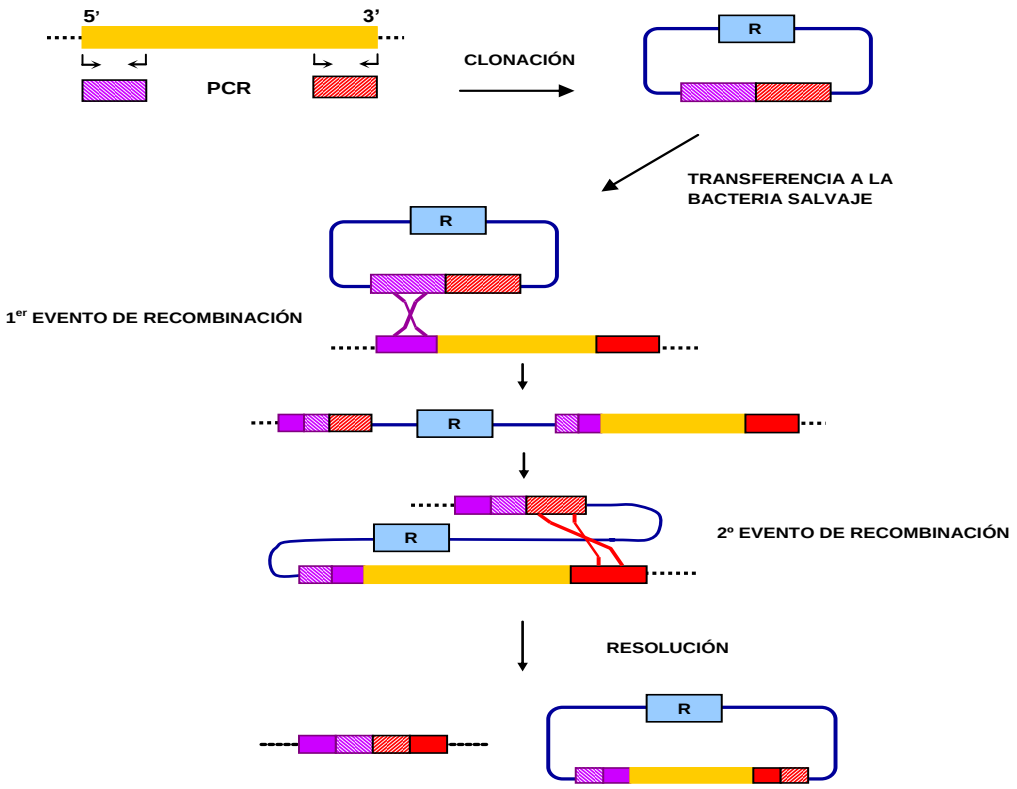

Figura III.3: Esquema del proceso de mutación por intercambio alélico: El alelo mutante se obtiene amplificando las regiones 5' y 3' del gen, y uniendo ambos fragmentos en un mismo plásmido. A través de esta construcción se facilita la transferencia de la copia delecionada a la bacteria. Tras un primer evento de recombinación entre las secuencias homólogas del gen salvaje y la copia mutante, el plásmido se inserta en el cromosoma bacteriano. Las colonias recombinantes son seleccionadas en base al marcador de resistencia a antibiótico del plásmido (R). Tras sucesivos ciclos de multiplicación se selecciona un segundo proceso de recombinación en el que, tras su resolución y en un 50% de los casos, el plásmido se libera del cromosoma y arrastra consigo la copia salvaje del gen. Una vez libre en el citoplasma, el vector se perderá en el momento de la división celular ya que, debido a su origen de replicación R6K, es incapaz de autoreplicarse en la bacteria. El resultado final de todo el proceso es la sustitución cromosómica del gen por su copia delecionada.

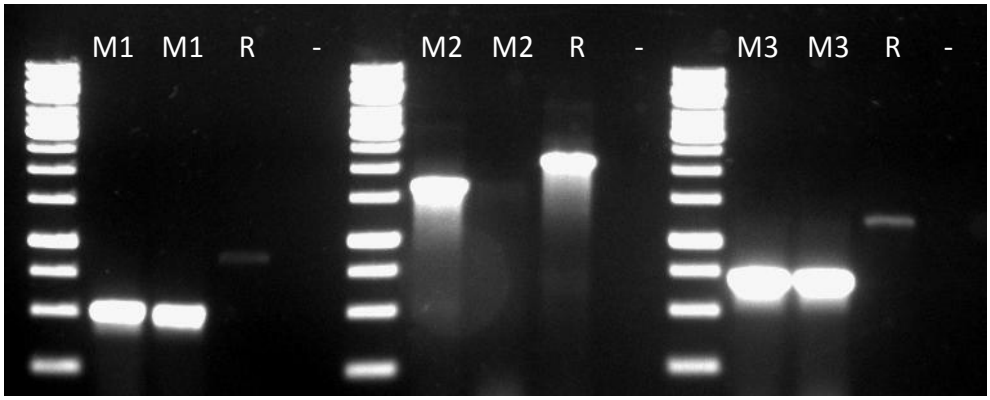

Figura III.4: Comprobaciones de tres mutantes por intercambio alélico, (M) mutante, (R) revertiente y (-) control negativo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla III.3: Cebadores utilizados en la construcción de mutantes.

Proteína (Gen)	Cebador	Nombre Cebador
RECEPTOR FERRICROMO (*fhuE*)	GCGGATCCATAATTTGACCAACCACTCC	FhuE mut1 BamHI
	GCCTGCAGGTGTTTGGTCTACTTATAAC	FhuE mut2 pstI
	GCCTGCAGCCGTAATCACGTCCCGTAAC	FhuE mut3 pstI
	GCGAATTCTGACCCCGACAAGATAGCCG	FhuE mut4 EcoRI
Comprobación mutante	TTCACCGATAGTAACCCCAGT	Fhue_bis1
	CAAAGAATGTAAATTAGAGTG	Fhue_bis2
TBDT (*VDA_839*)	GCTCTAGACGGTCTGGCAGCCATCAACG	VDA 839 mut1 XbaI
	GCGGATCCTCCCAACCTCGACACCTGTT	VDA 839 mut2 BamHI
	GCGGATCCGTTGTTACTTCGCTACCATA	VDA 839 mut3 BamHI
	GCCTCGAGTAGCGGAAAGTCTCAAGAGT	VDA 839 mut4 XhoI
Comprobación mutante	GTTTTAATTTGGAATCTATA	R-tonB_bis1
	ATATACCGTTAGATCTGACA	R-tonB_bis2
TRANSPORTADOR- ABC (*VDA_1206-1208*)	GCGGATCCAAGGAGCGAGCAATGAAAAT	VDA 1206-1208 mut1 BamHI
	TCCTTAGTGAATTCTTTAAAC	VDA 1206-1208 mut2EcoRI
	GCGAATTCTTATGGGGGATTGTTGCCGT	VDA 1206-1208 mut3 EcoRI
	GCCTCGAGATTATTTGTGGTCACTATGG	VDA 1206-1208 mut4 XhoI
Comprobación mutante	GATGAAGAGCTTGAAGGTATG	ABC_bis1
	CTGAAATTATGCAGCGACAAG	ABC_bis2
TONB1 (*tonB1*)	GCGGATCCATGTAAAGTTTAATAACTGG	TonB1 mut1 BamHI
	GCGAATTCCGGTTTGACTTCTGCTTTTG	TonB1 mut2 EcoRI
	GCGAATTCAGGTAATGGTTGAGATCTGG	TonB1 mut3 EcoRI
	GCCTCGAGGATGGTTGCCGCGGTTCTAG	TonB1 mut4 XhoI
Comprobación mutante	TCACTATTAATCGCTATTTTT	TonB1_bis1
	GCCAGGCCATAAGACCAAACT	TonB1_bis2
TONB2 (*tonB2*)	GCTCTAGAGTCAGCTGACGACATTGCAA	TonB2 mut1 XbaI
	GCGAATTCCGAGCACTTCGTAAATGGAA	TonB2 mut2 EcoRI
	GCGAATTCAAATGTAAACAAGCCACCCG	TonB2 mut3 EcoRI
	GCCTCGAGATGATAACGTCGTTGCTGAT	TonB2 mut4 XhoI
Comprobación mutante	TAGTTTGTCCTCTTGCATCA	TonB2_bis1
	CCGAAGTGTTGAGGCCCTTG	TonB2_bis2
TONB3 (*tonB3*)	GCTCTAGATATCTAACATGGATGTAAGA	TonB3 mut1 XbaI
	GCGGATCCTGGCAAAGTGTCGATGGTGA	TonB3 mut2 BamHI
	GCGGATCCTGTTTTACTTTCAATTGAAC	TonB3 mut3 BamHI
	GCGAATTCTTGCAGTTATTGATGAAAAG	TonB3 mut4 EcoRI
Comprobación mutante	TCATTTTGGCTAAAGCTTTTA	TonB3_bis1
	TACTGGGGTTACTATCGGTGA	TonB3_bis2
BIOSÍNTESIS (*aroA- trpBCDEG*)	GCGGATCCTCGCTATTATGCCAAAAATC	Anth_synt mut1 BamHI
	GCGAATTCAATACGTTCAACCCCTGGCA	Anth_synt mut2 EcoRI
	GCGAATTCGTTACCGATGATGAAGCCCTT	Anth_synt mut3 EcoRI
	GCCTCGAGCGCCTACTTCTTCTTGAGCA	Anth_synt mut4 XhoI
Comprobación mutante	GTATGGAGATCAAATAACATA	Anth_bis1
	CAGAGCATCAGCACCAGATTC	Anth_bis2
BIOSÍNTESIS VIBRIOFERRINA (*pvsD*)	GCGCGGCCGCAAAAGTGGAGGTGTATGCAT	pvsD mut1 NotI
	GCGGATCCTGTGAAATTGATGTACTAGA	pvsD mut2 BamHI
	GCGGATCCTTGATGGGGAAGATGAATGC	pvsD mut3 BamHI
	GCCTGCAGAAAATGACGTTAGCTATGAA	pvsD mut4 pstI
Comprobación mutante	GGGGCTTCACGTCGTCTTGAT	pvsD1_bis1
	ACCAACGGTGAGCAAATTATC	pvsD2_bis2
RECEPTOR VIBRIOFERRINA (*pvuA*)	CGTCTAGAATATGCACATCAAGAACTTGT	pvuA mut1 XbaI
	GCGGATCCACCTGTACTTAAATAGAAGTC	pvuA mut2 BamHI
	GCGGATCCAATGCAAACACTAGTGAAGAA	pvuA mut3 BamHI
	GCCTGCAGCTAATAAAACAATAGTGATGC	pvuA mut4 pstI
Comprobación mutante	CCCTTTAGTTTTAGCCACAGG	pvuA1_bis1
	CATGGAACTATCAATCTGACC	pvuA2_bis2

8 Ensayos de crecimiento en condiciones de limitación de hierro y producción de sideróforos

Para el estudio comparativo del crecimiento en diferentes condiciones de hierro de las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* patógenas para peces, se utilizaron distintas concentraciones del quelante de hierro 2,2´-dipiridil (TCI). Se inocularon 5 µL de cada cepa crecida en TSC-1 a 25º C durante 12 h en agitación a 150 rpm, en placas microtiter de 96 pocillos conteniendo cada uno 100 µL de medio mínimo CM9 suplementado con diluciones seriadas (30 a 60 µM) del quelante 2,2´-dipiridil. Las placas se incubaron a 25 ºC durante 24 h en agitación (150 rpm). El crecimiento en cada pocillo se midió por la DO_{600} mediante un lector de placas microtiter *infinite®F200* (Tecan).

Para determinar la capacidad de crecimiento de los mutantes por deleción, se realizaron curvas de crecimiento en condiciones restrictivas de hierro añadiendo 2,2´-dipiridil. A partir de una colonia, se inocularon 5 mL de LB líquido que se incubaron a 25 ºC durante 8 o 9 h en agitación (150 rpm). Los cultivos se ajustaron a una DO_{600} de 1 y se diluyeron 1:100 en medio mínimo CM9 que contenía 40 µM de 2,2´-dipiridil. Los cultivos se incubaron a 25ºC en agitación (150 rpm). Dependiendo del ensayo, las medidas de crecimiento (DO_{600}) y producción de sideróforos se realizaron a las 12 h o a intervalos de 3 h hasta las 12 h, haciendo una medida final a las 24 h. Como control positivo del crecimiento se realizaron las mismas medidas sobre cultivos en CM9 sin quelante y suplementado con 10 µM de $Fe_2(SO_4)_3$ (condiciones de disponibilidad de hierro).

Para cuantificar la producción de sideróforos se utilizó el ensayo del cromo azurol-S (CAS) (Schwyn & Neilands, 1987), utilizando como blanco y control negativo el mismo medio sin inocular. Este ensayo consiste en la detección de la presencia de sustancias con actividad quelante de hierro en sobrenadantes de cultivos líquidos, utilizando un complejo ferri-cromogénico que cambia de color cuando pierde los iones 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 de

color del colorante de azul a rojo. Para realizar esta prueba se mezclaron volúmenes iguales (0,5 mL) de sobrenadante y reactivo de CAS (Schwyn & Neilands, 1987). Tras esperar 15 min, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm en un espectrofotómetro Hitachi U-2000. Cuánto más negativos son los valores de absorbancia mayor será la concentración de sideróforo en el sobrenadante (Figura III.5).

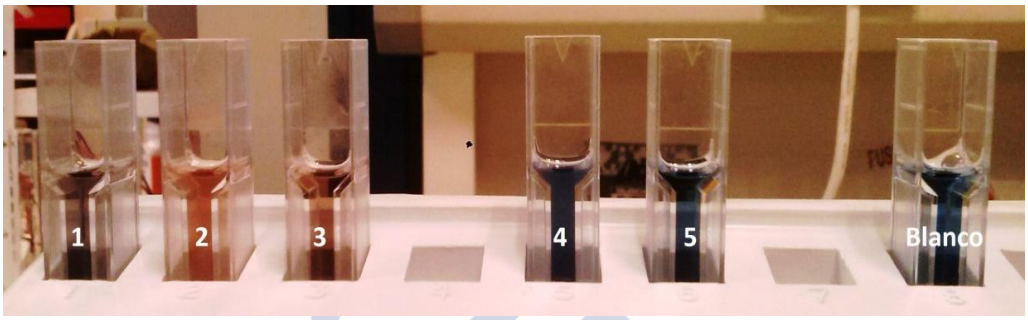

Figura III.5: Representación de pruebas de cromo azul-S (CAS). Las cubetas 1, 2 y 3 serían valores positivos de CAS (darán valores de absorbancia negativos), los cubetas 4 y 5 son valores negativos de CAS (darán valores positivos de absorbancia) y por último, se muestra la cubeta blanco.

Para determinar la utilización del citrato férrico como fuente de hierro, se cultivaron las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* en medio mínimo CM9 al que se añadieron distintas concentraciones del agente quelante 2-2´dipiridil y una preparación de citrato férrico obtenida mezclando citrato sódico y $FeCl_3$ en una proporción de 200:1 (10 µM de $FeCl_3$ y 2 mM de citrato sódico) para asegurarnos que todo el hierro está en forma del complejo soluble di-citrato férrico.

La determinación de los niveles de citrato producido por las células se llevó a cabo mediante el kit *Citrate Assay Kit* (Sigma-Aldrich) (Guerinot et al., 1990). Se hicieron crecer las cepas problema en CM9 en déficit de hierro añadiendo una concentración de 40 µM del quelante 2-2´dipiridil y en CM9 sin quelante suplementado con 10 µM de $Fe_2(SO4)_3$, a 25ºC en agitación (150 rpm) hasta que todas alcanzaron la misma DO_{600} (0,8-1). A continuación se realizaron los ensayos de niveles de citrato, en placas microtiter de 96 pocillos, según las instrucciones de uso del fabricante. Se añadieron a cada pocillo 50 µL de los sobrenadantes de los cultivos de las cepas problema junto con 44 µL del *Citrate Assay Bufffer*, 2 µL de *Citrate Enzime*

Mix, 2 µL de *Citrate Developer* y 2 µL de *Citrate Probe*, y se mezcló todo con una pipeta. Los cambios de color se midieron después de 30 min a temperatura ambiente mediante un lector de placas microtiter infinite®F200 (Tecan) (A_{600}). Como blanco y control negativo se utilizó el mismo medio sin inocular. Para realizar una curva de calibración se realizaron distintas diluciones seriadas del citrato estándar (*Citrate Assay Kit*) (0, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,5 mM). La cantidad de citrato presente en los sobrenadantes de las cepas problema podrá determinarse a partir de dicha curva (Figura III.6).

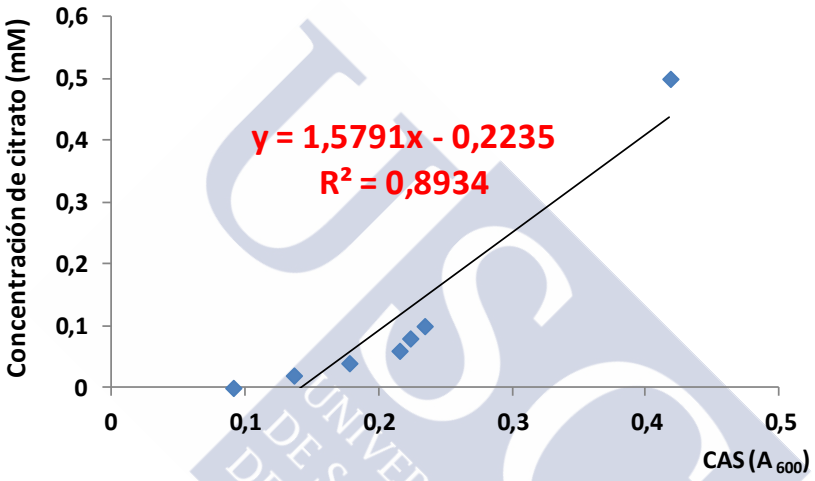

Figura III.6: Curva de calibrado de la concentración de citrato estándar frente a los valores colorimétricos (A_{600}).

9 Bioensayos de alimentación cruzada

La actividad biológica de los sobrenadantes obtenidos a partir de los diferentes mutantes, se determinó mediante experimentos de alimentación cruzada. Con estos ensayos se pretendía comprobar la capacidad de P. damselae subsp. damselae para sintetizar vibrioferrina. Se utilizó como cepa indicadora la cepa AR13 de V. alginolyticus (ΔpvsA), un mutante deficiente en la síntesis de vibrioferrina. En todos los casos se utilizó como control positivo la cepa RG91.

La cepa indicadora AR13 se cultivó en TSC-1 a 25 ºC en agitación (150 rpm) durante 5 h. Un mL de este cultivo a una DO_{600} de 0,8 se añadió a 20 mL de CM9 con

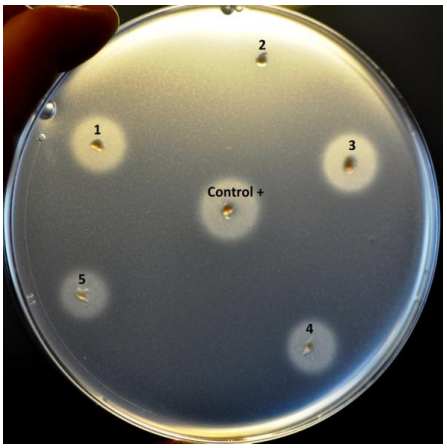

Figura III.7: Bioensayo de alimentación cruzada. Las cepas 1, 3, 4 y 5 sintetizan vibrioferrina y promueven el crecimiento de la cepa indicadora AR13. La cepa 2 no sintetiza vibrioferrina y no induce el crecimiento de la cepa indicadora AR13. Control positivo, cepa RG91.

0,7% de agarosa y 100 µM (CMI de la cepa AR13 en este medio) del quelante de hierro 2,2´-dipiridil.

Las cepas problema se cultivaron en placas de LB con 100 µM de 2,2´-dipiridil, las células se recogieron con un asa de siembra y se depositaron sobre la superficie del medio anterior, con la cepa indicadora previamente inoculada, formando un acúmulo uniforme. Se anotaron como positivos aquellos acúmulos celulares capaces de promover un halo de crecimiento de la cepa indicadora (Figura III.7).

También se realizaron bioensayos para determinar la actividad biológica de las fracciones obtenidas en la metodología de aislamiento y purificación del sideróforo en las cepas RM71 y RG91 (ver apartado 15).

10 Proteómica

Para el estudio comparativo de las proteínas cuya expresión está regulada por hierro, se cultivó la cepa RG91 en dos medios distintos, uno con exceso de hierro, añadiendo 10 µM de $Fe_2(SO_4)_3$, y otro con déficit de hierro, añadiendo 40 µM de 2,2´-dipiridil. Se realizaron tres cultivos con cada una de las condiciones (con exceso de hierro y déficit de hierro), así como tres geles, para evaluar la reproducibilidad del experimento.

En primer lugar, a partir de una colonia se inocularon 5 mL de LB líquido incubando a 25 ºC durante 8 o 9 h en agitación (150 rpm). El cultivo se ajustó a una DO_{600} de 0,8 y se diluyó 1:100 en dos matraces con 20 mL de LB líquido, a uno de los cuales se le añadió 2,2´-dipiridil a 20 µM y se cultivó a 25 ºC durante 12 h en agitación (150 rpm). Los cultivos se ajustaron a una DO_{600} de 0,8 y se diluyeron 1:100 en 1 L de CM9. Al que había crecido con 20 µM de 2,2´-dipiridil se le añadieron 40 µM del

quelante y al que había crecido con LB líquido sólo se le añadieron 10 µM de $Fe_2(SO_4)_3$. Los matraces se incubaron a 25 ºC durante 24 h en agitación (150 rpm).

Una vez que la DO_{600} se aproximó a 1 los cultivos se centrifugaron a 8.000 rpm en una centrifuga *Avanti* J-25 con rotor JA-10 (Beckman Coulter) durante 20 min a 4 ºC, se eliminó el sobrenadante y se hicieron 3 lavados, 2 de ellos con 50 mL de tampón Tris sacarosa (Tris 10 mM, sacarosa 250 mM, pH 7) y el último con 30 mL del mismo tampón. A continuación los cultivos se liofilizaron.

10.1 Extracción de proteínas totales

Para la extracción de las proteínas se resuspendieron 40 mg de células liofilizadas en 1 mL de tampón de lisis estándar compuesto por urea 7 M, tiourea 2 M, 4% de CHAPS (3-(3-colamidopropil-dimetilamonio)-1-propanosulfonato) y 65 mM DTT (ditiotreitol) durante 3 h a 27 ºC y se sometieron a sonicación utilizando 3 ciclos de 10 pulsos de 30 s, con 15 s de separación entre cada pulso. A continuación las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 30 min a 4ºC. Los sobrenadantes resultantes se recogieron y se sometieron a la precipitación de proteínas utilizando el *Clean-up kit* (GE Healthcare). A continuación el pellet se resuspendió en 1 mL de tampón de lisis. La concentración de proteína se midió con el *CB-X kit* (Gbiosciences). Finalmente, las muestras se almacenaron a -80 º C antes de su uso.

10.2 Separación de proteínas por electroforesis bidimensional

10.2.1 Primera dimensión

Se realizó un estudio preliminar para observar la distribución de las proteínas a lo largo de un gradiente de pH, llegándose a la conclusión de que el rango óptimo de pH donde mejor se distribuían las proteínas de la cepa RG91 era entre pH 3 y pH 10 (Figura III.8).

El isoelectroenfoque (IEF) se realizó con una celda *Protean IEF* (Bio-Rad) y tiras IPG de 24 cm (GE Healthcare) de pH 3-10. Cada muestra de 60 µL (que contiene aproximadamente 400 µg de proteína), se mezcló con 390 µL de tampón de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, 4% de CHAPS, 0,6% de DTT, 1% de tampón IPG 3-10 y 0,002% de azul de bromofenol) y se cargó en la tira IPG. El IEF se llevó a cabo a 20

ºC y de acuerdo a los siguientes pasos: rehidratación activa (50 V) durante 12 h, 250 V durante 30 min, 500 V durante 1 h, 1.000 V durante 1 h, 4.000 V durante 2 h, 8.000 V durante 2 h y 10.000 V para lograr 65 kVh. Después del IEF, las tiras se almacenaron a -20 ºC hasta su utilización en la segunda dimensión.

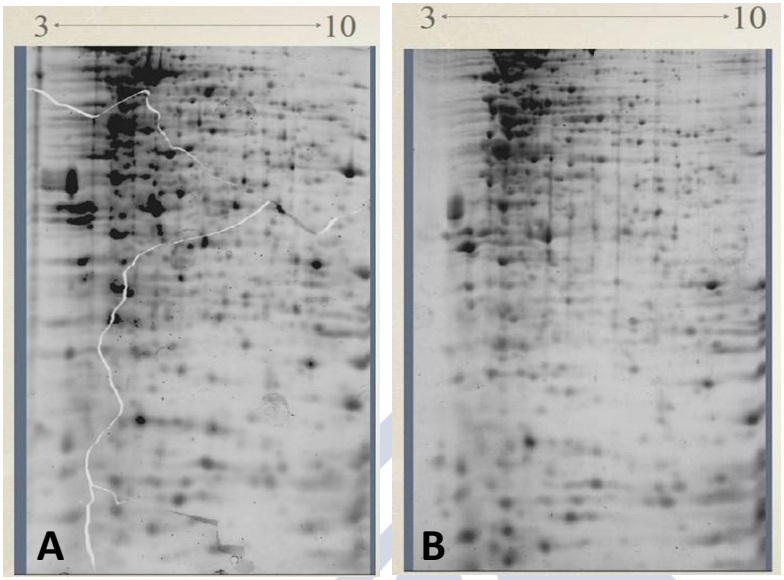

Figura III.8: Rango de pH óptimo para la distribución de las proteínas de RG91. A: proteínas del cultivo crecido en déficit de hierro, B: proteínas del cultivo crecido en exceso de hierro.

10.2.2 Segunda dimensión

Antes de ejecutar la segunda dimensión, las tiras se equilibraron a temperatura ambiente en dos pasos, primero con una disolución de equilibrio (6 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 30% de glicerol, 2% SDS) con adición de 1% de DTT durante 15 min, seguido por la misma disolución añadiendo 2,5% de iodoacetamida otros 15 min. Las tiras se fijaron con disolución de sellado (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 0,1% SDS, 0,5% agarosa, 0.01% azul de bromofenol) en la parte superior de un gel de 12,5% de poliacrilamida de 21 x 26 cm. La segunda dimensión se realizó de acuerdo con LaemmLi (LaemmLi, 1970), en un *EttanDalt-Six* (GE Healthcare) a 30 ºC durante toda la noche (a 5 mA/gel durante 1 h, 10 mA durante 1 h, seguido de 16 mA/gel hasta que el colorante alcanzó la parte inferior del gel).

10.3 Análisis de los *spots*

Para la visualización de las proteínas y posterior análisis de la imagen los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie (CBB). La tinción CBB se llevó a cabo de acuerdo con Neuhof et al. (1988) con pequeñas modificaciones. El gel se escaneó con el densitómetro Microtek 9800XL (Microtek) a 300 ppp de resolución. El análisis de las imágenes se llevó a cabo mediante el programa bioinformático *PDQuest Advance* software version 8.0 (Bio-Rad), con el que se detectó y se cuantificó *in situ* y se estudió la reproducibilidad de las manchas (*spots*).

Las manchas (*spots*) de proteínas escogidas para el análisis de espectrometría de masas (MS) se cortaron y se digirieron manualmente. Las piezas de gel se lavaron 3 veces con el tampón AmBic (bicarbonato de amonio 50 mM en metanol grado de HPLC al 50% (Scharlau)) y una vez con DTT 10 mM (Sigma-Aldrich). Las piezas de gel se secaron en un *SpeedVac* antes de la alquilación con 55 mM de iodoacetamida (Sigma-Aldrich) en 50 mM de bicarbonato de amonio. Una vez más las piezas de gel fueron lavadas con el tapón AmBic, antes de ser deshidratadas por la adición de acetonitrilo grado HPLC (Scharlau) y secadas por *SpeedVac*. Para la digestión se añadió tripsina (Promega) a una concentración final de 20 ng/µL en 20 mM de bicarbonato de amonio a cada una de las piezas de gel secas, y se incubó a 37 ºC durante 16 h. Se descartaron las disoluciones, se añadieron 40 µL de acetonitrilo al 60% en 0,5% de ácido fórmico a cada muestra y se incubaron durante 20 min, repitiendo este proceso tres veces. Los extractos de péptidos se concentraron en un *SpeedVac* y se almacenaron a -20ºC.

Para la identificación de las proteínas se utilizó la técnica de espectrometría de masas con ionización suave por desorción láser y detección por tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Las muestras secas se disolvieron en 4 µL de ácido fórmico al 0,5%. Se igualaron los volúmenes (0,5 µL) de los péptidos con la disolución de la matriz (3 mg de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico disuelto en 1 mL de acetonitrilo al 50% en ácido trifluoracético al 0,1%). Las muestras fueron depositadas en capa fina sobre una placa 384 Opti-TOF MALDI (Applied Biosystems). Los datos de espectrometría de masas se obtuvieron en un analizador automatizado en bucle 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems). Se utilizó el servidor MASCOT (Matrix Science) para buscar las coincidencias de las huellas

peptídicas obtenidas con todas las entradas bacterianas disponibles en la base de datos del NCBI.

11 Obtención de genoteca de cósmidos

Para la obtención de la genoteca de cósmidos se purificó el ADN genómico de la cepa RG91 con el kit *G NOME®DNA KIT* (MP Biomedicals) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente se realizó una digestión parcial de 7 µg de ADN con 0,1 U de *Bfu*CI (New England BioLabs) en un volumen total de 100 µL (Figura III.9). Tras 5 min de digestión se paró la reacción con 10 µL de EDTA 0,2 M. Con este protocolo de digestión obtuvimos fragmentos de ADN de tamaños superiores a 25 kb. Finalmente, la muestra de ADN parcialmente digerido se trató con fosfatasa alcalina (Fermentas).

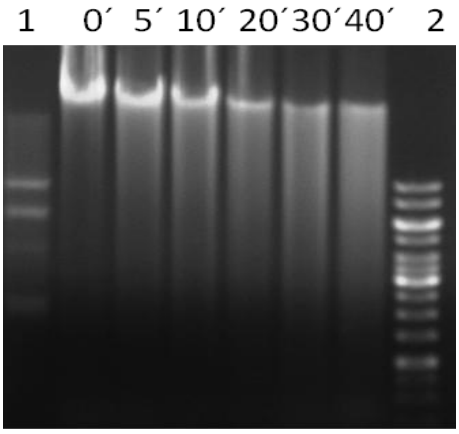

Figura III.9: ADN genómico de la cepa RG91 digerido con *Bfu*CI durante 5´-40´. 1 marcador molecular ADN fago λ, 2 marcador molecular de 1 kb.

El vector de clonación utilizado para la obtención de la genoteca de cósmidos, fue el *SuperCos1 Cosmid Vector Kit* (Stratagene) (Figura III.10). El vector se cortó con la enzima de restricción *Xba*I (New England Biolabs), se defosforiló y finalmente se digirió con *Bam*HI (New England Biolabs) tal y como se indica en el manual del fabricante. Tras cada reacción enzimática se limpió con fenol-cloroformo-alcohol isoamilíco (25:24:2). Por último, se

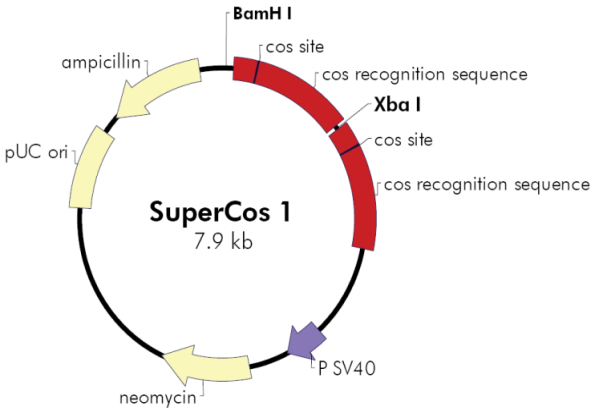

Figura III.10: Esquema del vector utilizado para la construcción de la genoteca de cósmidos.

realizó una reacción de ligación con 2,5 µg de ADN genómico y 1 µg de SuperCos1, utilizando ADN ligasa T4 (Thermo Scientific).

Para el encapsulado de los bacteriófagos e infección se utilizó, siguiendo el protocolo del fabricante, el kit *Gigapack III Packaging Extract* (Stratagene) y la cepa de *E. coli* XL1-blue MR (Stratagene).

12 Secuenciación de ADN y herramientas de bioinformática

Durante la realización de esta tesis se secuenciaron productos de PCR y fragmentos clonados en plásmidos mediante el método clásico de Sanger. Para la secuenciación del genoma de las cepas RM71 y RG91 se utilizaron estrategias de secuenciación masiva. Los detalles de cada estrategia se detallan a continuación.

Secuenciación clásica o Sanger

Para la secuenciación de plásmidos, cósmidos o productos de PCR se utilizó el kit comercial *GenomeLab DTCS quick start kit* (Beckman Coulter) y el secuenciador CEQ 8000 DNA. Tanto las reacciones de secuenciación como la limpieza de las mismas se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando se utilizaron como molde productos de PCR, éstos se purificaron con el kit comercial *GeneJET™ Purification Kit* (Thermo Scientific), y con el *GeneJET™ Gel Extraction kit* (Thermo Scientific) cuando se trataba de bandas recortadas de geles de agarosa. Para el análisis de las secuencias obtenidas se emplearon los programas *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999) y Vector NTI versión 10.3.0 (Invitrogen). Mediante el algoritmo BLAST de la base de datos NCBI se analizaron las homologías de las secuencias de nucleótidos (programa BLASTn) o aminoácidos (BLASTp) según el caso. Para el análisis de dominios proteicos conservados se consultó la base de datos PFam del instituto Sanger (*Protein families database of alignments and HMMs* (http://pfam.sanger.ac.uk/) (Bateman et al., 2004). La aplicación *Virtual Footprint Promoter Matches* de la base de datos PRODORIC Release 8.1 (http://prodoric.tu-bs.de/) se utilizó para identificar posibles regiones operadoras.

Secuenciación del genoma de las cepas RM71 y RG91

La obtención de las secuencias de ADN de los genomas completos de las cepas RM71 y RG91 de *P. damselae* subsp. *damselae* se llevó a cabo utilizando un secuenciador Illumina-Solexa (Hu et al., 2015). De cada cepa se obtuvieron un total de 10^7 lecturas pareadas a partir de librerías de 250 pb, lo que supuso un esfuerzo de secuenciación estimado de 250x. El ensamblaje de las lecturas en *scaffolds* se realizó mediante el programa SOAPdenovo2 (Luo et al., 2012) que está disponible en los servidores del Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA). La anotación de las secuencias se realizó mediante el servicio bioinformático RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (http://rast.nmpdr.org/) (Aziz et al., 2008). Los genomas obtenidos se alinearon y compararon mediante el programa Mauve 2.3.0 (Darling et al., 2004). Por último, se utilizó la distribución de Linux CMG-biotools (Vesth, 2013) para estudiar los proteomas de cada cepa y analizar el contenido diferencial.

13 Mutagénesis por transposición del mini-Tn*10*

La mutagénesis mediante el transposón mini-Tn*10* se llevó a cabo utilizando el plásmido conjugativo suicida pLOFKm, que contiene un gen de la transposasa IS 10R bajo el control del promotor Ptac- inducido por IPTG y un gen de resistencia a kanamicina flanqueado por elementos móviles (Figura III.11) (Herrero et al., 1990). El elemento transponible utiliza un mecanismo no replicativo.

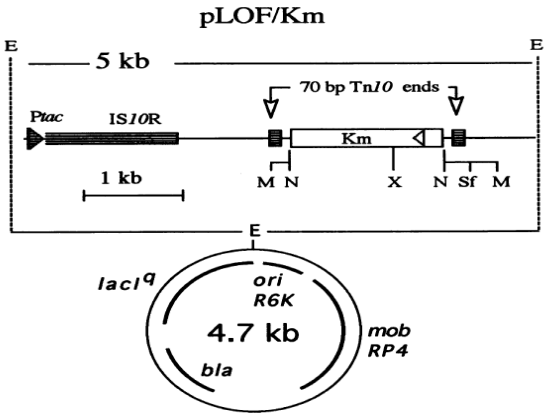

Figura III.11: Formación del plásmido mini-Tn*10* (pLOF/Km) a partir de pBOR8 (9.7 Kb) (Herrero,. 1990)

Para la conjugación se añadió 1 mL de la mezcla de la cepa donadora (*E. coli* mini-Tn*10* cultivada a 37 ºC durante 5 h en LB líquido en agitación a 150 rpm) y la cepa receptora (*P. damselae* subsp. *damselae* RM71 cultivada a 25 ºC durante 12 h en TSC-1

en agitación a 150 rpm), con 10 µL de IPTG, (activa la expresión de la transposasa una vez que se encuentra dentro de la cepa receptora) en una placa de agar marino. La conjugación se incubó a 25 ºC durante 3 días. A continuación se sembraron diluciones seriadas de la mezcla de células en placas de LB con kanamicina (marcador de la inserción mini-Tn*10*).

13.1 Clonación y secuenciación de las zonas que flanquean el transposón Tn*10*

Para poder secuenciar las zonas que flanquean el gen de resistencia a Kanamicina, que funciona como marcador de la inserción mini-Tn*10*, se digirió parcialmente el ADN de las cepas mutantes con la enzima de restricción *BfuC*I (New England BioLabs) durante aproximadamente 35 s. A continuación se ligó, utilizando ADN ligasa T4 (Thermo Scientific), al plásmido pUC118 previamente cortado con *BamHI* (Thermo Scientific) y tratado con fosfatasa alcalina (Thermo Scientific). Posteriormente se transformó en la cepa electrocompetente *E. coli* DH5α. La cepas que contenían el fragmento clonado con el transposón mini-Tn*10* se seleccionaron sembrándolas en LB con kanamicina. Los fragmentos clonados se amplificaron con los primers M13 y aquellos fragmentos que presentaban un tamaño superior a 1.800 pb (gen de resistencia a kanamicina flanqueado por elementos móviles) se secuenciaron y a continuación se realizaron estudios de predicción de ORFs y búsqueda de homologías.

14 Ensayos de virulencia en rodaballo

Los ensayos de virulencia con las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae*, se realizaron utilizando alevines de rodaballo con un peso entre 10 y 15 g. Previamente al ensayo, los peces se aclimataron durante 24 h al ambiente de ensayo para evitar posibles episodios de estrés. La temperatura del agua se estableció entre 18 y 20 ºC. La preparación de los inóculos se realizó a partir de cultivos frescos de 12 h en TSA-1, resuspendiendo las células en solución salina y ajustando las densidades celulares mediante comparación de la turbidez con la de los tubos de la escala McFarland. La determinación del número de células inyectadas en el inóculo se determinó mediante

la siembra en placas de TSA-1 de diluciones decimales seriadas en solución salina de la suspensión inicial. Se inocularon intraperitonealmente 0,1 mL por pez, empleando 5 peces por cada dosis. Como control negativo se inocularon 5 peces con PBS. Los peces se observaron diariamente a lo largo de 5-7 días. De cada tanque de ensayo donde se observaron mortalidades, se analizaron 2 o 3 de los peces muertos, sembrando una muestra del riñón en placas de TSA-1. La obtención de cultivos puros de *P. damselae* subsp. *damselae* sirvió para comprobar que la mortalidad era causada por las bacterias inoculadas. El grado de virulencia se expresó como porcentaje de mortalidad.

15 Determinación de la estructura química del sideróforo

Para aislar y purificar el sideróforo producido por las cepas RM71 y RG91 se cultivaron las dos cepas en CM9 con 40 µM del agente quelante 2-2´dipiridil a 25 ºC durante 24 h en agitación a 190 rpm, hasta alcanzar las cotas de crecimiento y producción de sideróforo adecuada (DO_{600} > 1 y CAS (A_{630}) < -0,5). Una vez alcanzados estos parámetros, se centrifugó el medio a 8.000 rpm en una centrífuga *Avanti* J-25 con rotor JA-25 (Beckman Coulter) durante 20 min a 4 ºC. El sobrenadante obtenido se filtró mediante un sistema de filtración continua (PREP/SCALE®-TFF CARTRIDGE, Milipore).

Los siguientes pasos se realizaron en colaboración con el Dr. Carlos Jiménez del Departamento de Química Fundamental de la Universidad de A Coruña que realizaron varias metodologías de aislamiento y purificación mediante cromatografía de intercambio iónico y HPLC.

Para el aislamiento de vibrioferrina, el sobrenadante libre de células procedente de 3 L de cultivo de la cepa RG91 crecida en CM9 con 40 µM de 2,2'-dipiridil fue congelado a -20 ºC y liofilizado. Posteriormente se disolvieron 215 mg del liofilizado en 1 mL de H_2O con 0,1% de ácido tri-fluoro-acético (TFA) y se cargaron en un cartucho de extracción en fase sólida de tipo MCX, tras previo acondicionamiento. El cartucho se eluyó con 10 mL de H_2O con 0,1% TFA y a continuación con 10 mL de H_2O:MeOH (1:1) con 0,1% TFA. El cartucho se lavó con 10 mL de MeOH; 10 mL de

H_2O:MeOH, NH_3 7N (2:1) y finalmente con 2 x 10 mL de MeOH, NH_3 7N. Las fracciones activas se analizaron por HPLC-MS usando una columna Atlantis dC18 (100 x 4.6 mm, 5 µm) de Waters con una fase móvil consistente en un gradiente de 10 a 100% CH_3CN en H_2O (v/v), luego 5 min a 100% CH_3CN y finalmente 10 min de 100% a 10% CH_3CN/H_2O (v/v), utilizando un flujo de 1 mL/min. Los compuestos presentes en los picos obtenidos por HPLC se analizaron por MS de alta resolución con ionización por electrospray (HRESI-MS) y por MS con electrospray en modo negativo (-)-ESI-MS.

La determinación de la actividad biológica de las fracciones obtenidas se realizó en nuestro laboratorio mediante ensayos CAS y bioensayos (ver apartado 9), utilizando como cepas indicadoras las cepas RM71 y RG91. Cada fracción se disolvió en los disolventes adecuados a cada caso llevándolos a una concentración final de 10 mg/mL. Se utilizaron 10 µL de cada fracción para embeber discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro, que se dejaron secar al aire y se depositaron sobre la superficie de placas de medio CM9 sólido previamente inoculado con la cepa indicadora. Como control positivo se utilizó un disco de papel de filtro con 5 µL de una disolución de $Fe(SO_4)_3$ 10 µM. Después de 24 h de incubación a 25 ºC, las fracciones capaces de promover el crecimiento de las cepas RG91 y RM71 eran candidatas a contener el posible sideróforo de estas cepas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1 Crecimiento en condiciones de déficit de hierro: existencia de 3 tipos de cepas de *P. damselae* subsp. *damselae*

Estudios previos relacionados con *P. damselae* subsp*. damselae* nos servirán de punto de partida en este trabajo: 1) Existe una relación positiva entre la disponibilidad de hierro en el hospedador y el grado de virulencia de *P. damselae* subsp*. damselae* (Fouz et al., 1994). 2) Todas las cepas de *P. damselae* subsp*. damselae*, incluidas las no patógenas, pueden multiplicarse en presencia del quelante de hierro EDDHA y de transferrina humana, demostrando así la capacidad de esta subespecie para producir sideróforos bajo condiciones de déficit de hierro (Fouz et al., 1997). 3) Existe una proteína en *P. damselae* subsp. *damselae* con elevada homología con la proteína Fur*,* que actúa como regulador transcripcional en respuesta a la concentración de hierro (Juiz-Rio et al., 2004).

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, en el presente estudio, nos hemos planteado la búsqueda e identificación de genes que puedan estar implicados en la síntesis y transporte del sideróforo o sideróforos producidos por *P. damselae* subsp*. damselae*, que hasta el momento son completamente desconocidos.

Inicialmente se comparó el comportamiento de una colección de cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* virulentas*,* crecidas bajo diferentes condiciones de déficit de hierro. Para ello se seleccionaron un grupo de 8 cepas de distintos orígenes y se cultivaron en déficit de hierro, utilizando para ello distintas concentraciones del agente quelante dipiridil en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos, que se muestran en la Figura IV.1, permitieron comprobar que existe una heterogeneidad en la respuesta de las diferentes cepas a las distintas concentraciones del agente quelante, pudiendo clasificarse las cepas en tres grupos, que se detallan a continuación.

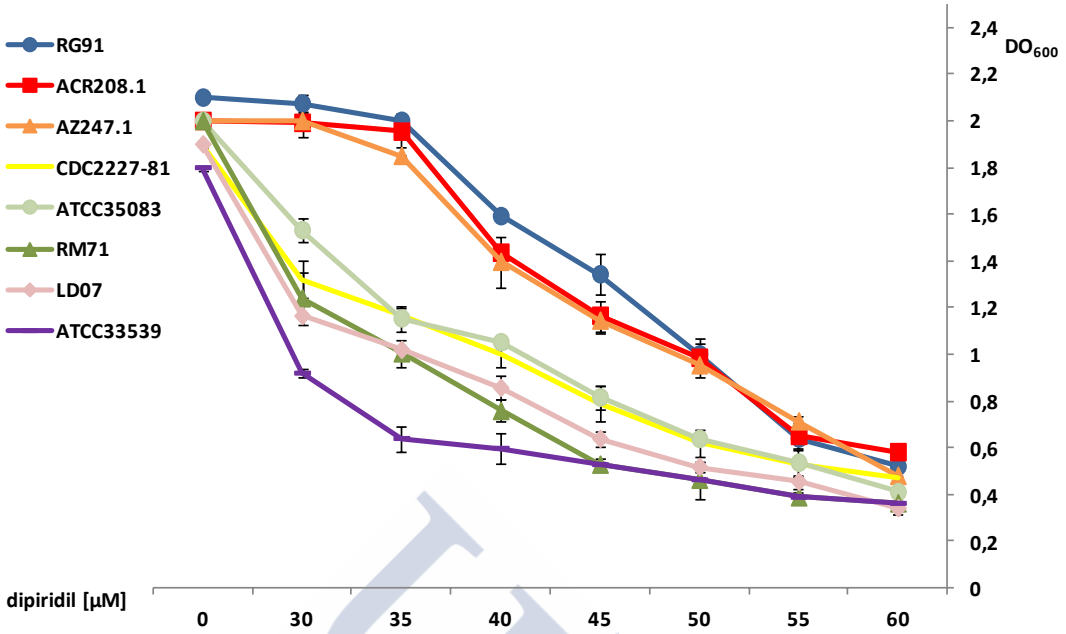

Figura IV.1: Valores máximos (DO_{600}) de crecimiento alcanzados por 8 cepas de *P. damselae* subsp. *damselae*, crecidas bajo diferentes concentraciones del agente quelante dipiridil después de 24 h a 25 ºC en medio mínimo CM9.

Cepas tipo A: Grupo de cepas bien diferenciado, que presentan un mayor crecimiento que el resto a concentraciones altas de dipiridil, por lo que son capaces de crecer bajo una mayor deficiencia de hierro (Figura IV.1). En este grupo se incluyen tres cepas: RG91, ACR208.1 y AZ247.1, todas ellas cepas aisladas en España como causantes de brotes de vibriosis en rodaballo cultivado. En este sentido, podría existir alguna correlación entre el crecimiento en condiciones de un mayor déficit de hierro y el origen de aislamiento o el hospedador.

Cepas tipo B: Grupo de cepas que presentan una disminución del crecimiento a una concentración más baja de dipiridil (40-45 µM) con respecto al grupo A (Figura IV.1). En este grupo se encuentran las cepas RM71 (aislada de rodaballo) y LD07 (aislada de dorada), ambas procedentes de España, así como las cepas CDC2227-81 (aislado clínico humano) y ATCC35083 (aislada de tiburón), ambas procedentes de EE.UU. En este caso, claramente no existe ninguna correlación entre tipo de crecimiento en limitación de hierro y hospedador/origen geográfico de cada aislado.

Cepa tipo C: Representada por la cepa tipo ATCC33539, aislada de pez ángel en EE.UU, cuyo genoma se ha secuenciado completamente y se encuentra disponible en el GenBank. El crecimiento de esta cepa es mínimo incluso a bajas concentraciones del quelante.

En base a estas tres categorías, con diferente comportamiento frente al quelante, se seleccionaron tres cepas, como representantes de cada uno de los grupos, para continuar este trabajo: RG91 (cepas tipo A), RM71 (cepas tipo B) y ATCC33539 (cepa tipo C). Los valores de densidad óptica alcanzados por cada cepa frente a las diferentes concentraciones de quelante se muestran en la Figura IV.2. Además, se determinó la producción de sideróforos mediante el ensayo CAS empleando para ello los sobrenadantes de las cepas RG91 y RM71 crecidas con 40 µM de dipiridil, dado que es la concentración a la que pueden crecer tanto las cepas de tipo A como las de tipo B, y ATCC33539 crecida a 30 µM de dipiridil.

Los valores de CAS obtenidos para cada uno de los tres grupos de cepas podrían por tanto resumirse como sigue:

Cepas tipo A: Valor medio de CAS de -0,9 (A_{630}).

Cepas tipo B: Valores de CAS en general inferiores a los de las cepas de tipo B, con un valor medio de -0,7 (A_{630}).

Cepas tipo C: Presentan un valor medio de CAS de -0,3 (A_{630}). Debido a estos valores tan bajos podría no sintetizar sideróforos.

Por tanto, los valores obtenidos para cada cepa en los ensayos de CAS confirman los datos obtenidos en cuanto al crecimiento en diferentes concentraciones de dipiridil, lo que apoya la existencia de los tres tipos de cepas.

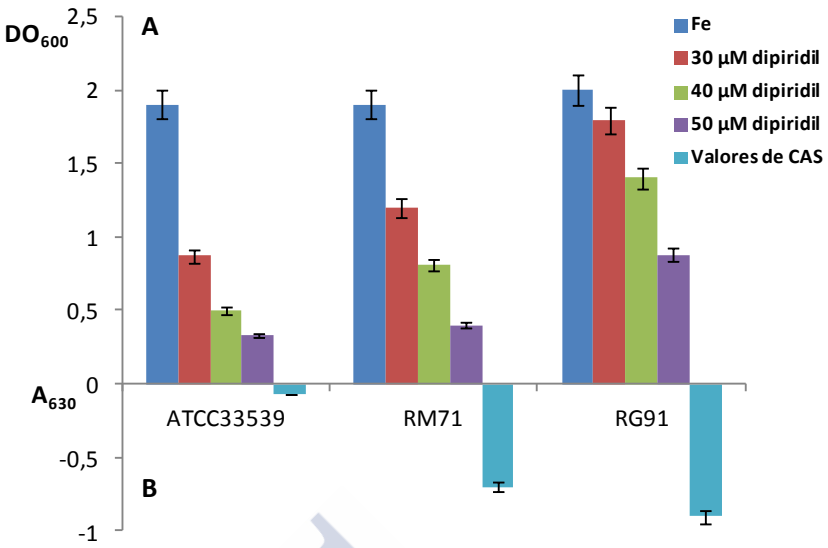

Figura IV.2: Crecimiento en diferentes condiciones de limitación de hierro y producción de sideróforos, de una cepa representativa de cada grupo (grupo A: RG91, grupo B: RM71, grupo C: ATCC33539). (A) Crecimiento (DO_{600}) de las tres cepas en presencia de hierro (con 10 µM de $Fe_2(SO_4)_3$) y en déficit de hierro (con 30, 40 y 50 µM de dipiridil) después de 12 h de cultivo a 25 ºC en medio mínimo CM9. (B) Valores de CAS (A_{630}) obtenidos con los sobrenadantes de cada una de las cepas: ATCC33539 crecida a 30 µM de dipiridil y RG91 y RM71 crecidas a 40 µM de dipiridil.

Por los datos de crecimiento y producción de sideróforos (Figura IV.2), se ha elegido la concentración de 40 µM de dipiridil como condición óptima para utilizar en todos los demás experimentos realizados en este trabajo.

En los estudios de Fouz et al., (1997) sobre la capacidad de diferentes cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* para crecer en presencia del quelante EDDHA, no se encontraron diferencias significativas entre ellas. Todas las cepas eran capaces de producir sideróforos en condiciones de déficit de hierro, sin que se apreciasen diferencias importantes en función de su origen, serotipo o grado de virulencia. Sí que es cierto que la cepa RG91 (también utilizada en el presente trabajo) presentaba una mayor actividad en el ensayo CAS en placa, mostrando un halo de cambio de color entre 20 y 30 mm de diámetro, a diferencia del resto que presentaban halos de 13 a 20 mm, lo que apoyaría los resultados descritos en los párrafos anteriores. Sin embargo, nuestros resultados no son coincidentes con los de Fouz et al. (1997) en el caso de la única cepa de tipo C, la ATCC33539, ya que estos autores obtuvieron para esta cepa una CMI de 40 µM de EDDHA, mayor que la CMI obtenida para la cepa RG91 (30 µM), y halos de

diámetro entre 20 y 30 mm, mayores que los de la cepa RM71. Además la cepa ATCC35083, que en nuestro estudio es la que mejor crece en condiciones de déficit de hierro dentro de las cepas de tipo B, mostraba en el estudio de Fouz et al. (1997) un resultado de CAS en placa negativo y una CMI de EDDHA de 30 µM. Estas discrepancias podrían deberse a los diferentes métodos empleados para medir la producción de sideróforos, así como a los diferentes agentes quelantes utilizados para el cultivo en condiciones de déficit de hierro.

A pesar de estas diferencias observadas con respecto a trabajos previos, nuestros resultados han sido siempre repetitivos y los datos fueron confirmados en varios experimentos diferentes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2 Genética y bioquímica de la síntesis de sideróforos en cepas tipo A: producción de vibrioferrina

Dentro del grupo de cepas tipo A, se seleccionó la cepa RG91 para continuar los estudios de búsqueda de genes relacionados con la síntesis y transporte de sideróforos, puesto que fue la cepa que repetidamente presentó mayores valores en el ensayo CAS de producción de sideróforos.

2.1 Estudio proteómico de la respuesta de la cepa RG91 frente a la disponibilidad de hierro

La proteína Fur es una metaloproteína homodímera que contiene un lugar de unión al ión Fe^{+2} en cada monómero. Presenta un dominio N-terminal de reconocimiento de la caja-fur presente en la región promotora de los genes regulados por hierro, y un dominio C-terminal implicado en la dimerización. Bajo condiciones de exceso de hierro, la proteína Fur se uniría al ión Fe^{+2} reprimiendo la expresión de genes relacionados con la adquisición del hierro (Hantke, 2001). En estudios previos de nuestro laboratorio se identificó la proteína Fur de *P. damselae* subsp. *damselae* y se demostró su papel en la regulación transcripcional en respuesta al hierro (Juiz-Rio et al., 2004). Asimismo, se demostró también la función represora de Fur sobre la expresión de varios genes mediante el ensayo de titulación de Fur (FURTA). Los genes identificados en este ensayo codificaban mayoritariamente proteínas del sistema de transporte del grupo hemo y un receptor dependiente de TonB, pero no se pudo identificar ningún gen relacionado con la síntesis de sideróforos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la primera estrategia que nos planteamos para la búsqueda de genes relacionados con la síntesis y transporte de sideróforos, se basa en la regulación por hierro a la que están sometidos los genes involucrados en su asimilación. En condiciones de limitación de hierro estos genes verían incrementada su expresión, mientras que la disponibilidad o el exceso de hierro la reprimiría.

Con el fin de analizar la respuesta al hierro de la cepa RG91, se realizó un estudio comparativo, mediante electroforesis bidimensional, de las proteínas totales obtenidas

a partir de células crecidas en presencia y ausencia de hierro. Las proteínas totales de cada una de las muestras crecidas bajo distintas condiciones de disponibilidad de hierro se separaron en geles de electroforesis bidimensional, primero según su punto isoeléctrico y luego según su masa molecular. Se obtuvieron dos geles, el gel D (dipiridil) correspondiente a las proteínas totales de la cepa RG91 crecida en un medio con déficit de hierro (añadiendo dipiridil), y el gel H (hierro) en el que se separan las proteínas totales de la cepa RG91 crecida en un medio con un exceso de hierro en forma de $Fe_2(SO_4)_3$ (Figura IV.3). Aquellos *spots* que aparecen en el gel D y no en el gel H corresponderán a las proteínas reprimidas por hierro (Figura IV.3), mientras que los *spots* que aparecen en el gel H y no en el D serán proteínas hierro-inducidas (Figura IV.4).

Una vez analizados los geles, se seleccionaron un total de 117 *spots* que mostraron intensidades diferenciales en respuesta a los cambios en la concentración de hierro. Las proteínas de cada *spot* se aislaron de los geles y se identificaron por espectrometría de masas MALDI-TOF. Una vez descartados los *spots* que contenían péptidos redundantes (producidos por la degradación de una misma proteína original durante el procesamiento de las muestras), se identificaron un total de 66 proteínas cuya expresión se encontraba regulada por la concentración de hierro. De éstas, 42 correspondían a proteínas hierro-reprimidas y 24 a proteínas hierro-inducidas. Mayoritariamente las proteínas presentaron elevada homología con proteínas predichas a partir de la secuencia genómica de la cepa tipo ATCC33539, a excepción de tres proteínas hierro-reprimidas que no tenían homólogos en la cepa tipo. Las proteínas identificadas se clasificaron de acuerdo con su función biológica en 9 categorías entre las que se incluyen virulencia, receptores y transportadores relacionados con el hierro, metabolismo, síntesis de sideróforos y respuesta al estrés celular.

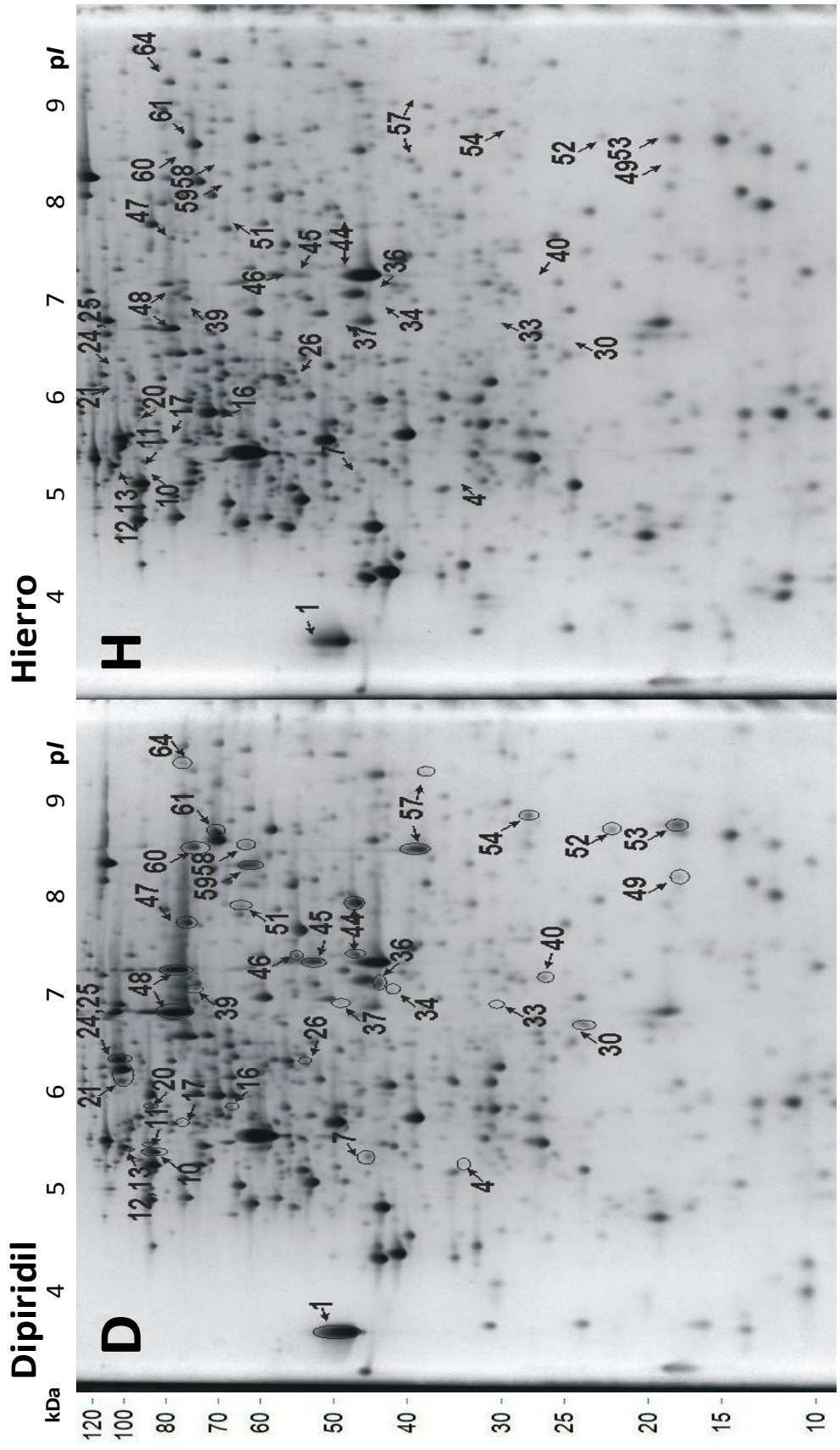

Figura IV.3: Geles de electroforesis de 2 dimensiones de las proteínas totales de la cepa RG91 de *P. damselae* subsp. *damselae* crecida en distintas condiciones: (D) con déficit de hierro (medio CM9 con 40 µM de dipiridil); (H) con exceso de hierro (medio CM9 con 10 µM de $Fe_2(SO_4)_3$). Se marcan en el gel los *spots* hierro-reprimidos que están en el gel D y no en el H.

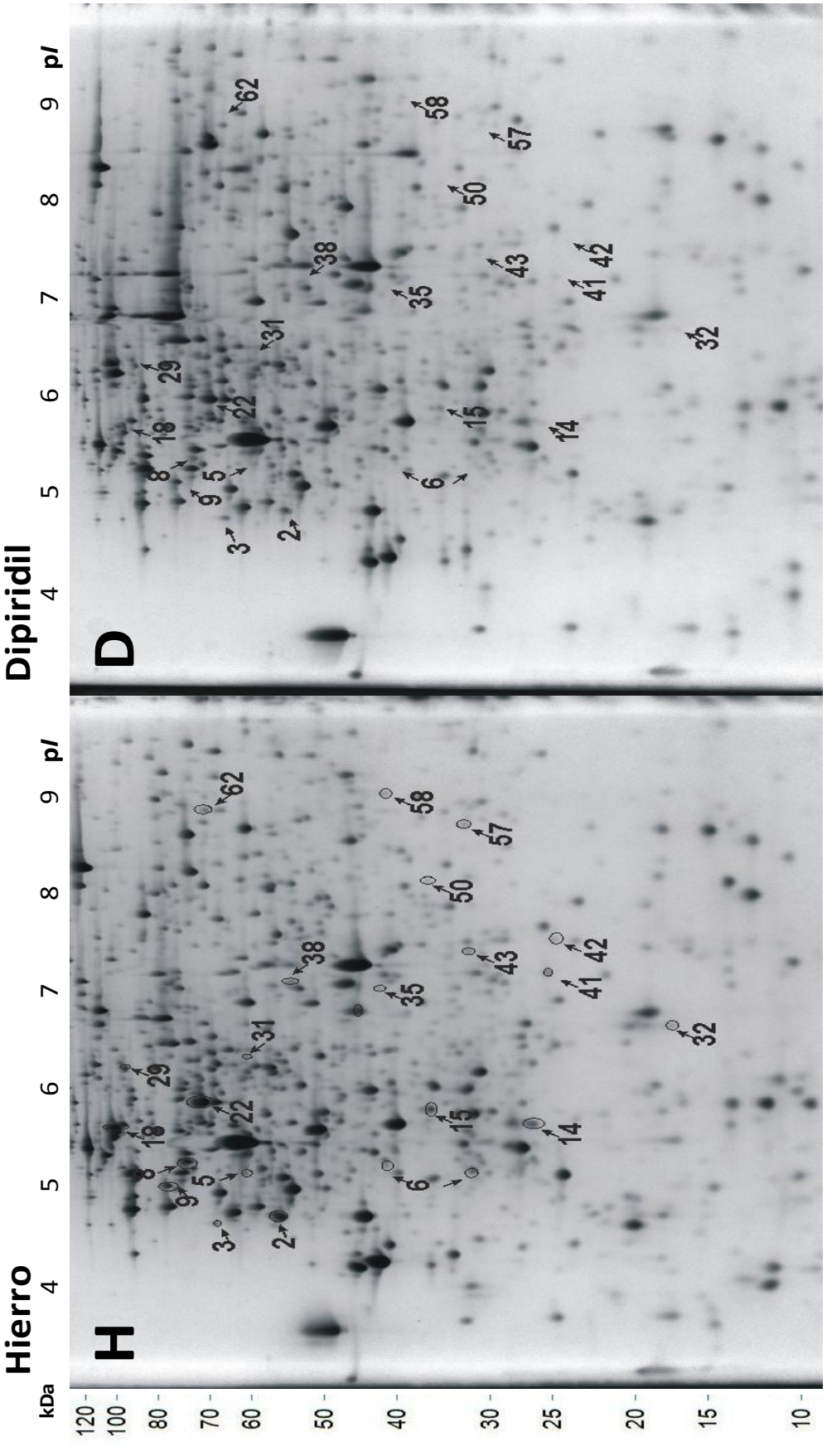

Figura IV.4: Geles de electroforesis de 2 dimensiones de las proteínas totales de la cepa RG91 de *P. damselae* subsp. *damselae* crecida en distintas condiciones: (D) con déficit de hierro (medio CM9 con 40 µM de dipiridil); (H) con exceso de hierro (medio CM9 con 10 µM de $Fe_2(SO_4)_3$). Se marcan en el gel los *spots* hierro-inducidos que están en el gel H y no en el D.

A partir de las proteínas identificadas, las funciones que se pueden predecir para las proteínas hierro-reprimidas y hierro-inducidas (Figura IV.5) son muy diferentes. Es de destacar que dentro de las proteínas hierro-reprimidas, el 5% correspondieron a la categoría de virulencia y el 18% a la de biosíntesis de sideróforos, mientras que ninguna de las proteínas hierro-inducidas identificadas pertenece a estas categorías. Las funciones predichas para las proteínas hierro-inducidas están en cambio más relacionadas con el metabolismo general, constituyendo esta categoría el 61% del total de las proteínas hierro-inducidas identificadas.

La correlación previamente observada entre grado de virulencia y disponibilidad del hierro sugiere que la capacidad de adquirir este elemento es crucial en la patogenicidad de *P. damselae* subsp. *damselae* (Fouz et al., 1994). En este sentido, los resultados obtenidos responden a lo esperado, considerando que la falta de hierro libre en los fluidos y tejidos del hospedador debería provocar la expresión de proteínas relacionadas con la captación de hierro y con factores de virulencia en general. En cambio, en ambientes ricos en hierro, se incrementaría la expresión de proteínas del metabolismo y del estrés adaptativo.

A continuación se describen en detalle las proteínas identificadas de cada categoría funcional, clasificadas además según estén reprimidas o inducidas por el hierro y dependiendo de si presentan homología o no con la secuencia genómica de la cepa tipo ATCC33539 (número de acceso en el GenBank: ADBS00000000).

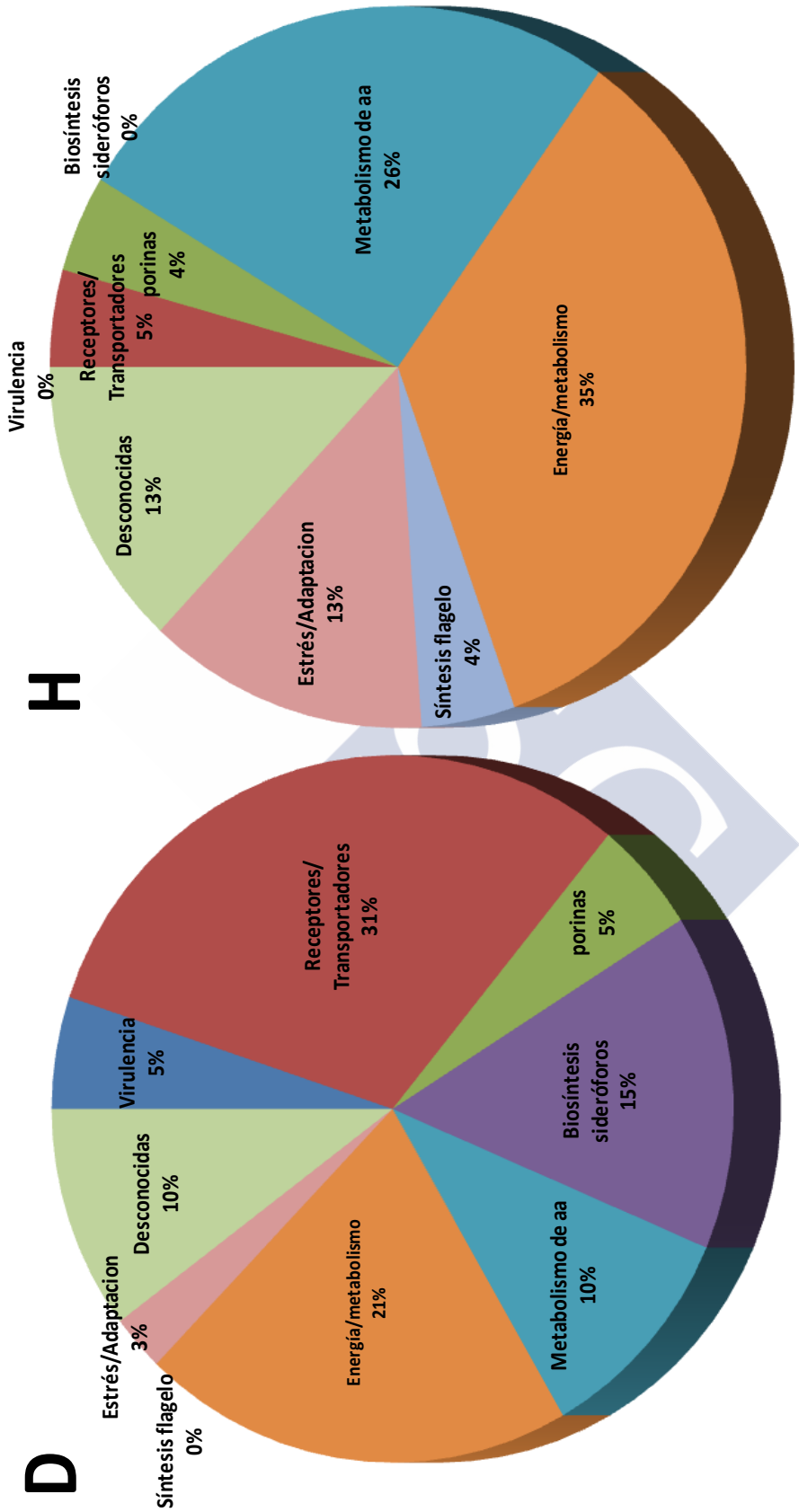

Figura IV.5: Representación de las diferentes categorías funcionales de las proteínas totales de la cepa RG91 de *P. damselae* subsp. *damselae* crecida en diferentes condiciones. (D): proteínas hierro-reprimidas; (H): Proteínas hierro-inducidas.

2.1.1 Proteínas hierro-reprimidas

Proteínas comunes con la secuencia de la cepa tipo:

En la Tabla IV.1 se enumeran las proteínas de la cepa RG91 cuya expresión se vio incrementada en déficit de hierro y que presentan homología con la secuencia de la cepa ATCC33539.

- Proteínas relacionadas con la asimilación del hierro:

En este grupo encontramos proteínas con homología a diversos componentes del sistema de transporte del grupo hemo, todos ellos descritos anteriormente en *P. damselae*, localizados en tres operones diferentes regulados por hierro y caracterizados en la subespecie *piscicida* (Rio et al., 2005; Osorio et al., 2010). El *spot* 21 (Figura IV.3; Tabla IV.1) se corresponde con la proteína HutA, un receptor para el grupo hemo del tipo TBDT. Es una proteína de 715 aminoácidos que actúa como receptor para el transporte de hemo (Rio et al., 2005). El *spot* 68 se corresponde con la proteína HutB, uno de los componentes del transportador de tipo ABC HutBCD, y los *spots* 30 y 53 corresponden a las proteínas HutZ y HutX respectivamente, cuyos genes se localizan en un tercer operón *hutZXW*, dentro del clúster de genes que codifican la utilización del grupo hemo. La función de estas dos proteínas no está clara, ya que aunque están sin duda reguladas por Fur, los mutantes de *hutX* en *V. anguillarum* no pierden la capacidad de utilizar el grupo hemo como fuente de hierro (Mouriño et al., 2004). Se ha sugerido que en *V. cholerae* HutZ podría servir como almacenador de hemo ya que se une con gran eficacia a este grupo (Wyckoff et al., 2004).

El *spot* 12 (Figura IV.3; Tabla IV.1) corresponde a FhuE, un receptor de ferricromo de tipo TBDT descrito por primera vez en *E. coli* (Sauer et al., 1987). En algunas cepas de la subespecie *piscicida* el gen *fhuE* constituye un pseudogen (Osorio et al., 2004), si bien en las cepas de la subespecie *damselae* podría ser un gen funcional.

Tabla IV.1: Proteínas hierro-reprimidas en RG91 con homología con las codificadas en el genoma de la cepa tipo ATCC33539.

Spot	Categoría / Proteína	Nº de acceso	LOCUS en la ATCC 33539
	Virulencia		
26	Damselisina (Dly)	GI:268160644	VDA_0159
48	Hemolisina formadora de poro ($HlyA_{ch}$)	GI:268162892	VDA_2420
	Receptores/Transportadores		
12	Receptor hierro-ferricromo (FhuE)	GI:268161277	VDA_0794
21	Receptor de hemoglobina dependiente de TonB (HutA)	GI:268162655	VDA_2183
24	Receptor dependiente de TonB	GI:268160596	VDA_0111
33	Proteína TonB	GI:268161276	VDA_0793
37	Transportador ABC	GI:268161688	VDA_1206
30	Proteína HutZ	GI:268162691	VDA_2219
53	Proteína HutX (*P. damselae* subsp. *piscicida*)	GI:358410509*	*Sin anotar*
61	Transportador ABC	GI:268163661	VDA_3190
65	Posible ATPasa acoplada al transportador ABC	GI:268163662	VDA_3191
68	Transportador ABC (HutB)	GI:268162695	VDA_2223
69	Transportador ABC	GI:268161869	VDA_1390
70	Transportador ABC (FecB)	GI:268161198	VDA_0716
	Porinas		
1	OmpH	GI:268163004	VDA_2532
57	OmpU	GI:268160598	VDA_0113
	Biosíntesis de sideróforos		
44	DAHP sintasa (AroA)	GI:268162863	VDA_2391
45	Antranilato fosforibosil transferasa (TrpD)	GI:268162866	VDA_2394
46	Triptófano sintetasa, subunidad beta (TrpB)	GI:268162868	VDA_2396
47	Antranilato sintetasa, componente aminasa (TrpE)	GI:268162864	VDA_2392
54	Antranilato sintetasa, componente amidotransferasa (TrpG)	GI:268162865	VDA_2393
58	Indol-3-glicerol fostato sintetasa (TrpC)	GI:268162867	VDA_2395
	Metabolismo de aminoácidos y derivados		
11	Proteína ribosómica S1	GI:268162274	VDA_1802
13	Polirribonucleótido nucleotidil-transferasa	GI:268163301	VDA_2829
39	Asparagina sintetasa	GI:268162991	VDA_2519
66	Triptofanil ARNt sintetasa	GI:268162751	VDA_2279
	Metabolismo/Energía		
16	ATP sintetasa, subunidad beta	GI:268163703	VDA_3232
17	5´-Nucleotidasa	GI:268161095	VDA_0612
36	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NAHP)	GI:268162061	VDA_1583
51	NADH-quinona reductasa subunidad A	GI:268163133	VDA_2661
52	Proteína YdjA (Oxidoreductasa)	GI:268162065	VDA_1587
59	Probable ATPasa	GI:268162135	VDA_1658
60	Probable deshidrogenasa	GI:268160595	VDA_0110
67	L-lactato deshidrogenasa	GI:268161336	VDA_0853
	Estrés/Adaptación		
25	Proteína ClpB	GI:268161804	VDA_1325
	Desconocida		
7	Proteína hipotética	GI:268160597	VDA_0112
34	Proteína hipotética	GI:268161055	VDA_0572
40	Proteína hipotética	GI:268160829	VDA_0443
49	Proteína hipotética	GI:268161952	VDA_1474

(*) ORF no anotada en la secuencia de la cepa tipo ATCC33539, que presenta una similitud del 100% con la proteína HutX de la subespecie *piscicida*.

El *spot* 24 (Figura IV.3; Tabla IV.1) corresponde a un receptor de tipo TBDT y su gen está localizado en el plásmido pPHDD1, un plásmido que no está presente en todas las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* sino únicamente en las cepas más hemolíticas (Rivas et al., 2011). El *spot* 33 se corresponde con una de las proteínas TonB, cuyo gen se encuentra aguas arriba del receptor FhuE, y que podría participar en el transporte del complejo sideróforo-hierro, como ocurre en la mayoría de las bacterias de la familia *Vibrionaceae* (Kuehl & Crosa, 2010), habiendo sido ya identificado previamente como un gen regulado por hierro en la subespecie *piscicida* (Osorio et al., 2004).

Además del transportador ABC HutB, del sistema de transporte del grupo hemo, hemos encontrado otros 5 *spots* que corresponden a proteínas relacionadas con este tipo de transportadores, y cuyos genes están localizados en distintos puntos del genoma. Se trata de los *spots* 50, 61 y 65, que forman parte de un mismo sistema transportador; el 69, y el 70 (Figura IV.3, Tabla IV.1).

- Proteínas relacionadas con la síntesis de sideróforos:

Se localizaron 6 *spots* (45-47, 54 y 58) (Figura IV.3; Tabla IV.1) que se corresponden con 5 proteínas involucradas en la ruta de síntesis del triptófano, cuyos genes forman parte del operón *trpEGDCBA* (Bardowski et al., 1992), y el *spot* 44 que se corresponde con una DAHP (2-ceto-3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato) sintasa codificada por el gen *aroA,* que forma parte de la ruta metabólica del corismato (Kloosterman et al., 2003). Esta proteína interviene en la ruta de síntesis de varios sideróforos de tipo catecol en diferentes especies bacterianas (Crosa & Walsh, 2002), incluida *P. damselae* subsp*. piscicida* en la que se ha relacionado con la síntesis del sideróforo piscibactina (Osorio et al., 2006; Souto et al, 2012). En *V. anguillarum* interviene en la síntesis tanto del sideróforo anguibactina (Di Lorenzo et al., 2003) como de vanchrobactina (Balado et al., 2008) en cuya síntesis actúa la proteína VabG, con elevada homología con una DAHP sintasa y que se demostró es esencial para el crecimiento de *V. anguillarum* bajo condiciones de déficit de hierro. Todos los genes del operón *trpEGDCBA* podrían estar regulados por la misma región promotora, ya que contiene una caja-fur (Figura IV.6). Debido a los indicios que relacionan a estos genes

con la síntesis de sideróforos de tipo catecol, serán objeto de estudio más profundo a lo largo de este trabajo (véase apartado 3.2.1).

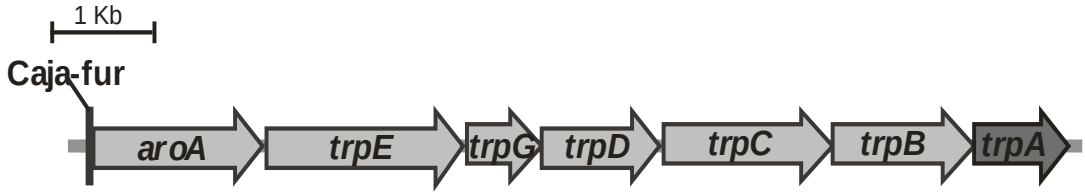

Figura IV.6: Representación del operón *trpEGDCBA* del que forman parte los 6 genes involucrados en la ruta de síntesis del triptófano y el gen *aroA* que interviene en la biosínteis del corismato.

- Proteínas relacionadas con la virulencia:

Fouz et al. (1994) demostraron la producción de hemolisinas por cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* bajo condiciones de déficit de hierro y se sabe que en *V. cholerae* la proteína Fur regula la producción de la hemolisina HlyA (Stoebner & Payne, 1988). En nuestro estudio hemos identificado dos *spots* que se corresponden con dos hemolisinas. El *spot* 26 (Figura IV.3; Tabla IV.1) corresponde a la damselisina (Dly), una fosfolipasa-D con actividad hemolítica (Kreger et al., 1987), codificada en el plásmido pPHDD1 (Rivas et al., 2011). La segunda hemolisina, representada en el *spot* 48 corresponde a $HlyA_{ch}$, una toxina formadora de poro codificada en el cromosoma, presente en todas las cepas hemolíticas de *P. damselae* subsp. *damselae* y que presenta una similitud del 92% con la hemolisina $HlyA_{pl}$ codificada en el plásmido pPHDD1. La hemolisina $HlyA_{ch}$ es responsable del fenotipo hemolítico basal que se observa cuando se mutan los dos genes de las hemolisinas plasmídicas, *dly* y $hlyA_{pl}$, y además es la única hemolisina presente en aquellas cepas que, siendo hemolíticas, carecen del plásmido pPHDD1 (Rivas et al., 2013). Los trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que los tres genes *dly,* $hlyA_{pl}$ *y* $hlyA_{ch}$ están regulados negativamente por hierro, y constituyen factores de virulencia clave de *P. damselae* subsp. *damselae,* tanto para peces como para homeotermos (Rivas et al., 2013).

- Otras proteínas:

Los *spots* 1 y 57 (Figura IV.3; Tabla IV.1) se corresponden con dos porinas, OmpH y OmpU, que forman canales acuosos para la difusión de pequeñas moléculas

hidrofílicas a través de la membrana externa. No hay unanimidad en la bibliografía en cuanto a la expresión de estos dos genes bajo diferentes condiciones de hierro. Estudios en *V. vulnificus* confirmaron la regulación positiva del gen *ompH* en condiciones de exceso de hierro (Alice et al., 2008). En cambio en *Pasteurella multocida,* y coincidiendo con nuestros resultados en *P. damselae* subsp*. damselae, ompH* es regulado negativamente por el hierro (Bosch et al., 2001). OmpU es una de las principales porinas en los Vibrios, y estudios recientes han demostrado que interviene en las interacciones entre hospedador y bacteria, estando involucrada en la resistencia a los péptidos antimicrobianos (AMP), la adherencia celular, o el reconocimiento de patógenos (Duperthuy et al., 2011). Además, en *V. cholerae* juega un papel en la integridad estructural del flagelo (Bari et al., 2012). En *V. fischeri* la regulación de *ompU* no está significativamente afectada por el hierro (Aeckersberg et al., 2001), en cambio en *V. alginolyticus* OmpU se expresa bajo condiciones de exceso de hierro (Xiong et al., 2010). En *V. cholerae*, en condiciones de exceso de hierro, existe una regulación positiva indirecta a través de Fur de la proteína OmpU, vía un ARN pequeño (ARNs) denominado RyhB. Este ARN regula negativamente la expresión de *ompU* y a la vez la expresión de *ryhB* es regulada por Fur (Mey et al., 2005), lo que constituye la primera referencia sobre la regulación positiva de la proteína OmpU en condiciones de déficit de hierro.

Dentro de las proteínas hierro reprimidas también se identificaron varias proteínas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos. Por ejemplo, el *spot* 11 (Figura IV.3; Tabla IV.1) codifica una proteína ribosómica (RPS1), un componente de la subunidad pequeña del ribosoma que se cree participa en el reconocimiento y la unión del ARNm durante la iniciación de la traducción. El *spot* 39 se corresponde con la enzima asparagina sintetasa, que cataliza la conversión -dependiente de ATP- de aspartato a asparagina, reacción que produce también AMP, glutamato y pirofosfato. La asparagina, al igual que el ácido cítrico, es empleada como quelante de hierro en *V. cholerae* (Sigel et al., 1985). El *spot* 66 corresponde a la enzima triptofanil ARNt sintetasa que cataliza la unión del aminoácido triptófano al extremo 3´ de su correspondiente ARNt. El triptófano, como ya se ha indicado, es un precursor de los sideróforos del grupo de los catecoles. El *spot* 13 se corresponde con una polirribonucleótido nucleotidil-transferasa,

que interviene en la degradación del ARNm en dirección 3´- 5´, y también interviene, junto con la RNasa II, en el procesamiento de ARNt.

Por otra parte, dentro de las proteínas con funciones metabólicas o de obtención de energía se encontraron ATPasas, 5´-nucleotidasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, nitrorreductasa (YdjA), L-lactato deshidrogenasa y NADH-quinona reductasas, entre otras (Figura IV.3; Tabla IV.1).

El *spot* 25 es la proteína ClpB que forma parte de un sistema multi-chaperona inducida por el estrés, y está implicada, en cooperación con DnaK, DnaJ y GrpE, en la recuperación de la célula de los daños inducidos por el calor (Kannan et al., 2008). En *V. cholerae* ClpB1 está involucrada en la respuesta a diferentes procesos de estrés como pueden ser altas temperaturas, pH alcalino o alta salinidad, y se cree que regula además la producción de la toxina colérica (CT) (Nag et al., 2005).

Proteínas específicas de la cepa RG91

Dentro de los *spots* hierro-reprimidos se localizaron tres que no presentaban homología con ninguna ORF de la cepa tipo ATCC33539, lo que sugiere por tanto que se trata de proteínas únicas de la cepa RG91:

Los *spots* 10 y 20 (Figura IV.3, Figura IV.7; Tabla IV.2) se corresponden con dos proteínas que presentan una identidad del 73 y del 79%, respectivamente, con dos receptores de vibrioferrina descritos en *V. parahaemolyticus*: PvuA (712 aminoácidos) y PsuA (678 aminoácidos).

Por otro lado el *spot* 64 (Figura IV.3, Figura IV.7; Tabla IV.2) presenta una identidad del 80% con la proteína PvsD de *V. parahaemolyticus*, una enzima de 609 aminoácidos que interviene en la síntesis de vibrioferrina, un sideróforo de tipo ácido-α-hidroxicarboxílico.

Tabla IV.2: Proteínas hierro-reprimidas presentes en la cepa RG91.

Spot	gel	Función/homología	Gen	Nº de acceso	Identidad	Aminoácidos positivos
10	D	Receptor vibrioferrina (*V. parahaemolyticus*)	*pvuA*	GI:328469442	73%	79%
20	D	Receptor vibrioferrina (*V. parahaemolyticus*)	*psuA*	GI:328469443	79%	84%
64	D	Posible PvsD (*V. parahaemolyticus*)	*pvsD*	GI:328469447	80%	96%

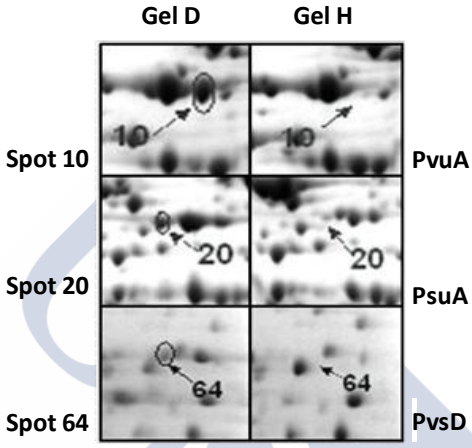

Figura IV.7: *Spot*s hierro-reprimidos (presentes en el gel D y ausentes en el gel H) que se encuentran presentes únicamente en la cepa RG91.

Los receptores de membrana PvuA y PsuA se describieron por primera vez en *V. parahaemolyticus* como dos proteínas de membrana que se expresan bajo condiciones de deficiencia de hierro y fueron identificados respectivamente como un receptor de dependientes de TonB (Yamamoto et al., 1995). Posteriormente se localizaron formando parte de un mismo operón los genes que codificaban los dos receptores (Funahashi et al., 2002). PvuA se identificó desde el principio como el receptor de vibrioferina (Funahashi et al., 2002), y aunque PsuA en un principio se pensaba que era responsable del transporte de sideróforos externos, más tarde se confirmó su participación también en el transporte de vibrioferrina (Tanabe et al., 2011). El clúster *psuA-pvuABCDE* está regulado por hierro y contiene 4 genes (Figura IV.8) que codifican las proteínas que forman parte del transportador ABC. Estos genes están presentes en varios vibrios como *V. parahaemolyticus* (Tanabe et al., 2003), *V. alginolyticus* (Wang et al., 2007) y otros.

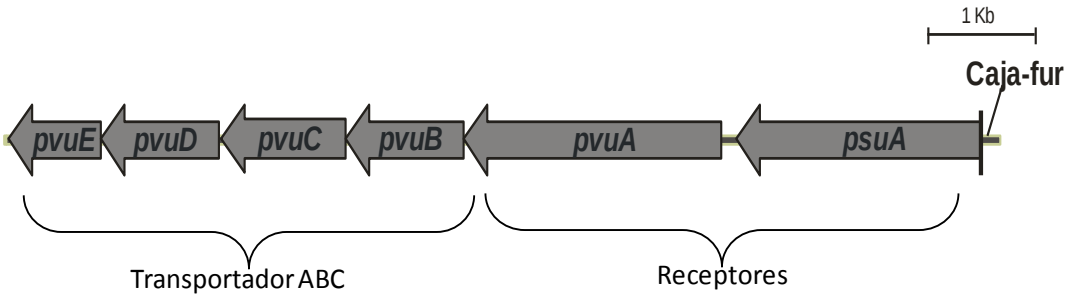

Figura IV.8: Operón de transporte de vibrioferrina en *V. parahaemolyticus,* con los genes *pvuA* y *psuA* que codifican dos receptores de vibrioferrina dependientes de TonB y los genes *pvuBCDE* que codifican el transportador ABC.

La proteína PvsD es una de las enzimas que intervienen en la síntesis independiente de NRPS del sideróforo vibrioferrina. Es una enzima de tipo A que cataliza la condensación de un grupo hidroxilo de una etanolamina (cuadro verde) y el grupo carboxilo del ácido cítrico (cuadro rojo) en la biosíntesis de la vibrioferrina (Challis, 2005) (Figura IV.9).

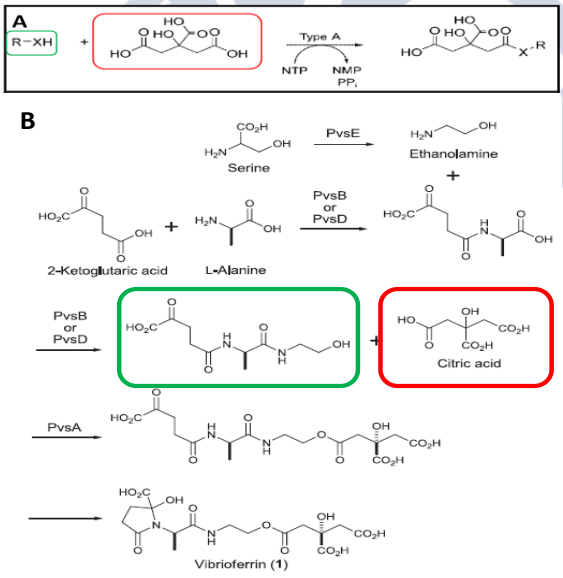

Figura IV.9: Función catalítica de la enzima PvsD. A: esquema de las enzimas de tipo A en el sistema de síntesis independiente de NRPS; el grupo principal es el ácido cítrico. B: Esquema de la ruta de síntesis de la vibrioferrina (Challis, 2005; Fujita et al., 2011).

Todos estos datos sugieren que estas tres proteínas PvuA, PsuA y PvsD están involucradas en el transporte y la biosíntesis del sideróforo vibrioferrina en la cepa

RG91, al igual que en muchas otras especies de la familia *Vibrionaceae*. Por ello todas estas proteínas serán objeto de estudios posteriores en este trabajo.

2.1.2 Proteínas hierro inducidas

El *spot* 3 (Figura IV.4; Tabla IV.3) fue identificada como la flagelina FlpB que forma parte del núcleo del flagelo bacteriano. El gen *flpB* se ha descrito en *Helicobacter pylori* como un gen regulado positivamente por Fur bajo condiciones de exceso de hierro (Danielli et al., 2006), mientras que la transcripción de *flpB* en déficit de hierro sólo ocurre en la fase estacionaria (Kim et al., 2014). Esto sería contradictorio con la idea de que la movilidad facilita la colonización, pero se sabe que existen genes de virulencia en *H. pylori* que se regulan de la misma manera (Danielli et al., 2006). En *V. vulnificus* se descubrió que la región genómica *flp* se expresa durante la infección en humanos (Bisharat et al., 2013). Podría ocurrir que Fur funcione como un antirepresor mediante la eliminación o el bloqueo de la unión al ADN de un represor de la transcripción (Nandal et al., 2010). Mutantes dobles *ΔflpBD* en *V. vulnificus* muestran un significativo decrecimiento de la motilidad, y los mutantes *flpB* pierden la capacidad de adherirse a las células así como la citotoxicidad (Kim et al., 2014), datos que revelan su importante papel en la virulencia.

El *spot* 35 (Figura IV.4; Tabla IV.3) se corresponde con la proteína OppD, uno de los componentes de las porinas de oligopéptidos Opp en *Salmonella typhimurium* codificada por el operón *oppABCD* (Hiles et al., 1987). Presenta un dominio de unión a ATP y está vinculada al transporte de niquel y oligopéptidos. Los mutantes de *oppD* presentan una menor capacidad para adherirse e infectar los macrófagos en comparación con la del tipo salvaje, aunque las dos cepas presentan el mismo potencial para colonizar el bazo, causar lesiones y provocar la muerte de ratones infectados por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Moraes et al., 2014). Este sería otro ejemplo de genes probablemente regulados positivamente por Fur y que son importantes para la virulencia bacteriana.

Tabla IV.3: Proteínas hierro-inducidas en RG91 con homología con las codificadas en el genoma de la cepa tipo ATCC33539.

Spot	Categoría / Proteína	Nº de acceso	LOCUS en la ATCC 33539
	Receptores/Transporte		
35	Proteína OppD	GI:268162112	VDA_1635
	Síntesis flagelo		
3	Proteína flagelina FlaB	GI:268163079	VDA_2607
	Porinas		
2	Maltoporina (LamB)	GI:268161259	VDA_0776
	Metabolismo de aminoácidos y derivados		
6	Carbamato quinasa	GI:268163399	VDA_2927
8	Glutamina sintetasa tipo I	GI:268163604	VDA_3133
23	Metionil ARNt sintetasa	GI:268162141	VDA_1664
38	2-amino-3-cetobutirato coenzima A ligasa	GI:268162419	VDA_1947
31	Arginina deaminasa	GI:268163398	VDA_2926
55	5'-metiltioadenosina nucleosidasa	GI:268163013	VDA_2541
	Energía/Metabolismo		
4	Succinato deshidrogenasa subunidad B	GI:268163519	VDA_3048
5	Fosfopentomutasa	GI:268163282	VDA_2810
9	2,3-bisfosfoglicerato–independiente de fosfoglicerato mutasa	GI:268163836	VDA_3365
15	Aldolasa desoxirribosa-fosfato	GI:268163284	VDA_2812
29	Succinato deshidrogenasa subunidad A	GI:268163518	VDA_3047
42	Proteína DsbA	GI:268163685	VDA_3214
50	Piruvato formiato liasa	GI:268161955	VDA_1477
56	Arabinosa 5-fosfato isomerasa	GI:268163992	VDA_3521
	Estrés/Adaptación		
14	Proteína Dps	GI:268161598	VDA_1117
18	Catalasa/peroxidasa	GI:268162470	VDA_1998
22	Glutamato decarboxilasa	GI:268161806	VDA_1327
	Desconocido		
32	Proteína hipotética	GI:268161449	VDA_0237
41	Proteína hipotética	GI:268162724	VDA_2252
43	Proteína hipotética	GI:268161620	VDA_1139

El *spot* 2 (Figura IV.4; Tabla IV.3), LamB, es una maltoporina de sustrato específico que facilita la difusión de maltodextrinas y otros azúcares a través de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. LamB también sirve como receptor de algunos bacteriófagos incluido el bacteriófago lambda de *E. coli* (Charbit & Hofnung, 1985).

Los *spots* 14, 18 y 22 (Figura IV.4, Tabla IV.3), forman parte de las proteínas que se expresan bajo condiciones de estrés, más concretamente en condiciones de alta concentración de hierro. Incluyen oxidorreductasas (Dps y otra), una catalasa/ peroxidasa y la glutamato descarboxilasa, que se expresa como respuesta al pH ácido y al estrés.

Los *spots* 6, 8, 23, 38, 31 y 55 (Figura IV.4; Tabla IV.3), se corresponden con proteínas del metabolismo de aminoácidos: carbamato quinasa, glutamina sintetasa, metionil ARNt sintetasa, 2-amino-3-cetobutirato coenzima A ligasa, arginina deaminasa y la 5'-metiltioadenosina nucleosidasa. Los *spots* 9 y 50 son enzimas de la glucolisis: una 2,3-bisfosfoglicerato independente de fosfoglicerato mutasa y la piruvato formiato liasa.

Los *spots* 4 y 29 (Figura IV.4; Tabla IV.3) se corresponden con una succinato deshidrogenasa subunidad B y A, respectivamente, y que son las dos subunidades hidrófilas de la succinato deshidrogenasa, la cual cataliza la conversión de succinato a fumarato. El complejo está ligado a la membrana mitocondrial e interviene en el ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones. Los *spots* 5, 42 y 56 (Figura IV.4; Tabla IV.3), son enzimas que forman parte de la biosíntesis de lipopolisacáridos, como la fosfopentomutasa, una oxidorreductasa, la proteína DsbA y la arabinosa-5-fosfato isomerasa.

2.2 Las cepas tipo A sintetizan vibrioferrina como sideróforo

La vibrioferrina es un miembro de los sideróforos de tipo carboxilato que se forma a partir de ácido 2-cetoglutárico, L-alanina, etanolamina y ácido cítrico. Fue originalmente aislado en *V. parahaemolyticus*, una bacteria normalmente asociada con brotes de gastroenteritis y que fue extensamente estudiada por Yamamoto et al. (1992; 1994). Los genes de síntesis de vibrioferrina están ampliamente distribuidos en la microbiota oceánica de la que forman parte los vibrios (Gardes et al., 2013). El sideróforo también fue aislado de varias especies de *Marinobacter,* bacterias que se encuentran en asociación simbiótica con algas (Amin, 2009).

2.2.1 Detección de vibrioferrina en la cepa RG91

Considerando los datos descritos hasta el momento, nos planteamos la posibilidad de que la cepa RG91 pudiese sintetizar el sideróforo vibrioferrina (Figura IV.10). Para demostrar esta hipótesis, se obtuvieron sobrenadantes ricos en sideróforos a partir de cultivos de la cepa RG91 crecida durante 24 h en el medio mínimo CM9 con 40 µM del agente quelante dipiridil y se llevó a cabo la detección de vibrioferrina en el sobrenadante mediante análisis químico. Este trabajo se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Profesor Carlos Jiménez, del departamento de Química Fundamental de la Universidad de A Coruña. La detección fue facilitada por el hecho de conocerse en detalle la estructura de la vibrioferrina de *V. parahaemolyticus* (Yamamoto et al., 1994).

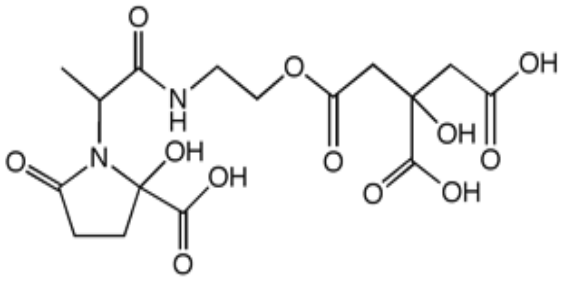

Figura IV.10: Estructura de la vibrioferrina.

Mediante una extracción en fase sólida se obtuvo una fracción con actividad sideróforo en los bioensayos, a partir de la cual se obtuvo otra fracción activa soluble en metanol que fue analizada por HPLC-MS. El cromatograma resultante de la monitorización selectiva de los iones de relación m/z comprendidos entre 390.00 y 450.00, permitió distinguir dos picos de interés, uno a 2,53 min y otro a 4,01 min. El espectro de masas electrospray en modo negativo, (-)-ESIMS, del pico cromatográfico con tiempo de retención de 2,53 min mostró el ion pseudomolecular $[M-H]^-$ a m/z 433 que se corresponde con el peso molecular de la vibrioferrina. Asimismo, el espectro de masas de alta resolución a m/z 433.1099 coincidía también con el correspondiente a vibrioferrina. Adicionalmente, el espectro de masas (-)-ESIMS del pico cromatográfico con tiempo de retención de 4,01 min y el espectro de masas de alta resolución a m/z 441.0952 coincidían perfectamente con los correspondientes al complejo de vibrioferrina quelatado con boro (Figura IV.11). Todo ello demuestra que la vibrioferrina está presente en los sobrenadantes de la cepa RG91 cuando se cultiva en condiciones de déficit de hierro.

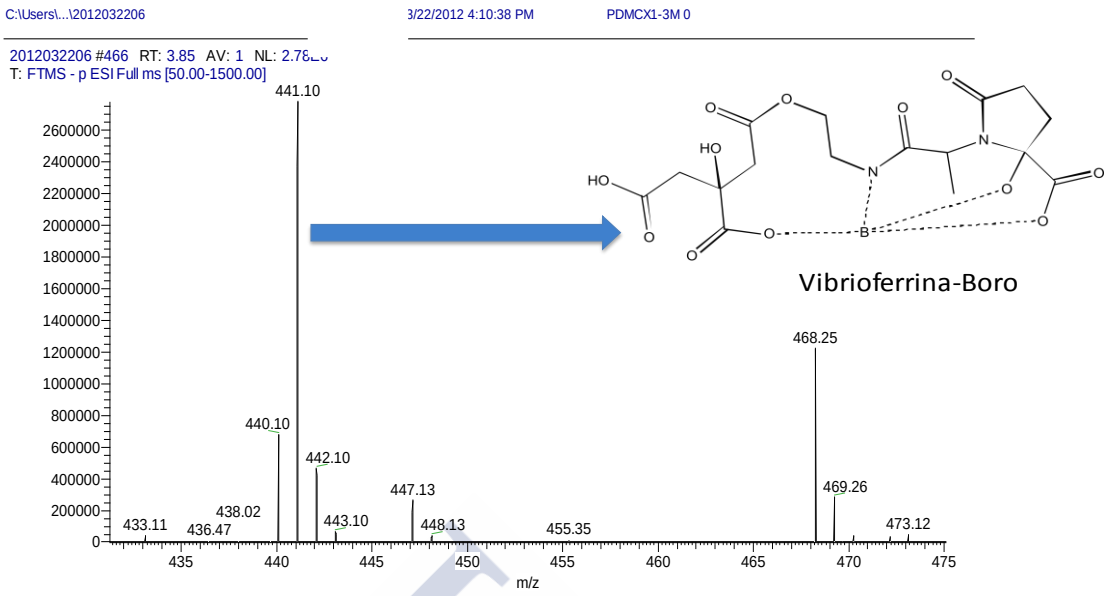

Figura IV.11: Espectro de masas de la fracción obtenida por HPLC que contiene la vibrioferrina quelada con Boro.

2.2.2 Identificación de la región genómica que codifica la síntesis y transporte de vibrioferrina

Basándonos en la disposición y secuencia nucleotídica de los genes de biosíntesis y transporte de vibrioferrina en *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, organizados en dos operones próximos en el genoma, *pvsABCDE* y *psuA*-pvuABCDE (Tanabe et al., 2003; Wang et al., 2007), nos planteamos como hipótesis de partida que la cepa RG91 presentase la misma distribución, por lo que procedimos a secuenciar las regiones cromosómicas adyacentes al gen *pvsD*, tomando como punto de partida la secuencia peptídica de la proteína PvsD obtenida mediante el estudio de proteómica descrito en el apartado anterior.

Comparación de las secuencias de los genes *pvsD*; diseño de cebadores degenerados

En un principio disponíamos de secuencias peptídicas parciales de la proteína PvsD (identificadas mediante MALDI-TOF) que no permitían diseñar cebadores ni amplificar tamaños grandes del gen. Por ello se procedió a comparar las secuencias nucleotídicas de homólogos de los genes *pvsD* depositadas en el GenBank, que se encontraban distribuidas y muy conservadas dentro del género *Vibrio*, para diseñar en base a ello cebadores degenerados para amplificar por PCR los genes homólogos en la

cepa RG91 (Figura IV.12). Las secuencias elegidas (alineadas a través de la aplicación *ClustalW Multiple alignment* del programa bioinformático Bioedit) fueron las de los genes *pvsD* de *V. parahaemolyticus*, (Nº de acceso: AB082123.1; GI: 23307114), *V. alginolyticus* (Nº de acceso: DQ201184.2; GI: 120564760), *V. splendidus* (Nº acceso: NC_011744.2; GI: 294510242), *V. caribbenthicus* (Nº acceso: EFP94847.1; GI: 309367283) y *V. harveyi* (Nº acceso: EMR36193.1; GI: 471343428).

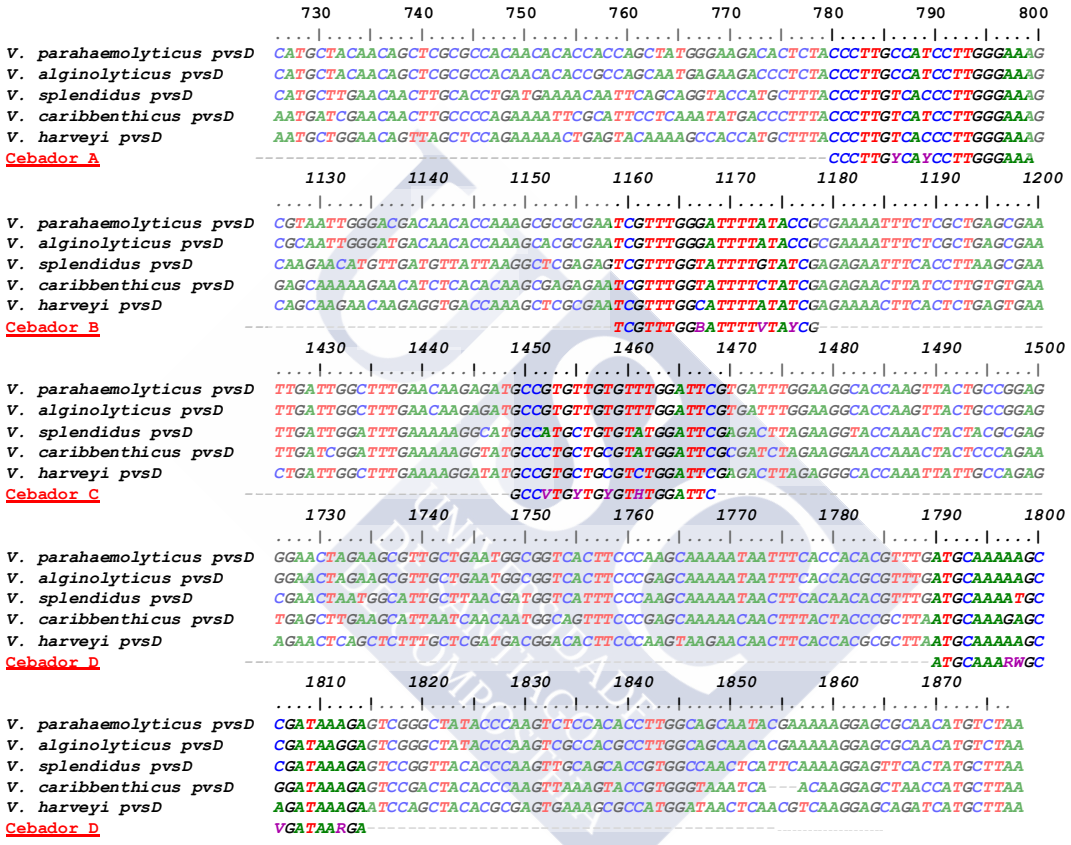

Figura IV.12: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los genes *pvsD* de *V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. splendidus, V. harveyi* y *V. caribbenthicus*, y diseño de los cebadores degenerados A, B, C y D.

Utilizando todas las combinaciones de cebadores degenerados, se logró amplificar fragmentos del tamaño esperado en la cepa RG91 (Figura IV.13), lo cual indicaba que esta cepa realmente poseía un gen *pvsD*, homólogo a los demás genes *pvsD* del genero *Vibrio*.

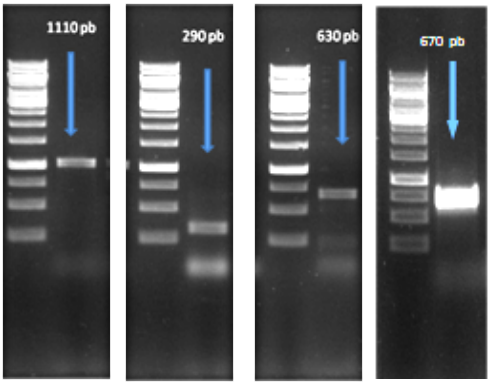

Figura IV.13: PCR de las parejas de cebadores degenerados, dando el tamaño esperado en la cepa RG91, de izquierda a derecha: fragmento con cebadores AD, BC, BD, AC.

Se secuenciaron unas 900 pb del fragmento obtenido de la cepa RG91, corroborándose que se trataba de un gen homólogo a *pvsD*. A continuación se procedió a secuenciar el entorno genético de este gen en RG91 para confirmar si los demás genes necesarios para la síntesis de vibrioferrina se encontraban distribuidos formando un operón de síntesis *pvs* (Figura IV.14).

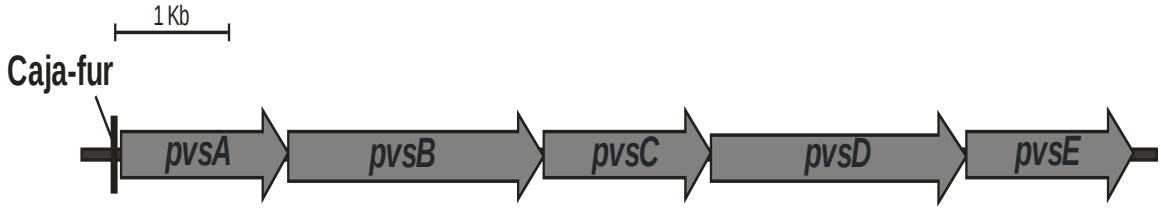

Figura IV.14: Operón de síntesis de Vibrioferrina en *V. parahaemolyticus.*

Búsqueda del contexto genético del gen de síntesis *pvsD*

Se construyó una genoteca de cósmidos para facilitar la localización del gen *pvsD* en la cepa RG91 y poder así ampliar la región secuenciada de 900 pb. Se realizó un rastreo de todos los cósmidos empleando para ello una pareja de cebadores diseñada directamente a partir de este fragmento de 900 pb de la cepa RG91. Una única colonia de *E. coli* XL blue dio lugar a una amplificación positiva para el gen *pvsD* y se denominó BPcos194, que contenía la secuencia nucleotídica completa de los operones de síntesis y transporte de vibrioferrina.

Una vez localizado el cósmido positivo para *pvsD*, se procedió a su secuenciación mediante corte con *Hind*III y subclonación en el vector pT7-7 (Figura IV.15).

Empleando el cósmido BPcos194 se extendió la secuencia en ambas direcciones y se identificaron los dos operones completos de síntesis y transporte de la vibrioferrina, respectivamente (Figura IV.16). Al completar la secuencia se comprobó que las ORFs de los extremos de los operones no mostraban homología con ninguna región de la cepa tipo de *P. damselae* subsp*. damselae* ATCC33539 y, curiosamente, se correspondían con funciones típicamente propias de elementos genéticos móviles. Así, la ORF localizada aguas abajo de *pvsE*, mostró una similitud del 92% con una endonucleasa de *V. cholerae*, mientras que la ORF aguas abajo de *pvuE* mostró una similitud del 91% con una transposasa de *V. halioticoli*. Además, las ORFs de los extremos del inserto clonado en el cósmido BPcos194 tampoco mostraron homología con la secuencia de la cepa ATCC33539, lo cual sugiere que la cepa RG91 no sólo ha adquirido los genes de síntesis y transporte de vibrioferrina sino además otras secuencias flanqueantes -posiblemente formando parte de un elemento móvil- por transferencia horizontal en forma de plásmido o isla genómica. Todo ello será motivo de estudio más adelante (véase apartado 2.3).

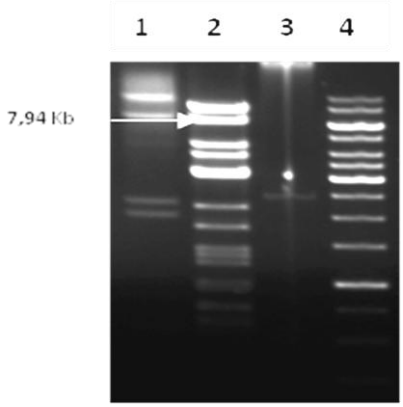

Figura IV.15: Cósmido BPcos194 cortado con *Hind*III (línea 2) y sus fragmentos clonados en el plásmido pT7.7 (linea 3). Línea 1 marcador DNA fago λ. Línea 4 marcador de peso molecular de 1 kb, el supercos mide unas 7.94 kb.

Predicción de ORFs y estudios de homología

A medida que se avanzó en la secuenciación del entorno del gen *pvsD*, con la secuencia de aminoácidos se procedió al análisis de las homologías. Se secuenciaron en total unas 15,5 kb de ADN nuevo de la cepa RG91, que incluían 11 genes homólogos a *psuA* y a los genes *pvs* y *pvu.* A continuación se detallan las homologías de todas las proteínas predichas a partir de la secuencia obtenida.

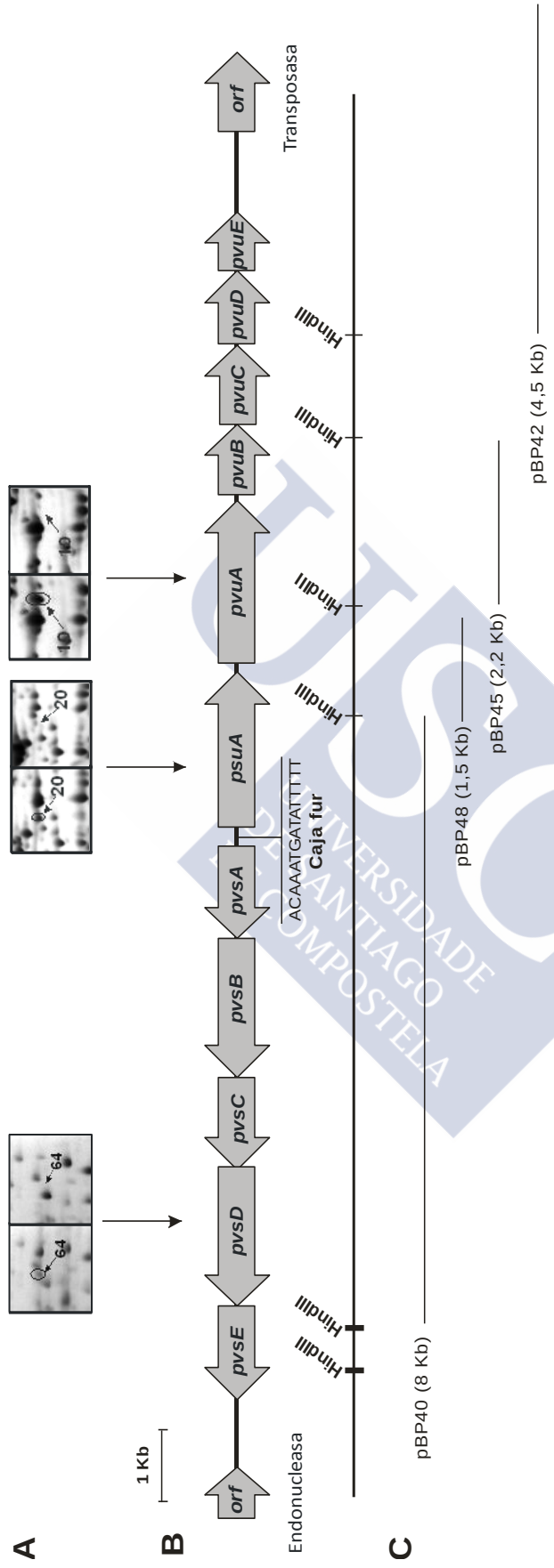

Figura IV.16: (A): Representación de los *spots* 64, 20 y 10 de la cepa RG91. (B): Mapa de restricción y organización genética de los operones *pvsABCDE* y *psuA-pvuABCDE* en RG91. (C) Insertos subclonados del cósmido BPcos194 en PT7-7 que nos sirvieron de guías para la secuenciación completa de los operones.

Proteínas de Biosíntesis de Vibrioferrina

PvsE: Proteína con una similitud del 90% con la descarboxilasa PvsE de *V. harveyi* (Tabla IV.4). Presenta un dominio descarboxilasa *Orn_Arg_deC_N* (Pfam: PF02784) de unión a piridoxal. Se cree que cataliza la descarboxilación de la serina para dar etanolamina (compuesto 17, Figura IV.17), que sería el primer paso de la biosíntesis de vibrioferrina (Challis, 2005).

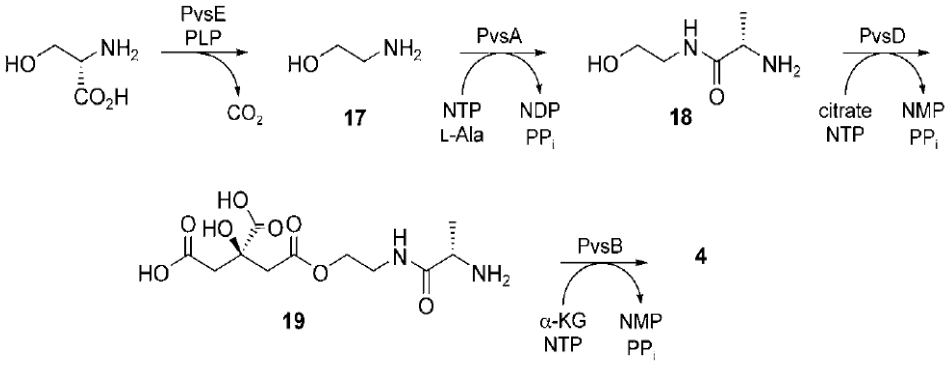

Figura IV.17: Esquema de la ruta de síntesis de la Vibrioferrina (Challis, 2005).

PvsD: Presenta una similitud del 99% con la aconitasa PvsD de biosíntesis de vibrioferrina de *V. harveyi* (Tabla IV.4). El N-terminal presenta el dominio *IucA_IucC* (Pfam: PF04183) que cataliza pasos en la biosíntesis de sideróforos a partir de citrato, mientras que la secuencia C-terminal presenta el dominio *FhuF* (Pfam: PF06276) que está involucrado en la reducción del ión férrico. Parece que cataliza la formación de un enlace éster entre un grupo hidroxilo del acil-fosfato intermediario (compuesto 18, Figura IV.17) y el grupo carboxilo proximal del citrato (Challis, 2005).

PvsC: Muestra una similitud del 99% con PvsC de *V. harveyi* (Tabla IV.4), una bomba de flujo de fármacos. Presenta un dominio MFS (*Major facilitator superfamily*) (Pfam: PF07690) que facilita el transporte a través de la membrana plasmática a varios sustratos (iones, fosfatos de azúcar, fármacos, aminoácidos, péptidos etc). Es el transportador de membrana encargado de exportar la vibrioferrina hacia el exterior (Tanabe et al., 2006). El gen *pvsC* es pues el único gen del operón que no forma parte de la ruta de biosíntesis.

Tabla IV.4: Predicción de proteínas del sistema de biosíntesis de vibrioferrina en la cepa RG91 de *P. damselae* subsp*. damselae,*y sus homologías.

Proteína de RG91 (tamaño)	Homología	Nº de acceso	Identidad	Similitud
PvsE (405 aa)				
Proteína descarboxilasa, PvuE	*V. harveyi*	WP_005449429.1	80%	90%
Diaminopimelato descarboxilasa	*V. parahaemolyticus*	WP_023623785.1	76%	89%
Diaminopimelato descarboxilasa	*V. alginolyticus*	WP_005374698.1	75%	88%
PvsD (608 aa)				
Proteína de biosíntesis de vibrioferrina, PvsD	*V. harveyi*	WP_005449427.1	98%	99%
Aconitasa	*V. parahaemolyticus*	WP_024700886.1	77%	86%
Aconitasa	*V. alginolyticus*	WP_005383475.1	77%	86%
PvsC (399 aa)				
Bomba de flujo de fármacos, PvsC	*V. harveyi*	WP_005449425.1	98%	99%
Transportador MFS	*V. harveyi*	WP_017188945.1	98%	99%
Proteína transportadora	*V. parahaemolyticus*	WP_021822093.1	73%	82%
PvsB (603 aa)				
Proteína de biosíntesis de vibrioferrina, PvsB	*V. harveyi*	WP_017188947.1	97%	98%
Proteína de biosíntesis de vibrioferrina, PvsB	*V. caribbenthicus*	WP_009603303.1	86%	90%
Proteína de biosíntesis de vibrioferrina, PvsB	*V. splendidus*	WP_004731700.1	79%	86%
PvsA (404 aa)				
Proteína de biosíntesis de vibrioferrrina, PvsA	*V. harveyi*	WP_005449418.1	93%	96%
Ligasa amino-carboxilasa	*V. splendidus*	WP_017189235.1	76%	88%
Ligasa amino-carboxilasa	*V. parahaemolyticus*	WP_029837132.1	72%	83%

PvsB: Proteína con una similitud del 97% con el enzima PvsB de *V. harveyi* (Tabla IV.4). Al igual que PvsD presenta un dominio N-terminal *IucA_IucC* (Pfam: PF04183) y un dominio C-terminal *FhuF* (Pfam: PF06276). Es una enzima sintetasa que pertenece al grupo B. Cataliza la condensación de un grupo amino con un grupo carboxilo en el C5 del α-cetoglutarato (compuesto 19, Figura IV.17) de la vibrioferrina (Challis, 2005).

PvsA: Presenta una similitud del 93% con PvsA de *V. harveyi* (Tabla IV.4). Presenta un dominio con actividad carboxilato-amina ligasa dependiente de ATP (Pfam: PF13535). Cataliza la activación inicial del grupo carboxilo en L-Ala a través de la reacción con ATP para generar un acil-fosfato intermediario (compuesto 18, Figura IV.17) (Challis, 2005).

En resumen, desde el punto de vista genético, la cepa RG91 de *P. damselae* subsp*. damselae* contiene todos los genes con homología a los componentes del sistema de síntesis de vibrioferrina presente en distintas especies de *Vibrio* (Tabla IV.4). Además

hemos demostrado que RG91 es capaz de sintetizar vibrioferrina, aunque desconocemos si estos genes identificados en *P. damselae* son funcionales (véase apartado 2.2.4).

Proteínas de transporte de Vibrioferrina

PsuA: 90% de similitud con un canal específico de sustrato de *V. harveyi* (Tabla IV.5). Presenta un dominio en el extremo N-terminal que actúa como la puerta del canal (Pfam: PF07715), y un dominio (caja-TonB), de unión a la proteína TonB en el extremo C-terminal (Pfam: PF00593). Se trata de un monómero con un canal formado por 22 láminas-β transmembrana.

PvuA: Presenta una similitud del 96% con una proteína canal específica de sustrato de *V. harveyi* (Tabla IV.5). Contiene los mismos dominios que PsuA, por lo que se trata de un receptor dependiente de TonB.

PvuB: Presenta un 98% de similitud con la subunidad transportadora de dicitrato férrico de *V. harveyi* (Tabla IV.5). Contiene un dominio *Peripla_BP_2* (Pfam: PF1497) de unión periplásmica al complejo Fe^{3+}-sideróforo. Pertenece a la familia de las proteínas TroA que tiene dos subunidades globulares conectadas por una larga hélice alfa. La unión específica con el ligando se encuentra en la hendidura entre los dos dominios. Forma parte del transportador ABC.

PvuC: Tiene una identidad del 96% con un transportador ABC de *V. harveyi* (Tabla IV.5). Presenta un dominio *FecCD* (Pfam: PF01032) que es una subunidad transmembrana que se une a la proteína de unión periplásmica del transportador ABC.

PvuD: Proteína con un 98% de similitud con la permeasa del transportador ABC para citrato-Fe^{+3} de *V. harveyi* (Tabla IV.5). También presenta un dominio de *FecCD* (Pfam: PF01032). Es una enzima del transportador ABC con función permeasa.

PvuE: Presenta un 98% de similitud con la ATPasa acoplada a un transportador de hierro de tipo ABC de *V. harveyi* (Tabla IV.5). Presenta un dominio *ABC_tran* (Pfam: PF00005) que es una subunidad transportadora de dicitrato férrico unido a ATP.

Tabla IV.5: Predicción de proteínas del sistema de transporte de vibrioferrina en la cepa RG91 de *P. damselae* subsp. *damselae* y sus homologías.

Proteína de RG91 (tamaño)	Homología	Nº de acceso	Identidad	Similitud
PsuA (677)				
Proteína canal específica de sustrato	*V. harveyi*	WP_029789870.1	83%	90%
Receptor de sideróforo	*V. harveyi*	WP_005449417.1	83%	90%
Proteína receptora dependiente de TonB	*V. parahaemolyticus*	EVT90401.1	78%	89%
PvuA (705)				
Proteína canal específica de sustrato	*V. harveyi*	WP_005449416.1	93%	96%
Receptor de vibrioferrina	*V. harveyi*	WP_009603299.1	88%	93%
PvuA	*V. alginolyticus*	YP_008548269.1	82%	89%
PvuB (307)				
Subunidad transportadora de dicitrato-Fe^{+3}	*V. harveyi*	WP_026000197.1	97%	98%
Proteína de unión con sideróforo-Fe^{+3}	*V. caribbenthicus*	WP_021484635.1	80%	89%
Proteína de unión periplásmica	*V. parahaemolyticus*	WP_021484635.1	72%	84%
PvuC (394)				
Transportador ABC	*V. harveyi*	WP_005449414.1	95%	96%
ABC transportador-hierro	*V. caribbenthicus*	WP_009603298.1	83%	90%
ABC transportador-hierro	*V. cyclitrophicus*	WP_017188952.1	81%	89%
PvuD (323 aa)				
Permeasa transportador ABC citrato Fe^{+3}	*V. harveyi*	WP_017819179.1	98%	98%
Permeasa transportador ABC citrato Fe^{+3}	*V. caribbenthicus*	WP_009603297.1	90%	94%
Permeasa transportador ABC ferricromo	*V. parahaemolyticus*	NP_801163.1	82%	90%
PvuE (254 aa)				
ATPasa acoplada a transportador ABC	*V. harveyi*	WP_017819178.1	94%	98%
Transportador ABC de hierro	*V. caribbenthicus*	WP_009603296.1	86%	95%
Transportador ABC de hierro	*V. splendidus*	WP_004731684.1	87%	94%

Con todo lo expuesto se confirma que la cepa RG91 contiene todos los genes del sistema de transporte de vibrioferrina y que estos genes se presentan en el genoma agrupados en dos operones, al igual que los descritos en *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* (Tanabe et al., 2003; Wang et al., 2007).

2.2.3 Distribución de los genes de síntesis y transporte y la producción de vibrioferrina en cepas de *P. damselae* subsp. *damselae*.

Distribución de los genes *pvsD*, *pvuA* y *pvuC* en las cepas de *P. damselae*

Considerando los datos obtenidos hasta ahora, nos planteamos la posibilidad de que el sistema de asimilación de hierro mediante vibrioferrina se encontrase distribuido de forma uniforme en la subespecie *damselae* (a excepción de la cepa ATCC33539 que no contiene los genes de síntesis y transporte de vibrioferrina en su genoma y además

presentaba valores de CAS muy bajo (ver apartado 1)). Para demostrarlo se estudió mediante PCR la presencia o ausencia de los genes responsables, descritos en el apartado anterior.

Para ello se eligió el gen *pvsD*, como representante de los genes de síntesis, el gen *pvuA* como representante de los genes que codifican los receptores, y el gen *pvuC* como representante de los genes de transporte. Se utilizó como base genética para el diseño de los cebadores la secuencia de la cepa RG91. Los fragmentos amplificados tenían un tamaño aproximado de 500 pb.

Del total de 44 cepas analizadas, únicamente 10 cepas dieron un resultado positivo para la presencia de los tres genes: *pvsD* (síntesis), *pvuA* (receptor) y *pvuC* (transporte) (Tabla IV.6). No se encontró ninguna cepa que fuese positiva únicamente para uno o dos de los genes analizados. Curiosamente la cepa RM71, representante de las cepas tipo B de la subsp. *damselae*, dio también un resultado negativo para la presencia de los tres genes, por lo que se utilizará como control negativo para los estudios posteriores.

Los resultados obtenidos sobre la distribución de los genes relacionados con la síntesis y utilización de vibrioferrina entre cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* concuerdan con los obtenidos en otras especies cuando se analiza la presencia de islas de patogenicidad. Por ejemplo en *Shigella* la presencia y la ubicación de las islas de patogenicidad que codifican distintos sistemas de transporte como Sit (transportador de Fe^{+2}), Iuc/iutA (síntesis y transporte de aerobactina), Fec (transporte de di-citrato férrico), y Shu (transporte de hemo) varían considerablemente entre las diferentes especies, e incluso entre cepas de la misma especie (Wyckoff et al., 2009). Asimismo, en *P. damselae* subsp. *piscicida* los genes responsables de la síntesis y transporte del sideróforo piscibactina no son ubicuos en todas las cepas, ya que también se encuentran formando parte de una isla de patogenicidad que está además alojada en un plásmido, por lo que sólo se encuentra en las cepas de origen europeo (Osorio et al., 2015).

Tabla IV.6: Distribución de tres genes del sistema de síntesis y transporte de vibrioferrina en cepas de *P. damselae* subsp. *damselae*. Se resaltan en amarillo las cepas positivas para los tres genes analizados.

Cepa	Origen	Hospedador	*pvsD* (síntesis)	pvuA (receptor)	pvuC (transporte)
ATCC33539	EE.UU.	Pez ángel (*Chromis punctipinnis*)	-	-	-
RG-91	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	+	+	+
LD-07	España	Dorada (*Sparus aurata*)	-	-	-
RM-71	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	-	-	-
RG-214	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	+	+	+
CDC2227-81	EE.UU.	Humano	+	+	+
ATCC35083	EE.UU.	Tiburón *(Carcharhinus plumbeus*)	-	-	-
ACR208.1	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	+	+	+
VIRO-RIÑÓN	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	+	+	+
AZ247.1	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	+	+	+
AZ245.1	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	+	+	+
ACRp-72.1	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	-	-	-
TW294 L2	España	Lubina (*Dicentrarchus labrax*)	-	-	-
TW250/03	España	Dorada (*Sparus aurata*)	-	-	-
TW462/02.1	España	Dorada (*Sparus aurata*)	-	-	-
J3G-801	Taiwán	Langostino (*Penaeus monodon*)	-	-	-
238	EE.UU.	Delfín (*Tursiops truncatus*)	-	-	-
158	Bélgica	Anguila (*Anguilla anguilla*)	-	-	-
162	Bélgica	Anguila (*Anguilla anguilla*)	-	-	-
192	EE.UU.	Delfín (*Tursiops truncatus*)	-	-	-
RG-153	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	+	+	+
309	España	Mejillón (*Mytilus edulis*)	-	-	-
PG-801	Taiwán	Langostino (*Penaeus monodon*)	-	-	-
430	España	Agua de mar	-	-	-
ACRp72.1	España	Rodaballo (*Psetta maxima*)	-	-	-
H22060601R	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	+	+	+
H01100403DI	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	+	+	+
H29060602R	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	+	+	+
C11080601R	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	-	-	-
D20040408U	España	Dorada (*Sparus aurata*)	-	-	-
H09060401H	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	-	-	-
H29040401H	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	-	-	-
H14060501H	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	-	-	-
H011004020	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	-	-	-
LB07070501R	España	Lubina (*Dicentrarchus labrax*)	-	-	-
S04070503C	España	Sargo (*Diplodus sargus*)	-	-	-
LCA24907	España	Barramundi (*Lates calcarifer*)	-	-	-
H14060501B	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	-	-	-
H14060501R	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	-	-	-
H161203H	España	Pargo (*Pagrus auriga*)	-	-	-
9FT1M-3	EE.UU.	Tiburón (*Carcharhinus sp.*)	-	-	-
RS80L1V1	EE.UU.	Pargo rojo (*Lutjanus campechanus*)	-	-	-
ST-1	EE.UU.	Trucha	-	-	-
RS78SPL1	EE.UU.	Pargo rojo (*Lutjanus campechanus*)	-	-	-
9FT2B-2	EE.UU.	Tiburón (*Carcharhinus sp.*)	+	+	+

Aunque la mayoría de las cepas en las que se detectó la presencia de los 3 genes habían sido aisladas de rodaballo cultivado, no se pudo establecer una correlación entre la fuente de aislamiento y la presencia o ausencia de estos genes, puesto que también

se obtuvo un resultado positivo en cepas procedentes de pargo cultivado en el Mediterráneo y de tiburón de EEUU. Parece, por tanto, que el clúster de genes de síntesis y transporte de vibrioferrina está presente en cepas con diferentes orígenes geográficos y fuentes de aislamiento muy diversas.

Producción de Vibrioferrina en cepas de *P. damselae* subsp. *damselae*

Una vez localizados los genes del sistema de síntesis y transporte se procedió a la comprobación de su fenotipo, mediante la realización de bioensayos de alimentación cruzada. Mediante estos ensayos se comprobó si las 10 cepas que dieron positivo por PCR para la presencia de los genes *pvsD* (síntesis), *pvuA* (receptor) y *pvuC* (transporte) eran capaces de promover el crecimiento de la cepa AR13, una cepa de *V. alginolyticus* que tiene una mutación en uno de los genes de biosíntesis de vibrioferrina (no produce vibrioferrina pero es capaz de transportarla). Se utilizó como control negativo la cepa RM71 (negativa para los tres genes), y como control positivo la cepa RG91. Los resultados obtenidos demostraron que las 10 cepas positivas para la presencia de los tres genes eran capaces de promover el crecimiento de la cepa indicadora AR13 (Figura IV.18) mientras que todas las cepas negativas en las PCRs eran incapaces de inducir el crecimiento de la cepa AR13 en condiciones de limitación de hierro.

Por tanto, en las 10 cepas analizadas se pudo establecer una perfecta correlación entre la presencia del clúster génico de síntesis y transporte de vibrioferrina y el resultado positivo en el bioensayo (Tabla IV.7), observándose un halo de crecimiento alrededor del acúmulo celular (Figura IV.18) de cada una de las cepas positivas en las PCRs.

Tabla IV.7: Correlación entre los resultados de las PCRs para detectar la presencia o ausencia de los genes *pvsD*, *pvuA* y *pvuC* y los bioensayos de alimentación cruzada para demostrar la producción de vibrioferrina en cepas de *P. damselae* subsp. *damselae*.

Cepa	*pvsD* (síntesis)	*pvuA* (receptor)	*pvuC* (transporte)	Bioensayo
RM71	-	-	-	-
RG91	+	+	+	+
RG214	+	+	+	+
RG153	+	+	+	+
ACR208.1	+	+	+	+
VIRO-RIÑÓN	+	+	+	+
AZ247.1	+	+	+	+
AZ245.1	+	+	+	+
H22060601R	+	+	+	+
H01100403DI	+	+	+	+
H29060602R	+	+	+	+
9FT2B-2	+	+	+	+
CDC2227-81	-	-	-	-
LD07	-	-	-	-

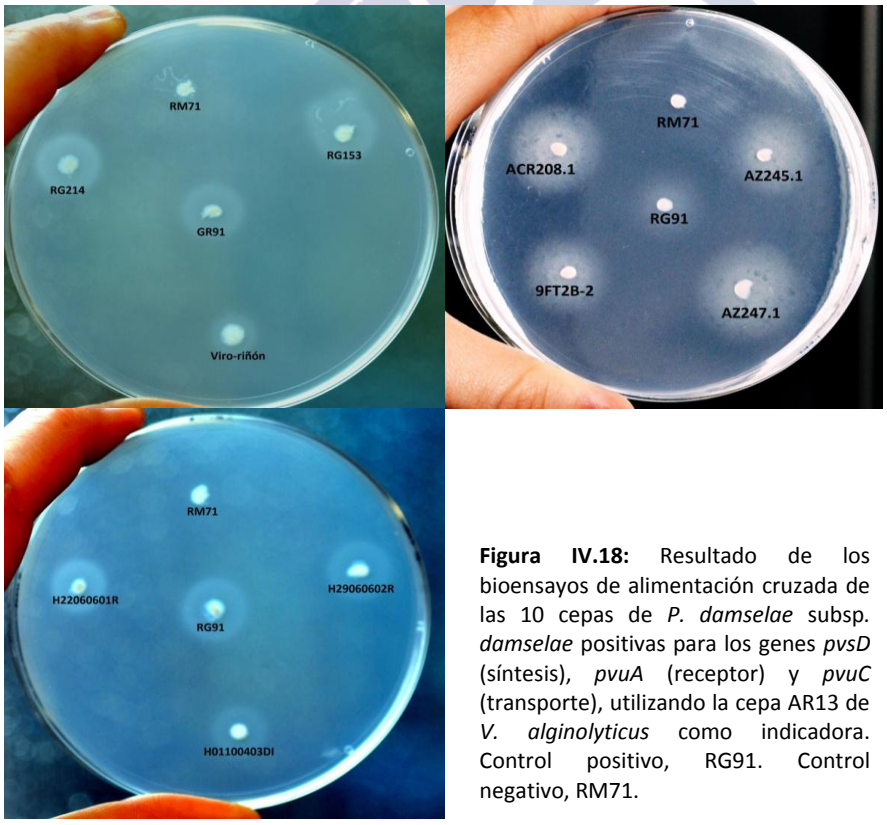

Figura IV.18: Resultado de los bioensayos de alimentación cruzada de las 10 cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* positivas para los genes *pvsD* (síntesis), *pvuA* (receptor) y *pvuC* (transporte), utilizando la cepa AR13 de *V. alginolyticus* como indicadora. Control positivo, RG91. Control negativo, RM71.

Las bacterias del género *Vibrio*, ejemplo de bacterias productoras de vibrioferrina, suelen encontrarse en altas densidades celulares y se ha demostrado que existe una tendencia evolutiva a perder los genes de síntesis y mantener los de transporte, debido a la gran concentración del sideróforo presente en estas poblaciones (Cordero et al., 2012). Esto no ocurre en nuestras cepas, ya que todas presentan una perfecta correlación entre la presencia del clúster de síntesis y el de transporte de vibrioferrina.

Producción de vibrioferrina y crecimiento en condiciones de limitación de hierro

Comparando los datos de presencia de genes de síntesis y transporte de vibrioferrina, con los datos obtenidos al principio de este estudio acerca del crecimiento en condiciones de limitación de hierro (Figura IV.1), se pudo comprobar que las tres cepas pertenecientes al grupo A, que poseían una mayor capacidad para crecer en estas condiciones, eran todas ellas positivas para estos genes y positivas también en el bioensayo.

Sin embargo, quisimos comprobar si todas las cepas positivas para los genes del sistema de utilización de vibrioferrina se comportaban realmente como cepas del tipo A. Para ello, se crecieron todas las cepas candidatas, incluyendo además la cepa RM71 (representante de las cepas del grupo B), durante 12 horas en agitación en medio CM9 con 40 µM de dipiridil. Los resultados indicaron que todas las cepas positivas para los genes de la vibrioferrina se englobaban dentro del grupo A, y presentaban patrones de crecimiento y de producción de sideróforos muy similares a la cepa RG91, y menores a la cepa RM71 (Figura IV.19), que es lo que caracteriza a las cepas de este grupo A (ver apartado 1).

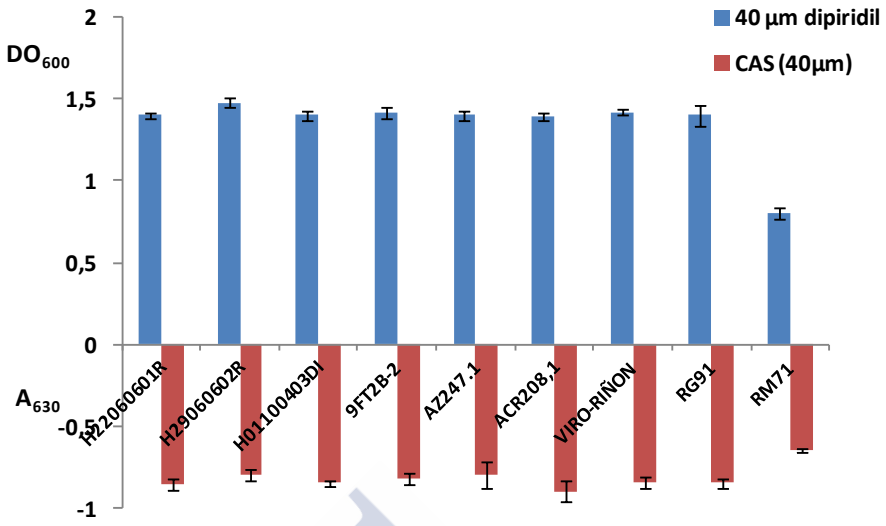

Figura IV.19: Crecimiento (DO_{600}) y producción de sideróforos (A_{630}) en las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* positivas para la PCR de los tres genes ensayados y que promovían el crecimiento de la cepa AR13, todas ellas crecidas durante 12 h en déficit de hierro (medio CM9 con 40 µM de dipiridil).

Con todos estos datos se confirma la heterogeneidad existente en las cepas de *P. damselae* subsp*. damselae*. El grupo A estaría por tanto formado por cepas productoras de vibrioferrina, con valores de CAS superiores y un mayor crecimiento en condiciones de limitación de hierro que las cepas de tipo B. Estas observaciones sugieren que la síntesis de vibrioferrina podría representar una ventaja evolutiva debido a que éste sideróforo podría tener un mayor poder de captación de hierro que el posible sideróforo sintetizado por las cepas tipo B, aunque esto no podrá comprobarse hasta que se caracterize por completo este segundo sideróforo. Asimismo, la posible relación entre síntesis de vibrioferrina y un mayor grado de virulencia para peces se analizará en el apartado 2.4.

2.2.4 El gen *pvsD* es responsable de la biosíntesis de vibrioferrina

En *V. parahaemolyticus* y en *V. alginolyticus* se ha demostrado que el gen *pvsD* era el principal responsable de la biosíntesis de vibrioferrina (Tanabe et al., 2003; Wang et al., 2007). Por ello, en este trabajo se construyó, mediante la técnica de intercambio alélico, un mutante por delección del gen *pvsD* en la cepa RG91 de *P. damselae* subsp. *damselae* para demostrar su implicación en la síntesis de vibrioferrina. Basándonos en la secuencia y en los datos de homología de las ORFs de *P. damselae* subsp. *damselae*,

podemos predecir que el gen *pvsD* codifica una enzima de la ruta de síntesis de la vibrioferrina, por lo que un mutante de este gen debería presentar una deficiencia en la producción de vibrioferrina, así como una alteración de su capacidad de crecimiento en condiciones de limitación de hierro.

En la Figura IV.20 se muestran las curvas de crecimiento obtenidas al crecer durante 24 horas la cepa salvaje RG91 Rif^r y la cepa mutante BP52 (*ΔpvsD*). No se encontraron diferencias entre los valores de crecimiento de las dos cepas en medio mínimo con hierro (CM9 con 10 µM de $Fe_2(SO_4)_3$). En cambio, la capacidad de crecimiento de la cepa mutante en comparación con la salvaje en medio CM9 con 40 µM de dipiridil mostró ser menor a lo largo de toda la curva de crecimiento, si bien todavía mantiene la capacidad de crecer en déficit de hierro. Del mismo modo los valores de CAS de los sobrenadantes de la cepa mutante obtenidos a lo largo de la curva de crecimiento fueron menores con respecto a la cepa salvaje, pero sigue detectándose producción de sideróforo en el mutante BP52 (*ΔpvsD*). Estos resultados no son los que se esperaría obtener si la vibrioferrina fuese el único sideróforo producido por la cepa RG91. En este caso, al igual que se ha demostrado en *V. parahaemolyticus y V. alginolyticus* (Tanabe et al., 2003; Wang et al., 2007), el mutante debería perder completamente la capacidad de producción de sideróforo y de crecimiento en medio mínimo con déficit de hierro. El hecho de que el mutante *ΔpvsD* de la cepa RG91 de *P. damselae* subsp. *damselae* siga manteniendo ambas capacidades, demuestra que esta cepa debe producir otro compuesto que actúa como sideróforo en ausencia de la vibrioferrina.

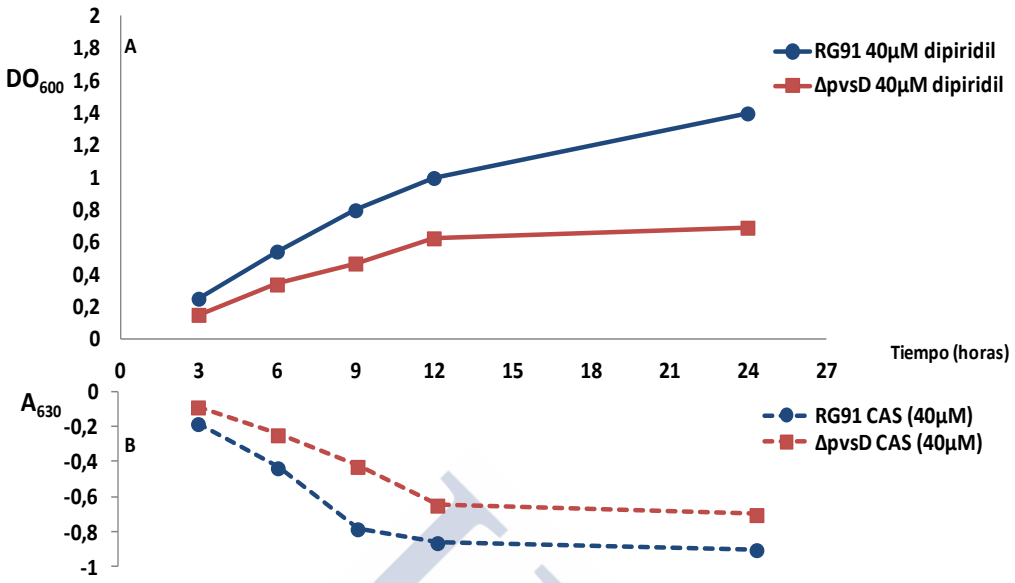

Figura IV.20: (A) Crecimiento (DO_{600}) y (B) valores de CAS CAS (A_{630}) de la cepa mutante para *pvsD*, BP52 (*ΔpvsD*) (rojo) y la cepa salvaje RG91 (azul), crecidas en déficit de hierro (CM9 con 40 µM de dipiridil) durante 24 h.

Para comprobar que el gen *pvsD* es en efecto responsable de la síntesis de vibrioferrina en la cepa RG91 y descartar la posibilidad de que otra proteína esté complementando la función de esta enzima en el mutante, se estudió el fenotipo del mutante mediante bioensayos de alimentación cruzada utilizando la cepa AR13 de *V. alginolyticus* como cepa indicadora.

Como vemos en la Figura IV.21 la cepa mutante BP52 (*ΔpvsD*) es incapaz de promover el crecimiento de la cepa AR13, por lo que se confirma la deficiencia en la producción de vibrioferrina y el papel del gen *pvsD* en la biosíntesis de este sideróforo.

Figura IV.21: Bioensayo de alimentación cruzada de la cepa mutante BP52 (*ΔpvsD*) y la cepa salvaje RG91 con la cepa indicadora AR13 de *V. alginolyticus*.

2.2.5 La vibrioferrina podría ser transportada por más de un receptor en la cepa RG91

Con el objeto de comprobar si el receptor dependiente de TonB PvuA actuaba como receptor del sideróforo vibrioferrina en la cepa RG91, se construyó un mutante por deleción del gen *pvuA* (cepa BP54 (*ΔpvuA*)) y se comparó su capacidad de crecer en condiciones de déficit de hierro (medio CM9 con 40 µM de dipiridil) con la de la cepa parental.

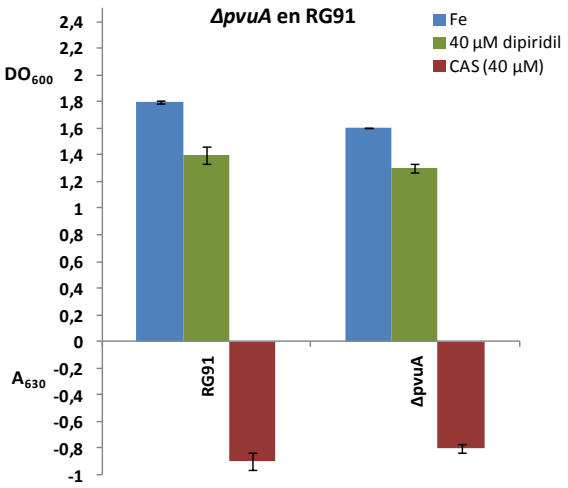

Figura IV.22: Crecimiento (DO_{600}) y valores de CAS (A_{630}) del mutante BP54 (*ΔpvuA)* y la cepa salvaje RG91 crecidas durante 12 h bajo condiciones de limitación de hierro (CM9 con 40 µM de dipiridil).

Los resultados indican que la cepa mutante BP54 (*ΔpvuA*) no presenta cambios en su capacidad de crecimiento y de producción de sideróforos con respecto a la cepa salvaje RG91 (Figura IV.22), lo cual sugiere que debe existir otro receptor distinto a PvuA que puede captar también la vibroferrina. En este mismo sentido, se ha descrito que *V. parahaemolyticus* puede captar el complejo vibrioferrina-hierro a través del receptor PvuA pero también a través del receptor PsuA (Tanabe et al., 2011), siendo necesaria la obtención de un doble mutante *psuA-pvuA* para abolir el crecimiento en limitación de hierro. La diferencia principal entre la situación descrita en *V. parahaemolyticus* y nuestros resultados en *P. damselae*, estriba en que, mientras la mutación simple de *pvuA* en *V. parahaemolyticus* sí afecta al crecimiento en condiciones de limitación de hierro, la mutación de *pvuA* en *P. damselae* no produce cambios fenotípicos observables. Esto parece sugerir, como ya hemos adelantado en párrafos anteriores, que *P. damselae* podría producir un segundo compuesto con actividad de sideróforo, lo cual explicaría por qué no hay cambio fenotípico en un mutante *pvuA*.

2.3 Los genes de la vibrioferrina forman parte de una isla genómica

Anteriormente se describió que los genes que delimitaban el cósmido BPcos194, positivo para el gen *pvsD,* se correspondían con dos ORFs que no tenían homologías en la cepa tipo ATCC33539, por lo que la cepa RG91 no sólo habría adquirido los genes del sistema de utilización de la vibrioferrina sino además otras secuencias flanqueantes, posiblemente formando parte de un elemento móvil, por transferencia horizontal en forma de plásmido o isla genómica, aunque se considera que las transformaciones con plásmidos son menos eficientes que las de ADN cromosómico (Thomas y Nielsen, 2005).

Para estudiar la posible adquisición por transferencia horizontal en forma de plásmido, se realizó una extracción plasmídica en las cepas de tipo A y se estudiaron los perfiles de digestión después de cortar los plásmidos con la enzima de restricción *Hind*III. Los resultados mostraron una heterogeneidad en los perfiles de digestión de los plásmidos obtenidos a partir de las cepas H01100403D1 (línea 2), H29060602R (línea 3), H22060601R (línea 4), AZ247.1 (línea 5), ACR208 (línea 6), RG91 (línea 7), VIRO-RIÑÓN (línea 8) y AZ245.1 (línea 9) (Figura IV.23), sin que existiese un patrón común a todas las cepas productoras de vibrioferrina. Basándonos en estos resultados se puede descartar que actualmente los genes de vibrioferrina formen parte de un plásmido, aunque podrían formar parte de otro elemento móvil.

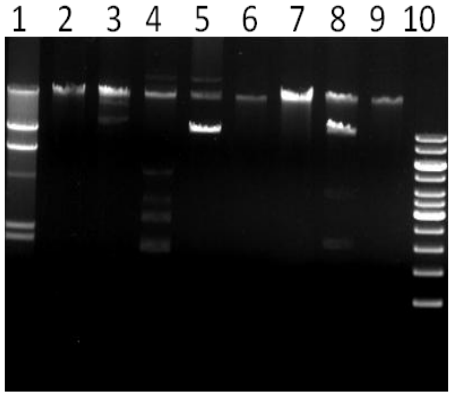

Figura IV.23: Perfiles de digestión de los plásmidos extraídos de algunas cepas tipo A (líneas 2-9) cortados con *Hind*III. Linea 1, marcador fago λ; línea 10, marcador de 1 kb.

Como ya se comentó en la introducción, las islas genómicas, y concretamente las islas de patogenicidad, se definen como ADN foráneo que se inserta en un genoma huésped. Las características comunes de una isla de patogenicidad (Figura IV.24) son: la presencia de genes de virulencia (normalmente sistemas de secreción, toxinas, lipasas, proteasas, resistencia a- y producción de- antibióticos, y sistemas de síntesis y captación de sideróforos), ausencia en cepas no patógenas, un tamaño de 10 a 200 kb, diferente contenido GC con respecto al genoma huésped, presencia de genes del ARNt

adyacentes a la isla (siendo un posible punto de inserción del genoma foráneo), asociación con elementos móviles como integrasas de bacteriófagos o transposones, y también es común la presencia de un mosaico de segmentos génicos que podrían haberse adquirido horizontalmente a partir de diferentes orígenes en distintos momentos durante la evolución (Schmidt & Hensel, 2004).

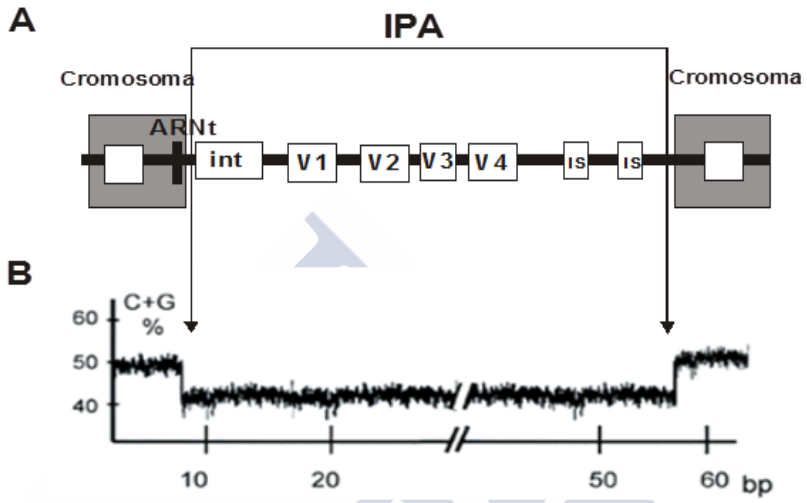

Figura IV.24: Estructura general de una IPA (Isla de Patogenicidad). A: La isla suele insertarse en el genoma de una cepa huésped (columnas en gris), en sitios específicos que son frecuentemente genes del ARNt (barra negra dentro de la columna gris); genes de movilidad como la integrasa se encuentran en el comienzo de la isla, cerca del ARNt o en el sitio de unión. La isla alberga uno o más genes de virulencia (V1 a V4) y se intercalan con otros elementos móviles tales como elementos IS (elementos de inserción comunes). B: Un rasgo característico es el contenido GC, diferente al del núcleo genómico (modificaciones de Schmidt & Hensel, 2004).

2.3.1 Inserción de la isla genómica en la cepa RG91, con respecto a la cepa tipo ATCC33539

Para facilitar la búsqueda de la zona de inserción de la isla genómica dentro de la cepa RG91 mediante genómica comparada se procedió a secuenciar el genoma de las dos cepas representativas de los grupos A y B (RM71 y RG91) mediante secuenciación masiva en un servicio de secuenciación externo (véase apartado 3.4).

Los resultados del análisis comparativo de los genomas de las cepas RG91, ATCC33539 y RM71, claramente demuestran que, en efecto, los genes del sistema de utilización de la vibrioferrina se agrupan en una estructura genética unitaria, presente en el cromosoma 2 en RG91 y ausente en ATCC33539 y RM71. En la Figura IV.25 se

puede observar de manera esquemática el lugar de inserción de la IPA en el genoma de la cepa RG91.

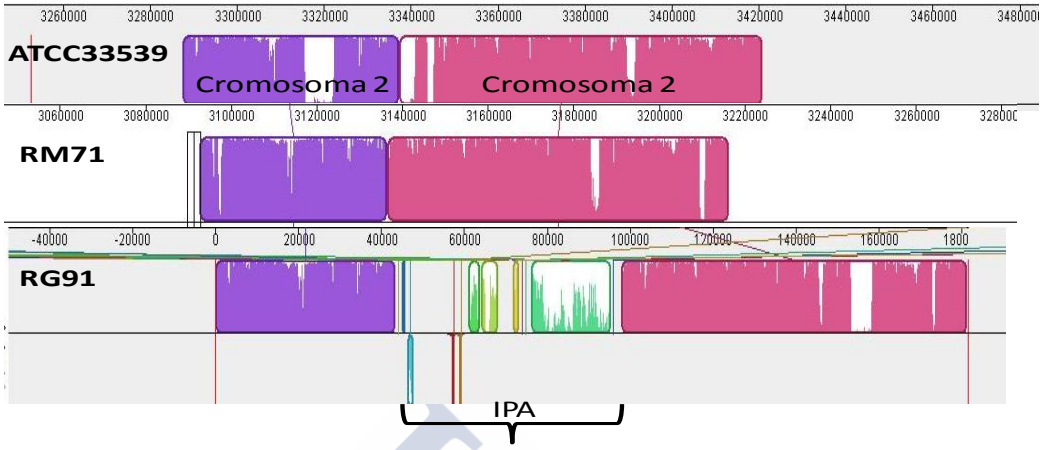

Figura IV.25. Representación de la inserción de la isla genómica que codifica la síntesis y transporte de vibrioferrina en el cromosoma 2 del genoma de la cepa RG91, en comparación con los genomas de las cepas ATCC33539 y RM71 que carecen de la isla.

Tras la secuenciación del genoma de la cepa RG91, nos encontramos que la isla de patogenicidad se encuentra localizada entre dos *scaffolds*, 16 y 21, con 7.511 y 47.325 pb, respectivamente, de ADN nuevo. La isla se localiza en el cromosoma 2 después del gen VDA_0334 (codifica la subunidad IIB del transportador PTS fructosa), donde se encuentra una zona de integración formada por un gen del ARNt (Figura IV.26). Los genes del ARNt son generalmente utilizados por las integrasas específicas de sitio (de fagos e islas genómicas) para la integración de las islas en el genoma hospedador. Los fagos normalmente emplean una zona del extremo 3´ de la secuencia del ARNt de 15 a 20 nucleótidos de longitud como cebador de iniciación de la replicación (Hou, 1999). Existen hipótesis respecto a por qué los genes del ARNt constituyen zonas de integración, como son su presencia en copias múltiples, que la estructura conservada de los genes ARNt ofrece más facilidades para la inserción de las IPAs y fagos, o que el final del extremo 3´ del ARNt presenta una zona conservada CCA que parece ser la zona de integración de la integrasa (Schmidt & Hensel, 2004). Además, se ha demostrado que las integrasas han coevolucionado con ciertos genes de ARNt, lo que indica una relación evolutiva entre integrasas y sus sitios de inserción (Boyd et al., 2009). El

contenido GC de la isla es de un 40,2%, mientras que la media del cromosoma es del 41%.

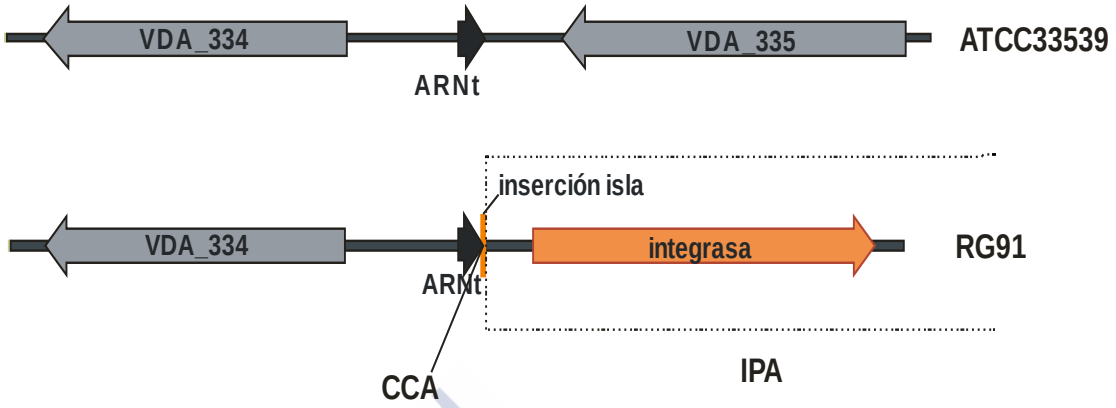

Figura IV.26: Representación del punto de inserción de la IPA en la cepa RG91, donde se encuentra el punto de inserción formado por el gen de ARNt, con su extremo final 3´ CCA conservado, y el gen de la integrasa formando parte de la isla.

Al identificar una a una las ORFs que contiene la isla veremos que está constituida por un mosaico de segmentos de adquisición horizontal. Algunos son genes de distintos orígenes mientras otros son grupos de genes procedentes de un mismo origen, presentando además un alto número de elementos móviles como secuencias de inserción (IS) y transposasas (Figura IV.27).

El análisis de genómica comparada reveló también que la cepa RG91 pierde dos genes, el VDA_0335 y VDA_0336, al integrarse la isla en su genoma. Ocurre con frecuencia en estos eventos de recombinación que parte de ADN no-esencial del huésped pueda eliminarse en el proceso de integración (Thomas & Nielsen, 2005).

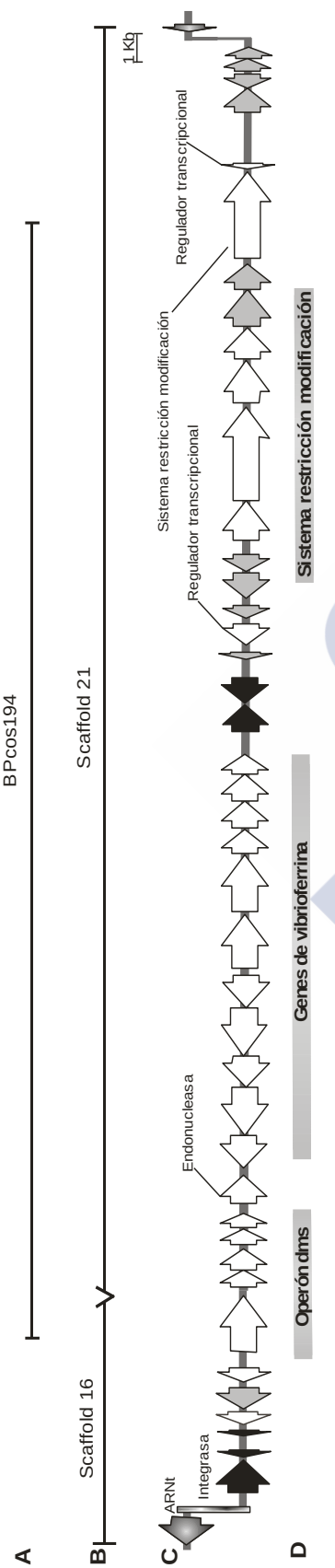

Figura IV.27: Representación de los genes de la isla de patogenicidad en la cepa RG91. A: Zona que abarca el cósmido BPcos194 positivo para *pvsD*. B: *Scaffolds* en los que se encontraba repartida la secuencia de la isla después de secuenciar el genoma completo de RG91. C: genes que forman parte de la isla, junto con el punto de inserción en el genoma de la cepa ATCC33539, el gen que codifica un ARNt. D: cluster de genes que se han tansferido completos.

Existen varios casos de genes que codifican sistemas de captación de hierro mediante sideróforos que se han adquirido a través de tansferencia horizontal formando una isla de patogenicidad. *Escherichia fergusonii* contiene genes que muestran homología con *iucABCD* y *iutA,* pertenecientes al sistema de síntesis y transporte de aerobactina, y que forman parte de un segmento de ADN similar a una isla de patogenicidad (Smajs et al., 2003). *Pseudomonas aeruginosa* contiene una isla con los genes relacionados con la biosíntesis del sideróforo pioquelina/enantio-pioquelina (Maspoli et al., 2014).

Entre las bacterias que conviven en un mismo nicho parece ser frecuente el intercambio de genes de síntesis de sideróforos, como ocurre en *Yersinia* spp. que presentan una isla de patogenicidad que contiene un operón de genes implicados en la biosíntesis, transporte y regulación del sideróforo yersiniabactina (Carniel, 2001). Esta isla de patogenicidad de *Yersinia* se encuentra distribuída en otras Enterobacterias como *E. coli, Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. (Bach et al., 2000), *Salmonella enterica* (Oelschlaeger et al., 2003; Petermann et al., 2008), *Enterobacter* spp. (Schubert et al., 2000), o *Proteus mirabilis* (Himpsl et al., 2010), e incluso en otras bacterias como *Corynebacterium diphtheriae* (Kunkle & Schmitt, 2003), llegando a evolucionar y dispersarse en tres grupos diferentes de genes de yersiniabactina (Bultreys et al., 2006). También en *P. damselae* subsp. *piscicida* se encuentran 11 genes, formando parte del plásmido pPHDP70, que tienen una alta homología con los genes de síntesis y transporte de yersiniabactina (Osorio et al., 2006; Osorio et al., 2015), y que codifican el sideróforo piscibactina, muy similar en cuanto a estructura química a la yersiniabactina (Souto et al, 2012). Todo ello sugiere que el sistema de la piscibactina podría tener un origen evolutivo común con *Yersinia* y podría haber sido adquirido también por transferencia horizontal.

Muchas veces ocurre que el sistema de sideróforo adquirido vía transferencia horizontal es el que aporta a la bacteria hospedadora el carácter patógeno, como en *Proteus mirabilis* que presenta dos grupos de genes que codifican dos sistemas de sideróforos, uno la proteobactina codificada en el genoma, y otro codificado en una isla genómica con homología con la isla que codifica la yersiniabactina de *Yersinia pestis*. A

pesar de la actividad de ambos sideróforos, sólo los mutantes que carecen de yersiniabactina ven reducida su capacidad para crecer en un medio con déficit de hierro (Himpsl et al., 2010). *Bordetella holmessii* adquirió una isla que contiene los genes de síntesis, exportación y transporte del sideróforo alcaligina, lo cual se cree que ha contribuído a su emergencia como patógeno humano (Diavatopoulos et al., 2006).

2.3.2 Predicción de ORFs y estudios de homología

A continuación se describirá la identificación y homologías de las ORFs de los genes que componen la isla de patogenicidad (Figura IV.27, Tabla IV.8).

Entre los genes relacionados con elementos genéticos móviles encontramos justo después del gen del ARNt el CDS_1 que codifica una integrasa de origen fágico, muy común en plásmidos integrativos, islas de patogenicidad y otros elementos móviles. Los CDS_2 y CDS_3 que codifican dos elementos móviles IS911 y IS3, secuencias de inserción (SI) que pertenecen a la familia de las IS3, caracterizadas por ser un gen único que no arrastra más genes con él, y que suelen ser de tamaños del orden de 1.000 pb; y los CDS_24 y CDS_25 que codifican dos transposasas.

Encontramos también genes que codifican proteínas implicadas en la defensa oxidativa como el CDS_4 que codifica una reductasa específica de sulfóxido-R-metionina libre no unida a péptidos o proteínas. Esta enzima reduce la sulfóxido-R-metionina libre (molécula altamente oxidativa) a metionina, evitando daños celulares (Le et al., 2009). Presenta un dominio *GAF* (Pfam: PF01590), fosfodiesterasa específica de GMPc.

También se han localizado genes que codifican proteínas metabólicas como el *pcaC* (CDS_6) que codifica una carboxi-mucono-lactona descarboxilasa, con un dominio *CMD* (Pfam: PFO2627) importante para la degradación de compuestos aromáticos.

Tabla IV.8: Relación de proteínas homólogas a las codificadas en la isla de patogenicidad de la cepa RG91. Los cuadros azules representan zonas transferidas en grupo.

CDS	Proteína	Homología	Nº Acceso	Identidad	Similitud
CDS_1	Integrasa de origen fágico	*V. anguillarum*	YP_004566868.1	69%	81%
CDS_2	Transposasa IS911	*Shigella flexneri*	WP_005117206.1	62%	73%
CDS_3	Transposasa IS3	*V. cholerae*	WP_001983216.1	88%	90%
CDS_4	Reductasa específica de sulfóxido-R-metionina libre	*Enterovibrio calviensis*	WP_017007602.1	70%	97%
CDS_5	Proteína hipotética	*Pseudoalteromonas agarivorans*	WP_004587072.1	47%	67%
CDS_6	Carboximuconolactona descarboxilasa	*V. harveyi*	WP_017818085.1	63%	79%
CDS_7	Dimetil sulfóxido reductasa sub. A	*V. parahaemolyticus*	WP_029832126.1	97%	98%
CDS_8	Dimetil sulfóxido reductasa sub. B	*V. parahaemolyticus*	WP_029832127.1	99%	100%
CDS_9	Dimetil sulfóxido reductasa sub. C	*V. parahaemolyticus*	WP_029832128.1	97%	98%
CDS_10	Nitrato reductasa sub. delta	*V. parahaemolyticus*	WP_029832129.1	97%	98%
CDS_11	Ferredoxina	*V. parahaemolyticus*	WP_029832130.1	93%	96%
CDS_12	DDE endonucleasa	*V. cholerae*	WP_001927356.1	91%	92%
CDS_13	PvsE	*V. harveyi*	WP_005449429.1	80%	90%
CDS_14	PvsD	*V. harveyi*	WP_005449427.1	96%	99%
CDS_15	PvsC	*V. harveyi*	WP_005449425.1	98%	99%
CDS_16	PvsB	*V. harveyi*	WP_005449423,1	96%	97%
CDS_17	PvsA	*V. harveyi*	WP_005449418.1	93%	98%
CDS_18	PsuA	*V. harveyi*	WP_005449417.1	83%	90%
CDS_19	PvuA	*V. harveyi*	WP_005449416.1	93%	96%
CDS_20	PvuB	*V. harveyi*	WP_005449415.1	96%	97%
CDS_21	PvuC	*V. harveyi*	WP_005449414.1	95%	96%
CDS_22	PvuD	*V. harveyi*	WP_005449413.1	97%	98%
CDS_23	PvuE	*V. harveyi*	WP_017819178.1	94%	97%
CDS_24	Transposasa	*V. halioticoli*	WP_023405716.1	78%	91%
CDS_25	Transposasa	*V. parahaemolyticus*	EXJ39495.1	92%	94%
CDS_26	Proteína hipotética	*V. parahaemolyticus*	WP_017449398.1	79%	96%
CDS_27	Regulador transcripcional	*V. parahaemolyticus*	WP_017449397.1	73%	83%
CDS_28	Proteína hipotética	*V. parahaemolyticus*	WP_017449395.1	94%	80%
CDS_29	Proteína hipotética	*V. tasmaniensis*	WP_017104920.1	77%	89%
CDS_30	Proteína hipotética	*V. tasmaniensis*	WP_017104919.1	69%	79%
CDS_31	Histidina quinasa	*P. angustum*	WP_005367335.1	99%	99%
CDS_32	Sistema de restricción modificación tipo I sub. R	*P. angustum*	WP_005367338.1	98%	99%
CDS_33	Sistema de restricción modificación tipo I sub. M	*P. angustum*	WP_005367340.1	97%	98%
CDS_34	Sistema de restricción modificación tipo I sub. S	*P. angustum*	WP_005367341.1	80%	87%
CDS_35	Proteína hipotética	*V. anguillarum*	WP_019281654.1	90%	95%
CDS_36	Proteína hipotética	*V. anguillarum*	WP_019281653.1	46%	65%
CDS_37	Sistema de restricción modificación tipo III sub. R	*V. parahaemolyticus*	WP_029832515.1	93%	96%
CDS_38	Regulador transcripcional	*P. phosphoreum*	CDN99629.1	67%	82%
CDS_39	Proteína hipotética	*P. phosphoreum*	CDN99630.1	45%	67%
CDS_40	Proteína hipotética	*P. phosphoreum*	CDN99631.1	30%	50%
CDS_41	Proteína hipotética	*P. phosphoreum*	CDN99632.1	53%	70%
CDS_42	Proteína hipotética	*P. phosphoreum*	CDN99628.1	52%	67%

Existe además un grupo de ORFs que codificarían proteínas que participan en la respiración anaerobia como el operón *dmsABC* (CDS_7-9), que codifica las tres subunidades del sistema dimetil sulfóxido reductasa (DMSOR) que cataliza la reducción del dimetilsulfóxido (DMSO) a sulfuro de dimetilo (DMS); una nitrato reductasa (CDS_10) que actúa en la desnitrificación, catalizando la reducción del nitrato a nitrito y la ferredoxina (CDS_11) que cataliza la descarboxilación del piruvato formando acetil-CoA.

La mayoría de los genes que se adquieren por transferencia horizontal confieren una ventaja selectiva a las bacterias destinatarias, pero existe material genético que únicamente promueve la propagación de sí mismo, como es el caso de los elementos de inserción, profagos y sistemas de restricción-modificación (Schmidt & Hensel, 2004). La presencia de un sistema de restricción-modificación puede ayudar a que el ADN exógeno no sea degradado por la bacteria huésped o para evitar la pérdida completa de una isla una vez integrada en el genoma, utilizando un sistema similar al de toxina-antitoxina. En cada ronda de duplicación el ADN es metilado para evitar ser degradado. En la isla genómica que contiene el sistema de la vibrioferrina encontramos genes que codifican para estos sistemas de restricción-modificación como son el CDS_12, que codifica una endonucleasa o los CDS_31-34 que codifican un sistema de restricción-modificación de tipo I formado por una única proteína compuesta por tres subunidades responsables de la unión, metilación y restricción del ADN (Bullas y cols., 1980). El único antecedente que existe en la literatura en el que se vincula un sistema de restricción y modificación de tipo I con la virulencia es un estudio en *Yersinia pseudotuberculosis,* donde un mutante de este sistema tiene deficiencias en el crecimiento en un medio de cultivo que imita las condiciones que encuentra la bacteria en el hospedador (Pouillot y cols., 2007). Por último, el CDS_37 codifica la subunidad R (restrictasa) de un sistema de restricción-modificación de tipo III.

Los CDS_13-17 y 18-23 se corresponden con los operones de síntesis *pvsABCDE* y transporte *psuA-pvuABCDE* de vibrioferrina ya descritos en el apartado 2.2.2.

Los reguladores transcripcionales son a menudo parte de complejas redes que incluyen reguladores codificados por la propia IPA, reguladores codificados por otras

IPA, y reguladores globales codificados en otras regiones del cromosoma o en plásmidos. Los reguladores de la IPA, a su vez, también pueden estar involucrados en la regulación de genes que se encuentran fuera de la IPA (Schmidt & Hensel, 2004). En la isla que contiene el sistema de vibrioferrina hemos localizado dos tipos de reguladores transcripcionales (CDS_27-38). El CDS_38 codificaría una proteína reguladora con dominio *Phage_AlpA* (Pfam: PF05930) que regula la expresión del gen *alpA* que codifica una adhesina (Odenbreit et al., 1999).

Los CDS_4, 5, 26, 28, 29, 30, 35, 36, 39, 40 y 42 corresponden a proteínas hipotéticas que no presentan dominios con funciones conocidas.

2.3.3 Distribución de la isla de patogenicidad en las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae*

Basándonos en los resultados obtenidos hasta ahora, se procedió a comprobar la distribución de los genes que forman parte de la isla en la colección de cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* positivas para los genes de síntesis y transporte de vibrioferrina. Para ello se diseñaron cebadores a partir de la secuencia de dos genes: CDS_7, aguas abajo de *pvsE,* el gen de mayor tamaño que forma parte del operón *dms*, y CDS_32, aguas abajo de *pvuE*, el gen de mayor tamaño que forma parte del sistema de restricción-modificación de tipo I. Las dos parejas de cebadores amplifican sendos fragmentos de unas 1.200 pb (Figura IV.28). Se eligieron estos genes por formar operones bien conservados lo que facilitaría la amplificación.

Tal y como se explicó anteriormente, la cepa RG91 habría perdido dos genes presentes en la secuencia de la cepa tipo ATCC33935, correspondientes a los genes VDA_0335 y VDA_0336. Por tanto, procedimos a comprobar si el resto de las cepas de tipo A también habían perdido los mismos genes al insertarse la isla de patogenicidad (Figura IV.28).

Como puede verse en la Figura IV.28 la distribución de los genes de la isla no es homogénea entre las cepas analizadas. Todas las cepas de tipo A procedentes de epizootias de rodaballo en piscifactorías gallegas fueron positivas para los dos genes (color verde en Figura IV.28) y sólo una cepa procedente del Mediterráneo dio también

positivo para los dos genes (color verde en Tabla IV.9). El resto de las cepas únicamente dieron resultado positivo para el gen CDS_7, tratándose de cepas que al parecer sólo contienen la mitad de la isla (color violeta), no encontrándose ninguna correlación entre la presencia del gen CDS_7 o ausencia del gen CDS_32 y el hospedador o la procedencia geográfica del aislado. Esto podría explicarse por la posibilidad de que los genes de la isla se hayan transferido en bloque en distintos momentos de la evolución de la bacteria, de modo que habría unas cepas que en un determinado momento adquirieron el sistema de restricción-modificación, mientras que otras no.

Otro dato interesante es que no solamente todas las cepas de tipo A carecen de los genes VDA_0335 y VDA_0336, sino que también las cepas de tipo B pierden estos dos genes aunque no presenten ninguno de los genes de la isla de patogenicidad (color blanco). Por tanto, la cepa tipo ATCC33539 es la única que posee esos dos genes que curiosamente flanquean el punto de inserción de la isla.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

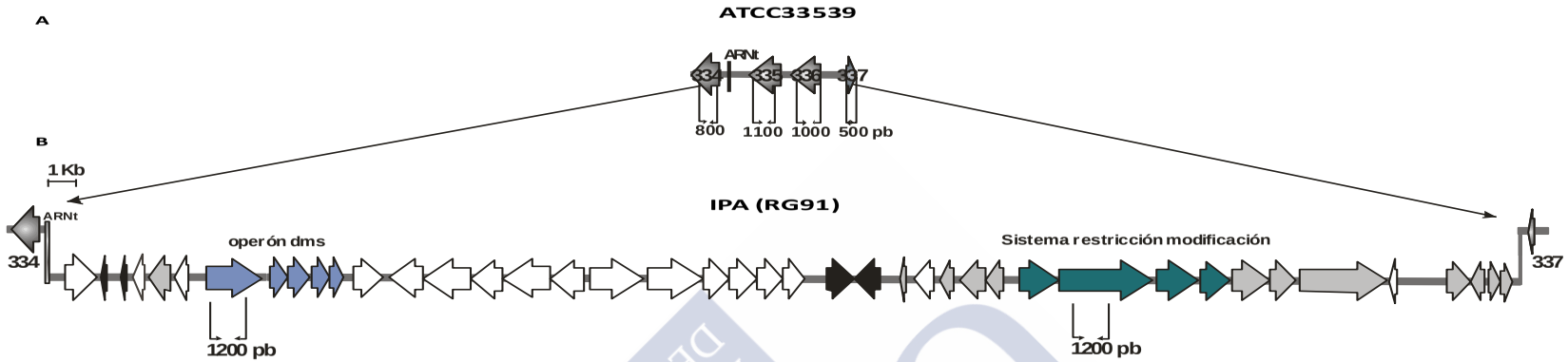

Figura IV.28: A: Genes de la zona de inserción presentes en la cepa ATCC33539. B Distribución de los genes de la isla de patogenicidad. Diseño de los cebadores para amplificar los genes CDS_7 y CDS_32.

Tabla IV.9 Distribución de los genes VDA_0334, VDA_0335, VDA_ 0335 y VDA_ 336 de la cepa ATCC33539 y los genes CDS_7 CDS_32 de la isla en *P. damselae* subsp. *damselae*.

Cepa	Origen (hospedador)	Genes Vibrioferrina	VDA_0334 (inicio IPA)	CDS_7 (IPA RG91)	CDS_32 (IPA RG91)	VDA_0337 (final IPA)	VDA_0335 (ATCC33539)	VDA_0336 (ATCC33539)
ATCC33539	EE.UU. (Pez ángel)		+			+	+	+
RG91	España (Rodaballo)	+	+	+	+	+		
RM71	España (Rodaballo)		+			+		
LD07	España (Dorada)		+			+		
CDC227-81	EE.UU. (Hombre)		+			+		
AZ247.1	España (Rodaballo)	+	+	+	+	+		
AZ245.1	España (Rodaballo)	+	+	+	+	+		
ACR208.1	España (Rodaballo)	+	+	+	+	+		
H22060601R	España (Pargo)	+	+	+	+	+		
H01100403D1	España (Pargo)	+	+	+		+		
H29060602R	España (Pargo)	+	+	+		+		
9FT2B-2	EE.UU. (Tiburón)	+	+	+		+		
VIRO-RIÑÓN	España (Rodaballo)	+	+	+	+	+		
RG241	España (Rodaballo)	+	+	+	+	+		
RG153	España (Rodaballo)	+	+	+	+	+		

2.4 Virulencia de las cepas de tipo A

Los sideróforos son considerados factores de virulencia, de tal forma que la pérdida de la capacidad de producir sideróforos en muchas bacterias reduce drásticamente o incluso anula la capacidad de la bacteria de infectar al hospedador.

Con objeto de comprobar si la posesión del sistema de la vibrioferrina le confiere a las cepas de tipo A un mayor grado de virulencia, se procedió a realizar ensayos de virulencia *in vivo*. Dado que la cepa RG91 fue aislada de rodaballo se utilizó esta especie como modelo para estudiar el efecto que producía en la virulencia la deleción del gen *pvsD*. Se inocularon 20 peces para cada cepa (RG91 y mutante BP52 *ΔpvsD*) y se siguió la evolución de la mortalidad durante 10 días. Con los datos obtenidos se estudió la función de supervivencia mediante el método Kaplan Meier, utilizando el test de Mantel-Cox para ver la existencia de diferencias significativas entre las cepas.

Los resultados se muestran en la Figura IV.29. Se puede observar que aunque los peces inoculados con la cepa salvaje comienzan a morir antes, no hay diferencias significativas entre las dos cepas al final del experimento. Aún a pesar de que la cepa salvaje crece mejor en condiciones de limitación de hierro que la mutante BP52, esto no parece representar una ventaja en el proceso infeccioso.

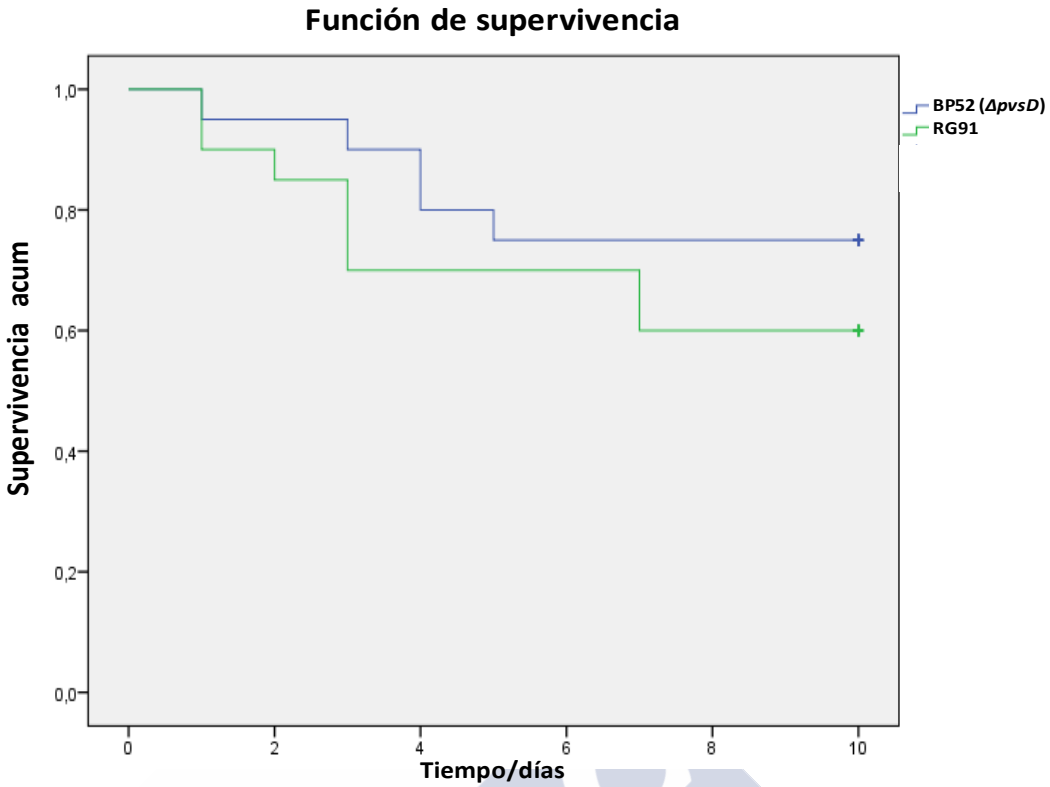

Figura IV.29: Curvas de supervivencia de los peces inoculados con la cepa salvaje (RG91) y la cepa mutante (BP52: *ΔpvsD*).

3 Análisis de la base genética de la producción de sideróforos en la cepa tipo B (RM71) de *P. damselae* subsp. *damselae*

3.1 Evidencias de un sideróforo común en la subespecie *damselae*

Por los resultados descritos hasta ahora sabemos que las cepas de tipo A producen el sideróforo vibrioferrina y que el gen *pvsD* es responsable de su síntesis, si bien, como hemos mencionado, el mutante del gen *pvsD* mantiene la capacidad de crecer en condiciones limitantes de hierro y mantiene la actividad sideróforo en el ensayo CAS, aunque con valores inferiores a la cepa salvaje. Parece existir por tanto un sideróforo basal, distinto de la vibrioferrina, que le confiere a la cepa mutante estas capacidades.

Como se observa en la Figura IV.30 los valores de densidad celular y de CAS del mutante *ΔpvsD* crecido en déficit de hierro resultaron ser equivalentes a los de la cepa tipo B, RM71, no productora de vibrioferrina, y menores que los de las cepas salvajes de tipo A RG91 y ACR208.1. Dicho de otra forma, la mutación de *pvsD* en RG91 parece convertir a esta cepa, en una cepa de tipo B, a efectos de producción de sideróforos. Esto nos hace pensar que es posible que las cepas de tipo A produzcan dos sideróforos, uno que corresponde a la vibrioferrina (cuyos genes habrían sido adquiridos vía transferencia horizontal), y otro que podría ser el sideróforo basal común a todas las cepas (excepto en la cepa tipo ATCC33539, que presenta valores de CAS muy bajos). Además esta hipótesis nos podría ayudar a entender por qué mutando uno de los receptores de transporte de la vibrioferrina (*pvuA*) en la cepa RG91, ésta es capaz de crecer igual en déficit de hierro y la producción de sideróforo es la misma que en la cepa salvaje. En las cepas tipo A, además de los receptores PvuA y PsuA, podría haber un tercer receptor que capte el sideróforo común.

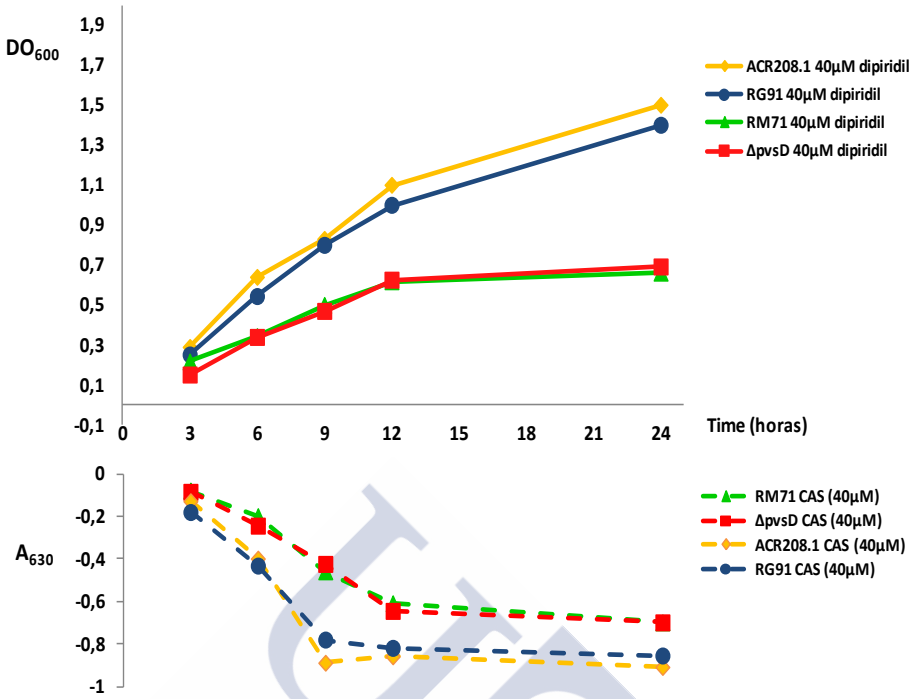

Figura IV.30: Crecimiento (DO_{600}) y valores de CAS (A_{630}) de cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* productoras y no productoras de vibrioferrina crecidas en déficit de hierro (CM9 con 40 µM de dipiridil), durante 24 h.

Fouz et al. (1997) ya describieron la posible existencia de un sideróforo común a todas las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* que podría ser un hidroxamato, dado que todas las cepas fueron capaces de promover el crecimiento de una cepa de *Arthrobacter flavescens* indicadora de la utilización de hidroxamatos.

La pregunta que se infiere de estos resultados es porqué una cepa mantiene dos tipos de sistemas de adquisición de hierro aparentemente eficaces, cuando además la tendencia evolutiva, en bacterias que viven en altas densidades celulares, es ir perdiendo genes de síntesis y crear nichos especializados (Cordero et al., 2012). Esta aparente contradicción se podría explicar desde el punto de vista de la adaptación a distintos entornos. Podría ocurrir que las células de tipo A mantuvieran los dos sistemas, aparecentemente redundantes, porque la expresión de cada uno de ellos estaría limitada a ambientes particulares. Esto ocurre en *Pseudomonas aeruginosa,* que puede producir dos sideróforos, pioverdina (altamente eficaz pero metabólicamente costoso) y pioquelina (menos eficiente pero metabólicamente menos costoso). Se ha encontrado

que cuando el hierro es limitado, *P. aeruginosa* se centra en la producción del sideróforo más costoso, pioverdina, pero altamente eficaz, mientras que puede cambiar a la expresión del sideróforo menos costoso, pioquelina, cuando el hierro es relativamente más accesible. Además, en condiciones moderadas de limitación de hierro las cepas que producen exclusivamente pioquelina crecen significativamente mejor que las que producen exclusivamente pioverdina (Dumas et al., 2013). Hay otros casos en que uno de los sideróforos producidos no actúa realmente como factor de virulencia en determinados hospedadores porque no son muy efectivos en el transporte del hierro. Por ejemplo, los mamíferos sintetizan siderocalina, una proteína que se une eficazmente a los ferri-sideróforos de tipo catecol, impidiendo que puedan ser utilizados por las bacterias patógenas. Algunas bacterias como *E. coli o Bacillus anthracis* superan esta limitación mediante la producción de dos sideróforos distintos, uno de los cuales, denominado sideróforo sigiloso, no es detectado por la siderocalina y que en consecuencia puede ser utilizado para la obtención de hierro a partir del hospedador, convirtiéndose por tanto en un importante factor de virulencia (Oves-Costales et al., 2006).

3.2 Búsqueda de genes candidatos relacionados con síntesis y transporte de sideróforos en RM71

Con el objetivo de desentrañar la base genética de la síntesis y transporte del sideróforo en las cepas de tipo B se siguieron diferentes estrategias. En primer lugar se realizó una búsqueda *in silico* de genes candidatos en el genoma de la cepa RM71 (descrito en el apartado 3.4 de esta tesis). Además, dado que podría tratarse de genes comunes a los dos tipos de cepas (A y B), se analizó nuevamente en detalle la lista de proteínas hierro-reprimidas que se identificaron mediante proteómica al inicio de este estudio (Tabla IV.1).

Mediante el análisis *in silico* del genoma de la cepa RM71 se trató de localizar genes relacionados con la familia de las péptido-sintetasas no ribosómicas (NRPS), así como enzimas de pasos previos que sintetizan los componentes que van a ser ensamblados por las NRPS, como el 2,3-DHBA y el salicilato, o su precursor el corismato. También se buscaron genes de sistemas independientes de NRPS relacionados con

síntesis de hidroxamatos, el tipo de compuestos químicos al que podría pertenecer el sideróforo común en *P. damselae* subsp*. damselae* según Fouz et al. (1997).

En cuanto a los transportadores se buscaron por un lado posibles receptores dependientes de TonB, que son los receptores específicos para la internalización de los sideróforos una vez que se han unido al hierro (Noinaj et al., 2010). Por otro lado, se analizaron también los genes de los múltiples sistemas TonB, descritos por Kuehl y Crosa (2010) como responsables de proporcionar energía para el transporte de sideróforos y grupo hemo en distintas especies de *Vibrio*. En *V. alginolyticus* tanto TonB1 como TonB2 son redundantes en su capacidad de captar hemo y ferricromo (Kuehl & Crosa, 2010). En *V. anguillarum* los sideróforos producidos por esta especie tienen especificidad por el sistema TonB2 (Stork et al., 2004). En otras especies de *Vibrio* estudiadas, parece que tanto TonB1 como TonB2 participan en el transporte de su sideróforo (Kuehl y Crosa 2010). Finalmente, se buscaron genes de transportadores ABC, responsables del paso del complejo hierro-sideróforo al citoplasma bacteriano (Figura IV.31).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

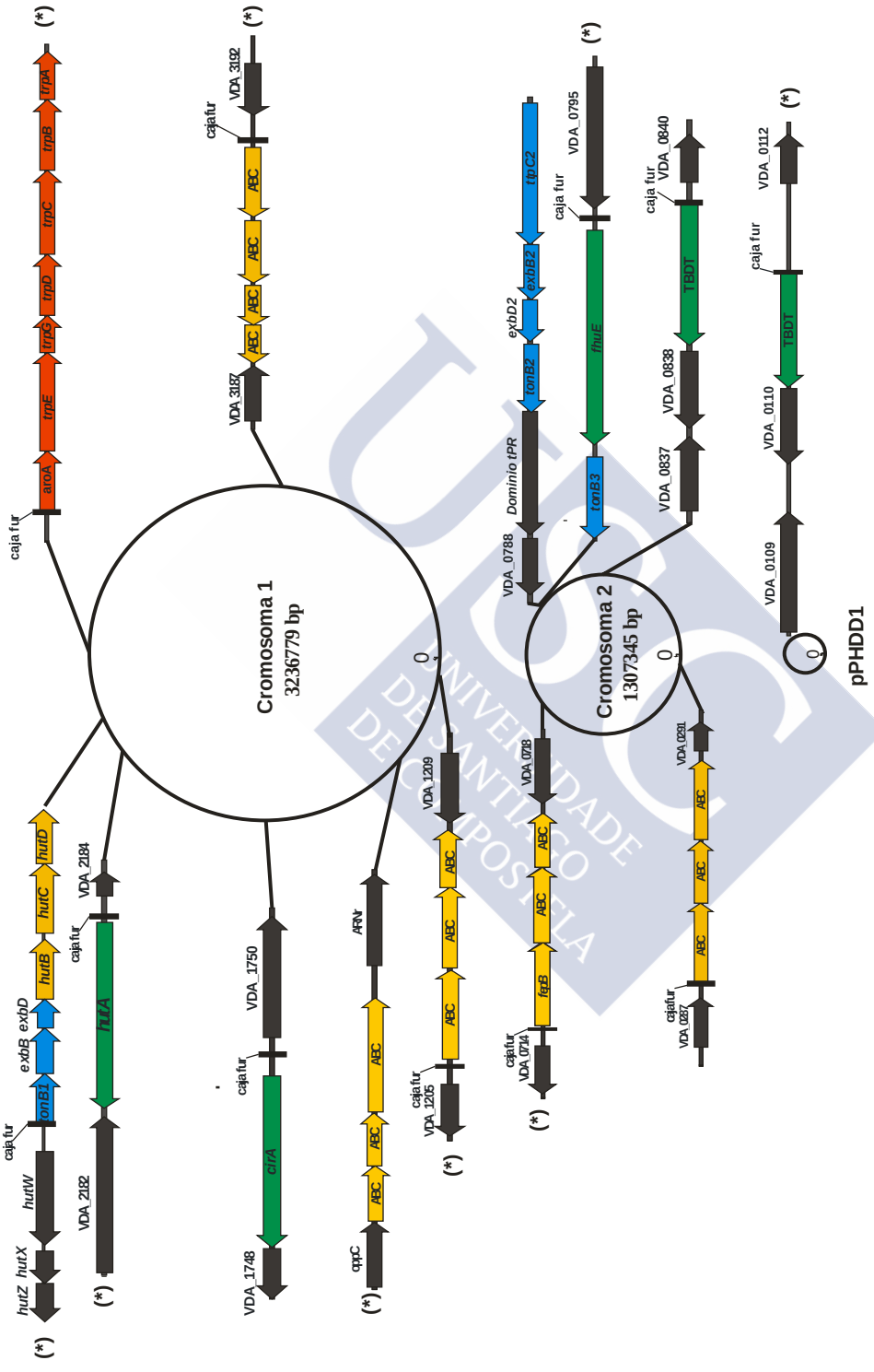

Figura IV.31: Mapa genético de los posibles sistemas de adquisición de hierro mediante sideróforos en la cepa RM71. Se muestra la localización aproximada de los genes en los cromosomas, representados por círculos. En color rojo, posibles genes de biosíntesis; en color azul, genes de sistemas TonB; en color verde, TBDT (transportadores TonB-dependientes); en color amarillo, genes de transportadores ABC. (*) Genes que se encontraban dentro de la lista de las proteínas hierro reprimidas identificadas mediante proteómica al inicio de este estudio. Los números de los genes en negro se refieren a la anotación de la cepa tipo ATCC33539 (GenBank accession no. ADBS00000000).

3.2.1 Análisis funcional de genes posiblemente relacionados con la biosíntesis de sideróforos

En primer lugar, se trató de localizar algún gen típicamente relacionado con la síntesis de sideróforos. Los resultados fueron negativos, no encontrándose ningún gen de los complejos enzimáticos que pudiera formar parte de la familia de las péptido-sintetasas no ribosómicas (NRPS), ni tampoco ningún gen candidato de sistemas de síntesis independientes de NRPS.

El único grupo de genes que podría tener alguna relación con la síntesis de sideróforos era un operón de 6 genes *trpEGDCBA* ligado al gen *aroA* en el cromosoma 1 de la cepa RM71 (Figura IV.31, genes en color amarillo) (Crawford, 1989). Ya se comentó anteriormente la relación de estos genes que codifican la síntesis de triptófano con la biosíntesis de sideróforos de tipo fenolato. El gen *aroA* contiene una posible caja-fur en la región promotora y 5 de las 6 proteínas codificadas por el operón *trpEGDCBA* se encuentran dentro de la lista de las proteínas hierro-reprimidas identificadas en el apartado 2.1.1 de este trabajo. Se trató por tanto de estudiar mediante mutagénesis la posible relación de estos genes con la síntesis de sideróforos en la cepa RM71.

Crecimiento en déficit de hierro de mutantes para el cluster *aroA-trpEGDCBA*

Se construyó un mutante por intercambio alélico, cuya deleción abarcaba todos los genes que se habían identificado en el estudio de proteómica, es decir *aroA* y los genes *trpEGDCB.* El mutante obtenido BP62 (*ΔaroA-trpEGDCB*) se cultivó en medio CM9 con déficit de hierro y después de 12 horas se midieron los valores de crecimiento (DO_{600}) y del ensayo CAS (A_{630}).

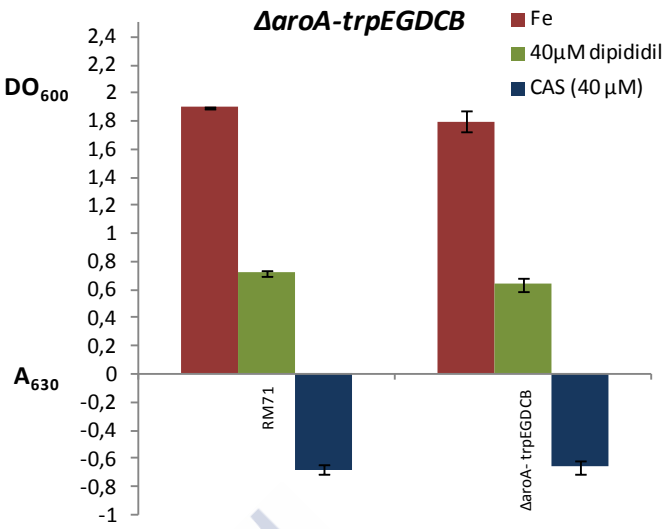

Figura IV.32. Pruebas de crecimiento (DO_{600}) y valores de CAS (A_{630}) de la cepa mutante BP62 (*ΔaroA-trpEGDCB*) bajo condiciones de déficit de hierro (CM9 con 40µM de dipiridil), después de 12 h de incubación.

Como podemos ver en la Figura IV.32, no se detectó ningún cambio fenotípico significativo en el mutante de los genes *aroA-trpEGDCB* con respecto a la cepa parental, ni en el crecimiento ni en la producción de sideróforos, por lo que parece descartarse que estos genes estén relacionados con la biosíntesis del sideróforo producido por la cepa RM71.

3.2.2 Análisis funcional de genes relacionados con el transporte

De acuerdo con el esquema genético que se muestra en la Figura IV.31 (genes verdes) existen varios genes candidatos como posibles transportadores de sideróforos:

VDA_0111: Gen que codifica un receptor dependiente de TonB, que además es una de las proteínas previamente identificadas dentro del grupo de las hierro-reprimidas. Se descartó como posible candidato como transportador de sideróforos porque se encuentra localizado en el plásmido pPHDD1, el cual no está presente en todas las cepas de la subespecie *damselae*. De hecho se encuentra distribuido en algunas cepas de tipo A (RG91, RG214), de tipo B (RM71, CDC2227-81, AZ 245.1) y de tipo C (ATCC33539), pero no se localiza en varias de las cepas de tipo A (H22060601R,

ACR208.1) o de tipo B (LD-07, ATCC 35083) (Rivas et al., 2011; Rivas et al., 2013; Rivas et al., 2014).

cirA: Gen que codifica un receptor dependiente de TonB localizado en el cromosoma 1, no es una proteína hierro-reprimida. Al estudiar la distribución de este gen en 12 cepas de la subespecie *damselae* mediante amplificación por PCR del gen completo (Figura IV.33), se comprobó que en algunas de las cepas este gen había perdido unas 850 pb, constituyendo un pseudogen, o incluso estaba completamente ausente como en el caso de la cepa LD07, por lo que también se descartó como posible receptor del segundo sideróforo.

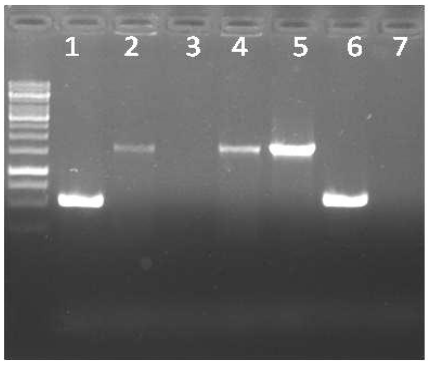

Figura IV.33: Amplificación por PCR del gen *cirA* en un grupo de cepas de PDD. Linea 1: RG91, 2: RM71, 3: LD07, 4: 9FT2B2, 5: ACR208.1, 6: VIRO-RIÑÓN y 7: control negativo.

VDA_0839: Un gen que codifica un posible TBDT que se encuentra en el cromosoma 2. No se encontró entre las proteínas hierro-reprimidas de los geles 2D, pero contiene una caja Fur en su promotor, y se encuentra distribuido de manera uniforme en todas las cepas de la subespecie *damselae* analizadas.

fhuE: Gen que codifica una proteína de membrana externa, presente en el cromosoma 2. Proteína descrita anteriormente como hierro-reprimida y que presenta una distribución uniforme en todas las cepas de la subespecie *damselae.*

***tonB*:** Existen en el genoma de la subespecie *damselae* genes de los dos tipos principales de sistemas TonB: el *tonB1* que se encuentra en el cromosoma 1 y el *tonB2* que se encuentra en el cromosoma 2 (Figura IV.31, genes azules). No se encuentran en la lista de proteínas hierro-reprimidas pero ambos genes contienen cajas Fur en los promotores y se encuentran de manera ubicua en la subsp. *damselae*.

Transportadores ABC: Como podemos ver en el esquema de los cromosomas (Figura IV.31), la cepa RM71 contiene un número elevado de transportadores ABC. Se seleccionó uno de los transportadores como mejor candidato a analizar por mutagénesis

por presentar una caja Fur muy conservada, y formar parte del operón *VDA_1206* al *VDA_1208* (Figura IV.31, genes amarillos).

Crecimiento en déficit de hierro de los mutantes

- Mutantes de receptores y transportadores

Se construyeron mutantes por intercambio alélico de dos genes que codifican los receptores FhuE y VDA_0839 respectivamente, así como del transportador ABC VDA_1206-VDA_1208 (abarcando la deleción de los tres genes del transportador), siendo todos ellos candidatos a formar parte del sistema de captación del segundo sideróforo en la cepa RM71. Asimismo se realizaron mutantes dobles de los receptores FhuE y VDA_0839, para descartar que la falta de fenotipo de los mutantes simples se debiese a que uno complementase la función del otro. Se empleó como cepa parental en todos los casos, RM71 Rif^r.

Una vez obtenidos los mutantes BP10 (*ΔVDA_0839*), BP14 (*ΔfhuE*), BP13 (*ΔVDA_1206-1208*) y BP22 (*ΔfhuE-VDA_0839*), se cultivaron en condiciones limitantes de hierro (CM9 con 40 µM de dipiridil) y se midieron los valores del crecimiento (DO_{600}) y los valores del ensayo CAS (A_{630}) después de 12 horas de cultivo.

Como se puede ver en la Figura IV.34 ninguno de los mutantes produjo un cambio fenotípico claro con respecto al crecimiento ni a la producción de sideróforos. Estos resultados sugieren que ni FhuE ni VDA_0839 actúan como receptores del segundo sideróforo y que VDA1206-1208 no es el transportador ABC especializado. Dada la amplia lista de transportadores ABC candidatos, no se puede descartar que unos complementen la función de otros, por lo que incluso con la construcción de mutantes múltiples sería difícil demostrar claramente la función de transporte específico de sideróforos.

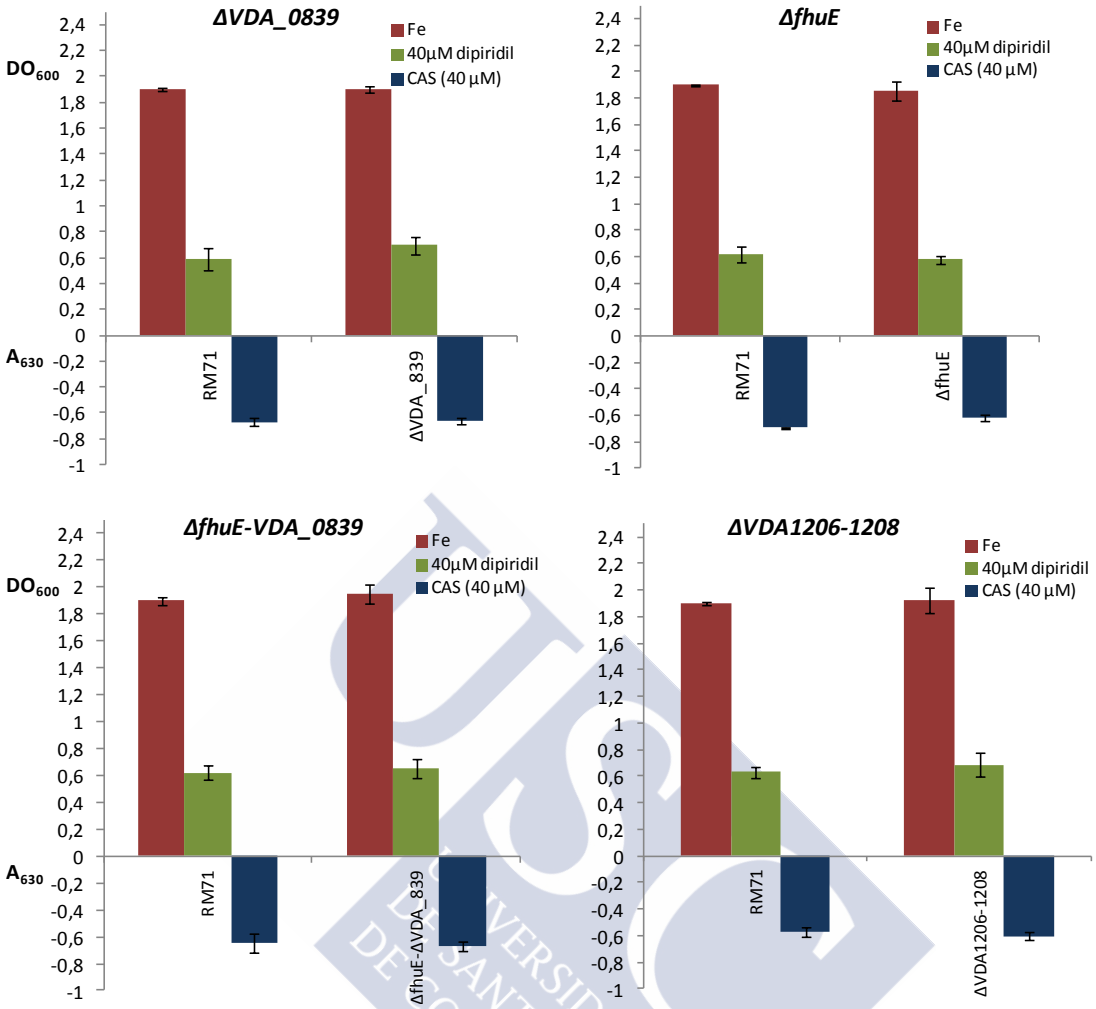

Figura IV.34: Pruebas de crecimiento (DO_{600}) y valores de CAS (A_{630}) de las cepas mutantes BP10 (*ΔVDA_0839*), BP14 (*ΔfhuE*), BP13 (*ΔVDA_1206-1208*) y BP22 (*ΔfhuE-VDA_0839*) bajo condiciones de déficit de hierro (CM9 con 40 µM de dipiridil), después de 12 h de incubación.

- Mutantes de proteínas TonB

Se realizaron mutantes por intercambio alélico de los genes que codifican las proteínas TonB1 y TonB2. Además se construyó un mutante doble TonB1-TonB2, dado que podrían ser ambos sistemas los responsables de la captación del sideróforo como ocurre en *V. cholerae* (vibriobactina) (Wyckoff et al., 2007), *V. vulnificus* (vulnibactina y un hidroxamato) (Kuehl & Crosa, 2010) o *V. alginolyticus* (vibrioferrina) (Wang et al., 2008).

Como se observa en la Figura IV.35 ninguno de los mutantes BP18 (*ΔtonB1*) BP19 (*ΔtonB2*) o BP25 (*ΔtonB1-ΔtonB2*) produjo un cambio fenotípico claro con respecto al

crecimiento ni a la producción de sideróforos después de haber crecido durante 12 horas en un medio con déficit de hierro. Descartamos por tanto que en la cepa RM71 las proteínas TonB1 y TonB2 intervengan en el paso del segundo sideróforo al espacio periplásmico.

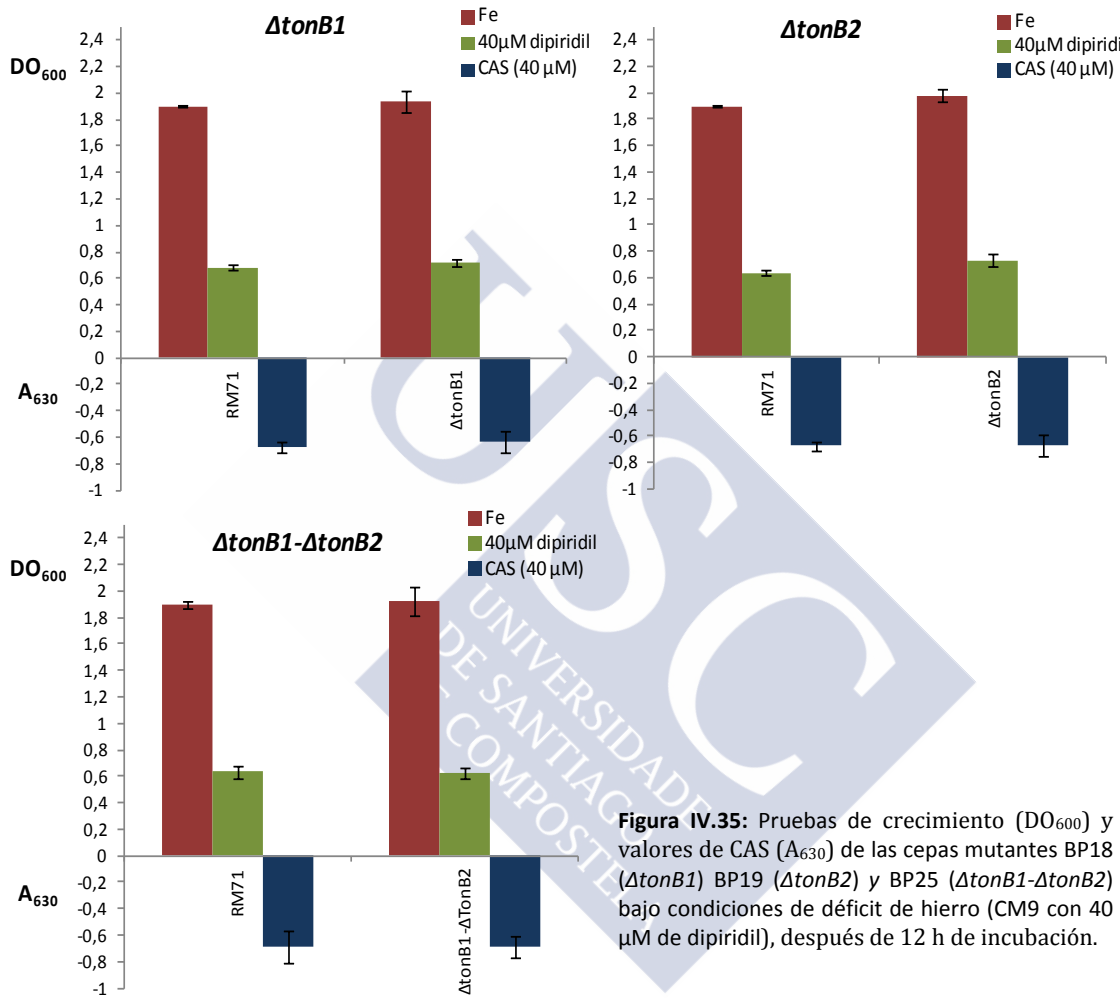

Figura IV.35: Pruebas de crecimiento (DO_{600}) y valores de CAS (A_{630}) de las cepas mutantes BP18 (*ΔtonB1*) BP19 (*ΔtonB2*) *y* BP25 (*ΔtonB1-ΔtonB2*) bajo condiciones de déficit de hierro (CM9 con 40 µM de dipiridil), después de 12 h de incubación.

Análisis del sistema TonB3 en *P. damselae* subsp. *damselae*

Como hemos visto, en la cepa RM71 ninguna de las proteínas TonB1 o TonB2 parecen ser esenciales para proporcionar energía en el transporte del complejo sideróforo-hierro hacia el espacio periplásmico. Nos planteamos por tanto si podría existir un tercer sistema TonB. Se ha descrito en algunas bacterias un tercer sistema,

TonB3, que suele estar relacionado con la motilidad y el sistema de secreción de tipo IV (Huang et al., 2004; Cowles et al., 2013). En *Campylobacter jejuni* la proteína TonB3 media la adquisición de sideróforos de tipo catecol, concretamente la enterobactina (Naikare et al., 2013). En cambio TonB3 no interviene ni en el transporte de hierro ni en la virulencia en *V. vulnificus* (Kustusch et al., 2012).

Analizando el genoma de la cepa RM71 en busca de proteínas homólogas a TonB3 descritas en distintas especies de *Vibrio*, se pudo localizar el gen *VDA_0794* en el cromosoma 2, que codificaba una proteína con un 60% de similitud con el TonB3 de *V. vulnificus* (Figura IV.36). Este gen se encuentra aguas arriba del gen *tonB2* y aguas abajo del gen *fhuE* y estaría regulado por la caja-Fur presente en el promotor del gen *fhuE*. Sabemos que en *V. vulnificus* TonB3 no es responsable del transporte de hierro (Kustusch et al., 2012) y que las proteínas TonB2 y TonB1 están relacionadas con la adquisición de su sideróforo (Kuehl & Crosa, 2010). En cambio en la cepa RM71 de *P. damselae* subsp. *damselae* ninguno de los dos TonB mostró tener relación con el transporte del segundo sideróforo, por lo que este papel podría asumirlo TonB3. Además TonB3 resultó ser la única proteína TonB identificada en el estudio proteómico (ver apartado 2.1.1).

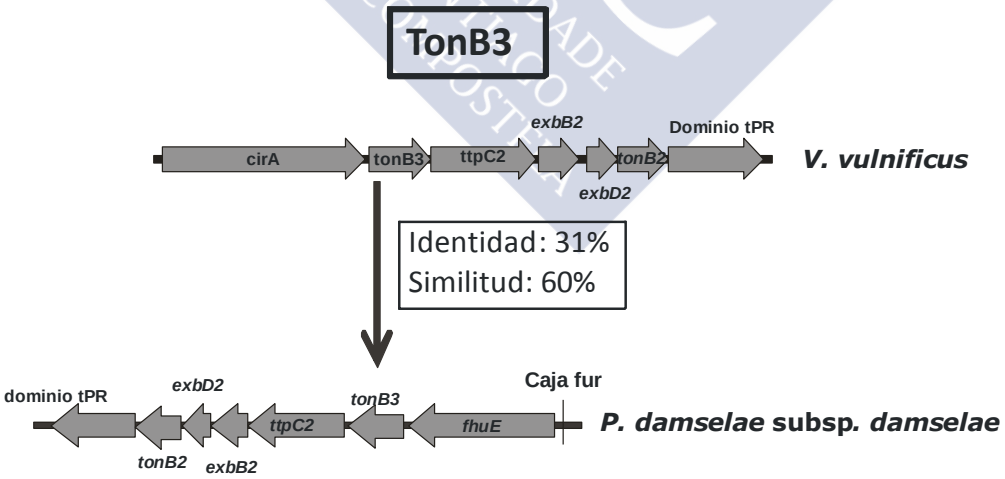

Figura IV.36: Representación del gen *tonB3* y su entorno genético en *V. vulnificus* y *P. damselae* subsp. *damselae*.

- Crecimiento en déficit de hierro del triple mutante *tonB*:

Partiendo del doble mutante *tonB1-tonB2* se construyó un mutante por intercambio alélico para el gen *tonB3*, obteniendo así un triple mutante para los tres sistemas TonB: BP32 (*ΔtonB1-tonB2-tonB3*). Este mutante se incubó en un medio con déficit de hierro (CM9 con 40 µM de dipiridil), y después de 12 horas de cultivo se midieron los valores de crecimiento (DO_{600}) y de CAS (A_{630}). Como podemos ver en la Figura IV.37 tampoco el mutante triple dio lugar a un cambio fenotípico claro con respecto a la cepa parental, ni en el crecimiento ni en la producción de sideróforos. Por tanto, TonB3 tampoco sería la proteína que le proporciona energía al receptor del segundo sideróforo que se busca.

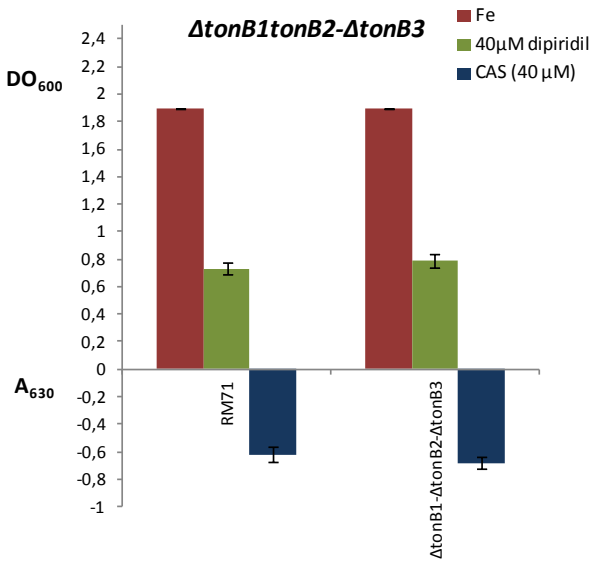

Figura IV.37: Crecimiento (DO_{600}) después de 12 h y valores de CAS (A_{630}) del triple mutante BP32 (*ΔtonB1-tonB2-tonB3*) bajo condiciones de déficit de hierro añadiendo 40 µM de dipiridil.

Aún a pesar de no haber localizado los genes candidatos del sistema del segundo sideróforo común a las cepas tipo A y B, sabemos que ni FhuE ni VDA_0839 son los receptores dependientes de TonB de este sideróforo y que al contrario de lo que ocurre en la inmensa mayoría de los vibrios (Kuehl & Crosa, 2010), *P. damselae* subsp. *damselae* no precisa para el transporte del sideróforo ninguno de los dos sistemas TonB descritos, ni tampoco el sistema TonB3, que media la adquisición de sideróforos en *Campylobacter jejuni* (Naikare et al., 2013). También sabemos que el operón *aroA-trpEGDCBA* no interviene en la biosíntesis del segundo sideróforo.

3.3 Estudio de una colección de mutantes por transposición en la cepa RM71

Hasta ahora el estudio comparativo de proteínas totales de la cepa RG91 crecida en presencia y ausencia de hierro y la búsqueda de genes candidatos mediante secuenciación de la cepa RM71, no nos ha aportado ningún candidato a formar parte del

sistema de síntesis y transporte del segundo sideróforo. Por todo esto nos planteamos emplear una tercera estrategia que consiste en la mutagénesis aleatoria con el transposón mini-Tn*10* (Herrero et al., 1990), obteniendo una librería de mutantes en RM71. Se buscaron genes candidatos en aquellos mutantes que presentasen valores de CAS y crecimiento inferiores a los obtenidos en la cepa salvaje.

3.3.1 Obtención de mutantes por transposición mini-Tn*10*

Una vez se obtuvo la librería de mutantes por transposición con mini-Tn*10* en la cepa RM71 Rif^r, los clones se crecieron durante 12 horas en 100 µl de LB en una placa microtiter. A continuación se inocularon 5 µl de los cultivos en 100 µl de medio CM9 con 25 µM de dipiridil (se utilizó una concentración inferior de dipiridil para favorecer el crecimiento). Se comprobaron los resultados de CAS en todos los pocillos después de 12 horas de incubación a 25ºC. Aquellos mutantes Tn*10* que produjeron una reacción de CAS negativa (coloración azul) son candidatos a contener inserciones en genes de biosíntesis de sideróforos. En cambio aquellos que produjeron valores de CAS mayores que el salvaje (rojo intenso) podrían ser candidatos a contener inserciones en genes de transporte del sideróforo (Figura IV.38).

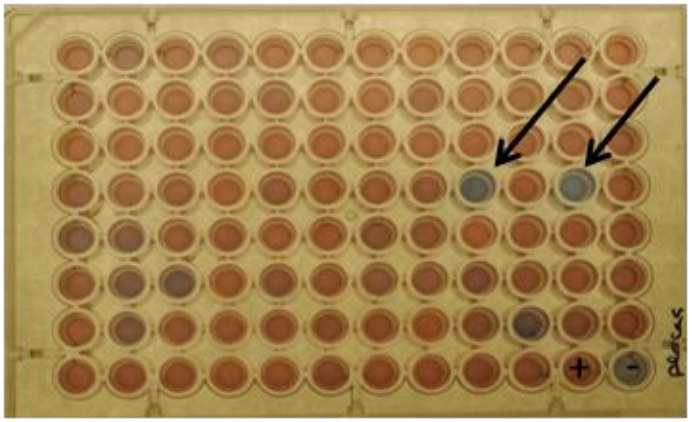

Figura IV.38: Resultados de los ensayos CAS en placa de 96 pocillos después de crecer los mutantes Tn*10* durante 12 h a 25ºC en un medio mínimo CM9 con 25 µM de dipiridil. Las flechas señalan 2 clones CAS negativos. Extremo inferior derecho: controles, positivo (cepa RM71), y negativo (CM9 con dipiridil sin inocular).

A continuación se dejaron crecer todos los mutantes candidatos durante 12 horas en medio CM9 con exceso y déficit de hierro (40 µM de dipiridil). Se descartaron aquellos mutantes auxótrofos incapaces de crecer en medio mínimo.

3.3.2 Crecimiento en déficit de hierro de los mutantes

Todos aquellos mutantes que crecían bien en medio mínimo CM9 y mostraban déficit de crecimiento en CM9 con 40 µM de dipiridil, fueron considerados firmes candidatos a ser mutantes de genes del sistema de captación y síntesis del segundo sideróforo (Figura IV.39).

A continuación se comprobó el fenotipo de estos candidatos crecidos en medio minimo CM9 con déficit de hierro a 25 µM (Figura IV.40, línea negra) y 40 µM (Figura IV.40, línea gris) de dipiridil. Se realizaron mediciones de crecimiento (DO_{600}) y de valores CAS (A_{630}) a las 12 y a las 24 horas. En la Figura IV.40 se observan los resultados de todos los candidatos a los que se les realizaron los ensayos de crecimiento. Las cepas BP56, BP57 y BP60 crecieron igual que la cepa parental a las 24 horas tanto a 25 como a 40 µM de dipiridil pero los resultados de CAS fueron menores a lo largo de toda la curva de crecimiento, con lo que podría pensarse que la mutación se encontrase en un gen de biosíntesis de sideróforos.

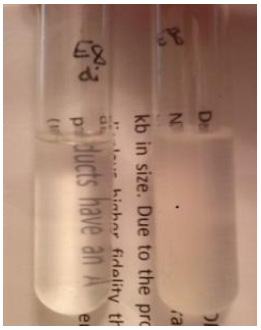

Figura IV.39: Mutante Tn*10*. Dcha: CM9 sin dipiridil. Izda: CM9 con dipiridil.

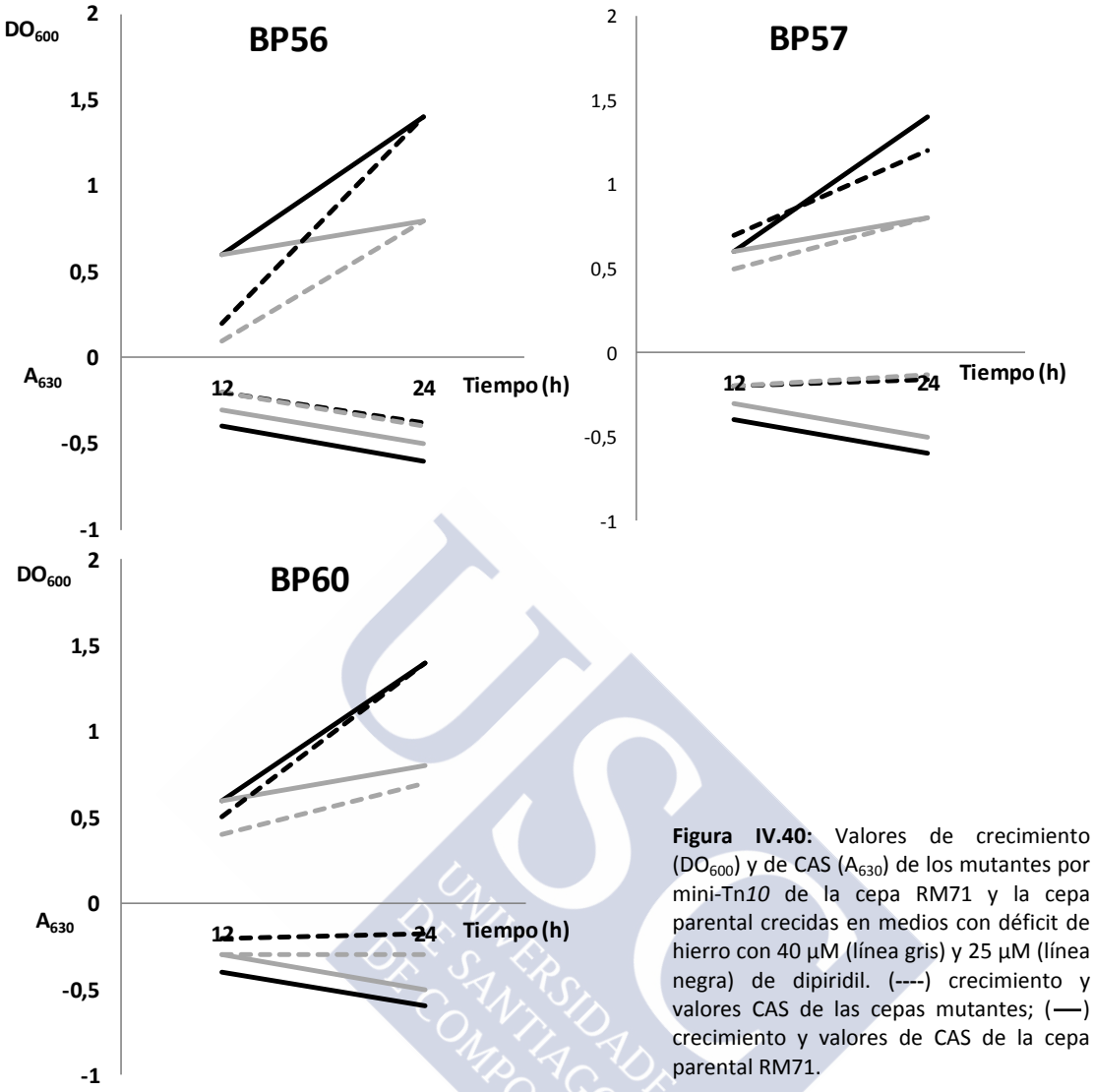

Figura IV.40: Valores de crecimiento (DO_{600}) y de CAS (A_{630}) de los mutantes por mini-Tn*10* de la cepa RM71 y la cepa parental crecidas en medios con déficit de hierro con 40 µM (línea gris) y 25 µM (línea negra) de dipiridil. (----) crecimiento y valores CAS de las cepas mutantes; (—) crecimiento y valores de CAS de la cepa parental RM71.

3.3.3 Análisis de los genes inactivados en mutantes por inserción de mini-Tn*10*

Mediante clonación (ver Métodos) se identificaron las secuencias flanqueantes al transposón mini-Tn*10* en los diferentes mutantes, y tras la predicción de las ORFs se determinó su localización en el genoma de la cepa RM71. Los genes inactivados en cada mutante individual se describen en la Figura IV.41.

Posibles candidatos de biosíntesis:

BP56: *VDA_0461::*Tn*10*. *VDA_0461* codifica la enzima cardiolipina sintetasa de la síntesis de cardiolipina, un lípido que forma parte de la membrana plasmática (Figura IV.41). Presenta un dominio *PL*Dc_2 (Pfam: PF13091).

BP57: *vieA::*Tn*10*. VieA tiene función reguladora en procesos relacionados con la formación de biopelículas y la virulencia, hidrolinzando el segundo mensajero bis-(2',5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP) (Tamayo et al., 2005) (Figura IV.41). Presenta un dominio *EAL* (Pfam: PF00563) con función fosfodiesterasa de c-di-GMP.

BP60: *hisH::*Tn*10*. HisH es una enzima que cataliza el quinto paso de la biosíntesis de la histidina (Figura IV.41). Presenta un dominio *GATasa* (Pfam: PF00117) con función glutamina-amidotransferasa que cataliza la eliminación del grupo amoniaco de la glutamina y transfiere este grupo a un sustrato para formar un nuevo grupo carbono-nitrógeno.

Después de analizar las secuencias flanqueantes no encontramos ninguna ORF que presentase homología clara con algún componente relacionado con los sistemas de captación de sideróforos. Esto nos hizo plantearnos la hipótesis de que los genes de síntesis del sideróforo podrían ser genes esenciales del metabolismo; si fuese así sería imposible localizar un mutante de síntesis mediante esta técnica de transposición, ya que las mutaciones serían deletéreas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

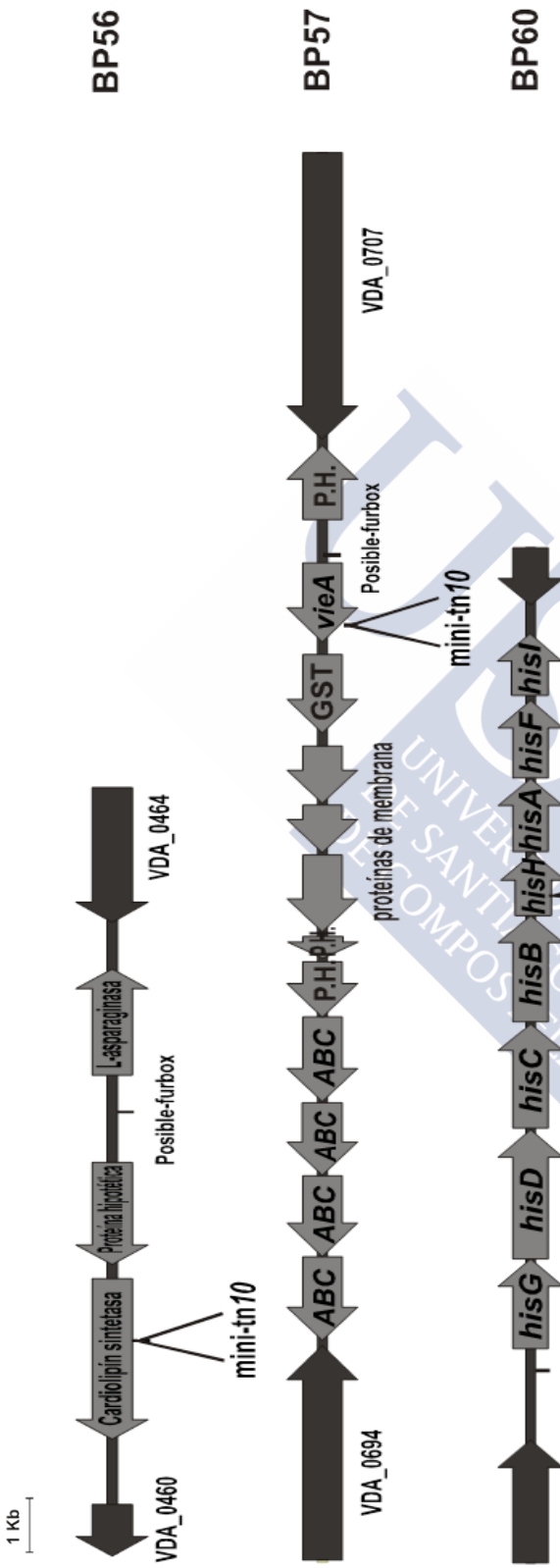

Figura IV.41: Mapa genético de los puntos de inserción de los mini-Tn*10* en los mutantes de la cepa RM71 que presentaban cambios fenotípicos en el crecimiento y en los valores de CAS con respecto a la cepa salvaje. Los números de los genes de las zonas flanqueantes (de color negro) se refieren a la anotación de la cepa tipo ATCC33539 (GenBank accession no. ADBS00000000).

3.4 Comparación de los genomas ATCC33539, RG91 y RM71

Sabemos que la cepas de tipo A y B sintetizan sideróforos, a diferencia de las de tipo C que parecen no sintetizar ninguno (véase apartado 1). Podría ocurrir que las células de la cepa de tipo C (ATCC33539) utilizasen los sideróforos sintetizados por otras cepas porque haya perdido sus propios genes de síntesis. Como ya se mencionó anteriormente, se tiene constancia de nichos ecológicos en los que se llega a una especialización: los genes de síntesis que están agrupados se pierden y determinadas bacterias dejan de sintetizar el sideróforo, pero mantienen la capacidad de utilizarlo. Esto sugiere una presión selectiva variable a lo largo de cada linaje, llegando a establecerse células productoras del sideróforo común y células que no lo producen y que en cambio se aprovechan de los sideróforos sintetizados por otras. Las cepas que han perdido la capacidad de producir sideróforos sufren una clara disminución de la eficiencia del crecimiento cuando se cultivan en medios pobres en hierro (Cordero et al., 2012), como le ocurre a la cepa tipo C (ATCC33539).

Con el fin de encontrar las diferencias genéticas que nos puedan permitir localizar los genes del sistema de síntesis del nuevo sideróforo (posiblemente presente en las cepas de tipo A y B, y no en las de tipo C), obtuvimos la secuencia del genoma de las cepas RM71 y RG91 (tendrían un sideróforo común) y las comparamos con la cepa tipo ATCC33539 (GenBank: ADBS00000000) considerada no productora de sideróforos.

El genoma de la cepa ATCC33539 difiere en tamaño y en número de genes de las otras dos cepas (Tabla IV.9). La secuencia actualmente disponible de la cepa ATCC33539 presenta 8 *contigs,* de los cuales 2 corresponden a los cromosomas 1 y 2, y el resto son plásmidos: 1) El plásmido pPHDD1 (153 kb) (Rivas et al., 2011), que codifica la hemolisina $HlyA_{pl}$ y la damselisina (Dly) y se encuentra en aquellas cepas más virulentas (entre ellas la RM71 y la RG91) (Rivas et al., 2013). 2) 5 plásmidos propios de la cepa ATCC33539: pPHDD2 (200 KB) que codifica un sistema de secreción de tipo III (datos no publicados). 3) 4 plásmidos de 16 a 200 Kb, que no presentan ningún gen relacionado con sistemas de captación de hierro mediante sideróforos.

Tabla IV.9: Características generales de los genomas de las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae*, ATCC33539 , RM71 y RG91.

Genoma	RM71	RG91	ATCC33539
Tamaño	4,520,594 pb	4,976,918 pb	5,046,328 bp
GC	41	41	41
Número de genes	4115	4162	4401
Número de subsistemas	455	472	486

Se realizaron alineamientos múltiples de los tres genomas ATCC33539, RM71 y RG91. Se eliminaron los plásmidos del alineamiento, ya que sabíamos que RM71 y RG91 sólo presentan el plásmido pPHDD1, que no contiene genes relacionados con los sistemas de sideróforos. Como se observa en la Figura IV.42, se trata de cromosomas sinténicos en cuanto a la organización de los genes. Se organizan en dos cromosomas, el cromosoma 1 de mayor tamaño y el cromosoma 2 de menor tamaño.

Todas las especies del género *Vibrio* organizan sus genes en dos cromosomas. En un estudio en *V. vulnificus* se demostró que la mitad de las proteínas hierro-reprimidas se localizaban en el cromosoma 2 (Miyamoto et al., 2009), siendo considerado el cromosoma en donde se localizan los genes específicos de especie (Okada et al., 2005). El cromosoma 1 es un cromosoma muy conservado y es considerado el cromosoma "housekeeping", que presenta los genes fundamentales para la supervivencia de la bacteria (Okada et al., 2005). En nuestro caso las proteínas hierro-reprimidas, identificadas en el apartado 2.1.1 se encuentran mayoritariamente codificadas en el cromosoma 1.

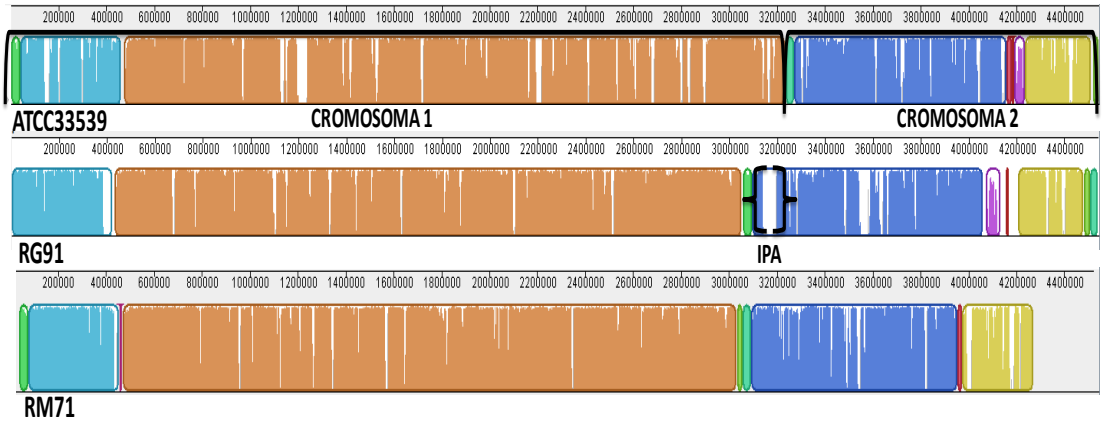

Figura IV.42: Análisis comparativo de los genomas (cromosomas 1 y 2) de las tres cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* analizadas, ATCC33539, RG91 y RM71. Los códigos de colores representan bloques de genes comunes sinténicos, que alinean con los demás genomas. Dentro de cada bloque monocolor, la altura de las barras de color está relacionada con el nivel de similitud de la secuencia, mientras que las zonas (barras) blancas corresponden a secuencias propias de cada cepa individual.

Como vemos en la Figura IV.42 no existe reorganización cromosómica entre cepas. Las diferencias las encontramos principalmente en una zona hipervariable, que se asocia funcionalmente con la síntesis de lipopolisacáridos (LPS), y la presencia de regiones cromosómicas concretas (bloques en blanco de la Figura IV.42), que se pueden atribuir a elementos de transferencia horizontal como fagos, profagos o islas genéticas. Entre estas últimas es de destacar la isla de patogenicidad que porta los genes del sistema de la vibrioferrina presente en la cepa RG91 (Figura IV.42) (véase apartado 2.3). En la bibliografía se ha descrito una gran variabilidad serológica entre los aislados de *P. damselae* subsp. *damselae* (Fouz et al., 1992). Esto se ve reflejado en la gran variabilidad que encontramos en la región cromosómica que codifica los LPS.

En la Figura IV.43 se muestra la distribución por categorías funcionales de los genes propios de la cepa RM71. A priori se puede descartar a nivel genómico la existencia de un sistema de síntesis o captación de sideróforo convencional que nos indique que esta cepa sintetice un sideróforo distinto al de la cepa RG91. Las diferencias encontradas en la cepa RM71 con respecto a las otras dos analizadas se deben en gran parte a la presencia de elementos móviles, y de genes relacionados con ácidos grasos, lípidos y material de la cápsula y la pared celular.

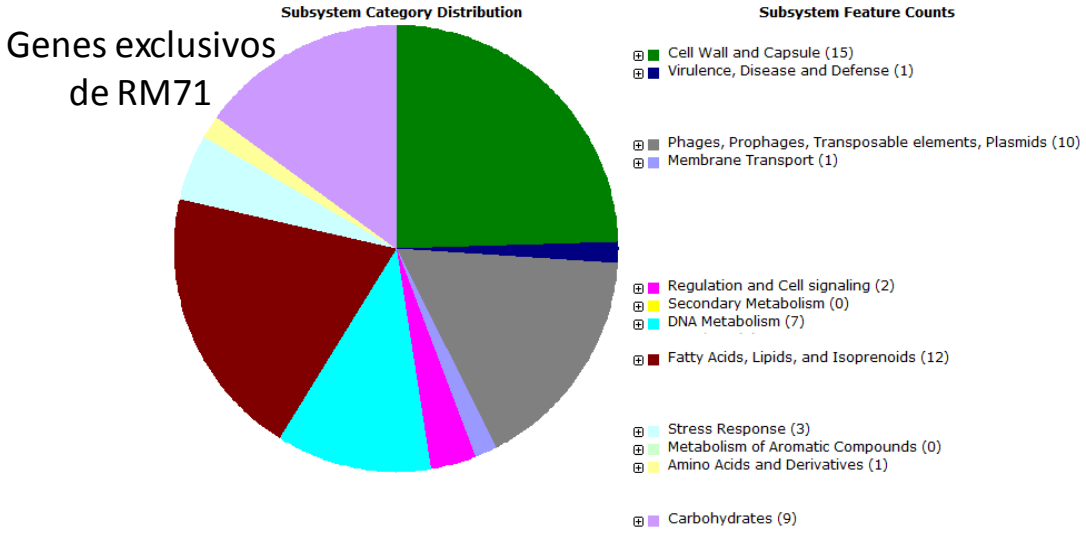

Figura IV.43: Categorías funcionales de genes exclusivos de la cepa RM71. Los genes se clasifican según su función en los subsistemas y se distribuyen en las diferentes categorías (basado en una anotación del servicio RAST).

Los genomas de las tres cepas son muy similares en cuanto a su contenido genético. No hay ninguna cepa que presente alguna categoría con diferencias significativas frente a las demás. Se puede observar en la Figura IV.44 enmarcada en un cuadro rojo la categoría funcional de adquisición de hierro y metabolismo de sideróforos. En el subsistema de sideróforos, sólo existen los 11 genes cuyas ORFs presentan homología con el sistema de la vibrioferrina en la cepa RG91 (flecha). No encontramos ninguna ORF con homología a proteínas de sistemas de síntesis de sideróforos, ni dependientes de péptido-sintetasas no ribosómicas (NRPS) ni independientes de NRPS.

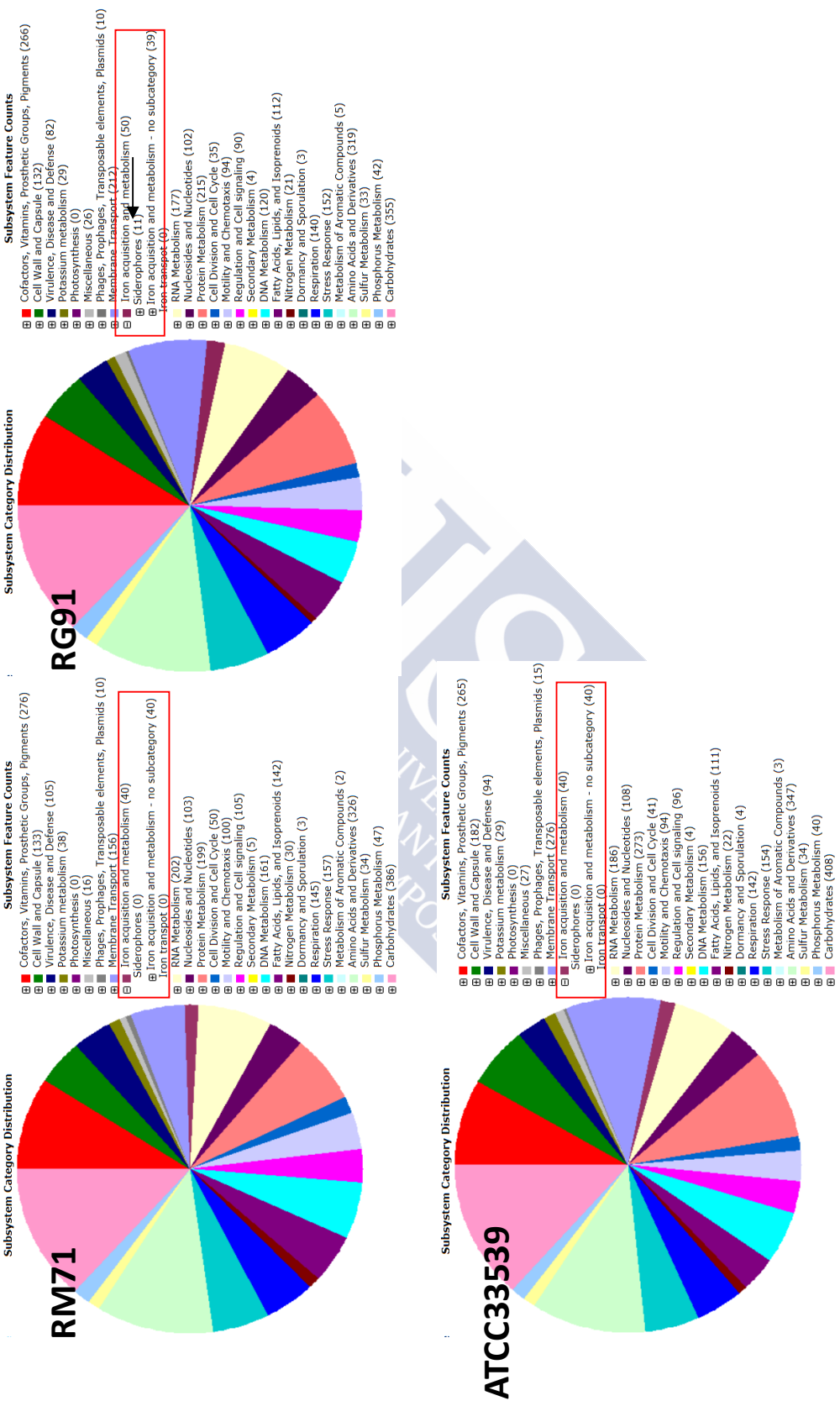

Figura IV.44: Categorías génicas funcionales de los genomas de las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* RM71, RG91 y ATCC33539. Los genes se clasifican según su función en los subsistemas y se distribuyen en las diferentes categorías (basado en una anotación del servicio RAST).

La comparación de los genomas indica que cada cepa comparte al menos el 70% de los genes (unos 3.000) con las otras dos cepas (Figura IV.45). Entre los 599 genes propios de la cepa RG91 se encuentran los genes de síntesis y transporte de la vibrioferrina (véase apartado 2). Las cepas RM71 y RG91 son las que claramente producen sideróforos, por lo que los genes de síntesis se tendrían que encontrar entre los 80 genes que comparten las dos cepas.

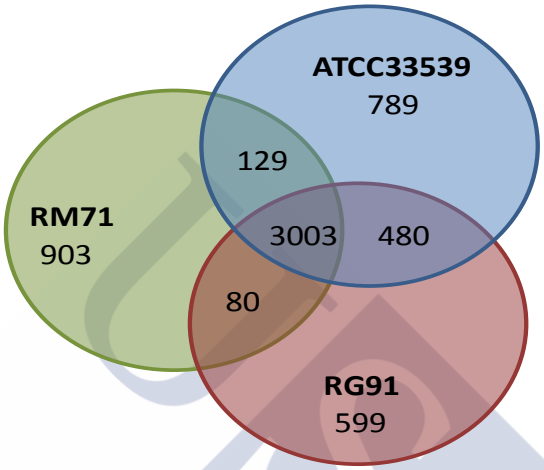

Figura IV.45: Diagrama representativo de los genes propios de cada cepa y los que comparten entre ellas.

Analizando los resultados de las búsquedas *BLAST* realizadas a cada uno de los 80 genes que comparten las cepas de tipo A (RG91) y B (RM71) (Tabla IV.10) encontramos que más del 80% correspondieron o bien a proteínas hipotéticas o bien no arrojaron resultado alguno en las búsquedas de *BLAST*.

Tabla IV.10: Relación de proteínas homólogas a las codificadas por los 80 genes comunes entre las cepas de tipo A (RG91) y B (RM71).

Proteína	Homología	Nº Acceso	Identidad	Similitud
Transportador de nicotinamida	*P. phosphoreum*	CDO01188.1	85%	93%
Integrasa	*P. angustum*	WP_005366053.1	98%	98%
Diguanilato ciclasa	*V. ponticus*	GAK82790.1	63%	81%
Permeasa	*V. vulnificus*	WP_011082192.1	52%	71%
Proteína fimbrial	*V. mimicus*	WP_000649328.1	52%	66%
Proteína de unión al corismato	*P. profundum*	WP_006229712.1	66%	80%
Translocasa SecY	*V. parahaemolyticus*	WP_005496934.1	99%	100%
DDE endonucleasa	*V. parahaemolyticus*	WP_029784210.1	85%	89%
Regulador transcripcional AraC	*P. profundum*	WP_006231538.1	47%	66%

Entre Las ORFs que si presentaron homologías encontramos tres proteínas de transporte: (i) transportador de nicotinamida, (ii) una proteina de unión al corismato (ChrA), y (iii) la translocasa SecY, proteína que forma parte del translocador SecA-YEG que se encarga de secretar proteínas al periplasma. Además, también encontramos la enzima diguanilato ciclasa de síntesis del mensajero secundario c-di-GMP; un regulador transcripcional, una integrasa, una endonucleasa y una proteína fimbrial (Tabla IV.10). Ninguno de estos genes estaría relacionado con el sistema de síntesis del posible segundo sideróforo.

La carencia de producción de sideróforos por parte de la cepa tipo ATCC33539 podría deberse a una mutación puntual en el sistema de síntesis. Debido a que en la secuenciación se obtuvieron los genomas parcialmente fragmentados en *contigs*, no fue factible realizar una comparativa a nivel de SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*) y buscar esas posibles mutaciones puntuales.

Nuestros resultados apuntan a que las cepas de tipo A y B sintetizan un sideróforo común. Viendo que en las cepas tipo A no aparece ningún gen candidato, y considerando que la falta de síntesis de un sideróforo por parte de la cepa ATCC33539 podría deberse a una mutuación puntual (no existen genes comunes entre las cepas de tipo A y B con una función clara relacionada con la síntesis de sideróforos), nos empezamos a plantear si estaríamos ante un nuevo sistema de captación de hierro cuyos genes no hubiesen sido descritos hasta ahora y que formasen parte del grupo de los genes esenciales. Podría existir algún metabolito de la ruta metabolica común que sea capaz de funcionar como quelante de hierro, o que existan otras estrategias (Schalk, 2013), con las que *P. damselae* subsp*. damselae* sea capaz de captar hierro.

3.5 Evidencias de un sideróforo basado en citrato en *P. damselae* subsp*. damselae*

El citrato sintetizado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, si bien no es un gran quelante, puede servir como agente de captación de hierro para las bacterias, los hongos y las plantas. El citrato es capaz de unir tanto Fe^{+2} como Fe^{+3}, aunque el citrato se une al Fe^{+2} con una afinidad mucho menor (Francis & Dodge, 1993; Field et al., 1974). La molécula de citrato tiene un grupo hidroxilo y tres grupos carboxilo con los que

puede unirse con el hierro formando complejos mono, di o tricitrato férrico (Yue et al., 2003; Fukushima et al., 2012).

En colaboración con el grupo de investigación del profesor Carlos Jiménez, del departamento de Química Fundamental de la Universidad de A Coruña, se realizó un fraccionamiento biodirigido del extracto del sobrenadante de la cepa RM71 crecida en déficit de hierro (40 µM de dipiridil). Se obtuvo una fracción acuosa (PDX1) del extracto del sobrenadante, que dio positivo en CAS y presentaba actividad sideróforo en bioensayos. La subfracción insoluble en metanol (PDX1M1) de la fracción PDX1, dio también un resultado positivo en CAS (-0,83) (Figura IV.46).

Se decidió comprobar si en esta fracción con actividad quelante existía algún pico que se correspondiese al citrato de sodio. En la Figura IV.47 podemos observar los dos cromatogramas después de inyectar la fracción PDX1M1 (Panel A) y una mezcla de PDX1M1+citrato sódico (la concentración aproximada de citrato en la mezcla es del 38%) (Panel B). En el cromatograma B se observa que después de inyectar PDX1M1+citrato sódico aumenta 5 veces la intensidad del pico con tiempo de retención de 18,5 min. Esto concuerda con lo esperado para la cantidad agregada de citrato sódico.

La fracción con actividad quelante PDX1M1 era heterogénea, constituida mayoritariamente por glúcidos que no eran positivos en el ensayo CAS y un compuesto basado en citrato. El citrato sódico está presente en una cantidad significativa en PDX1M1, teniendo en cuenta que es una fracción que ha sido sometida a varios procesos de fraccionamiento y/o purificación. También se detectó por LC/MS en la fracción PDX1M1 una molécula basada en citrato.

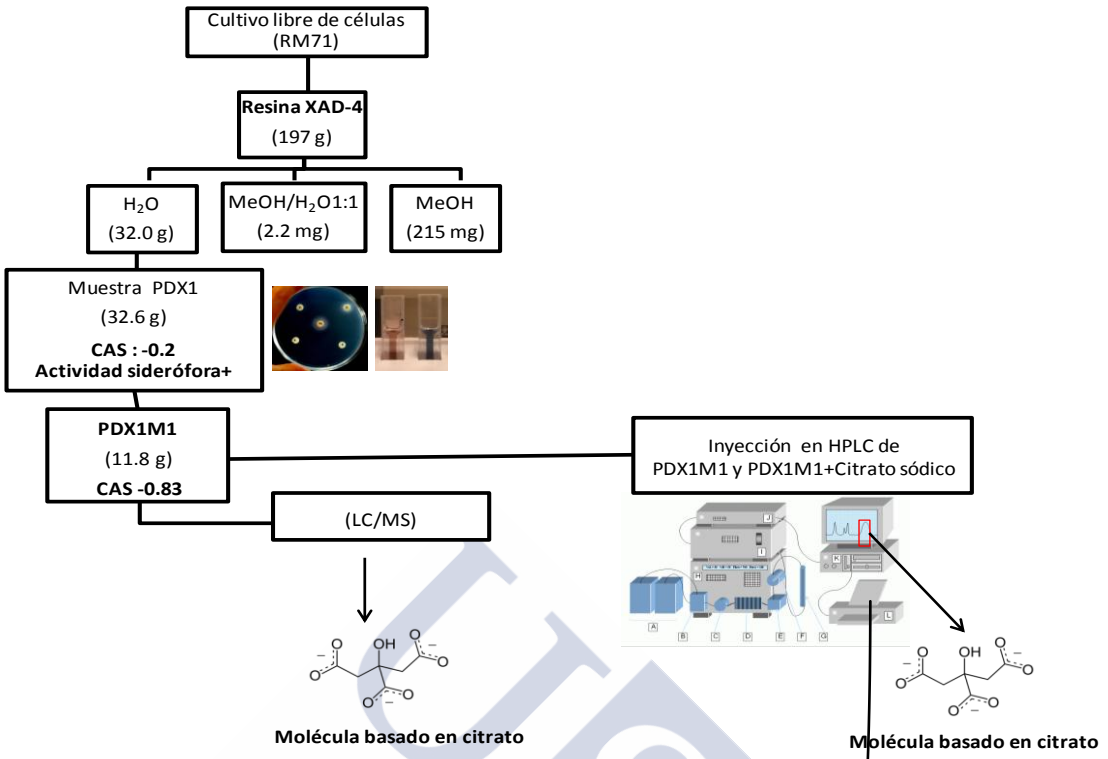

Figura IV.46: Esquema del fraccionamiento biodirigido del extracto del sobrenadante de la cepa RM71 crecida en déficit de hierro añadiendo 40 µM de dipiridil.

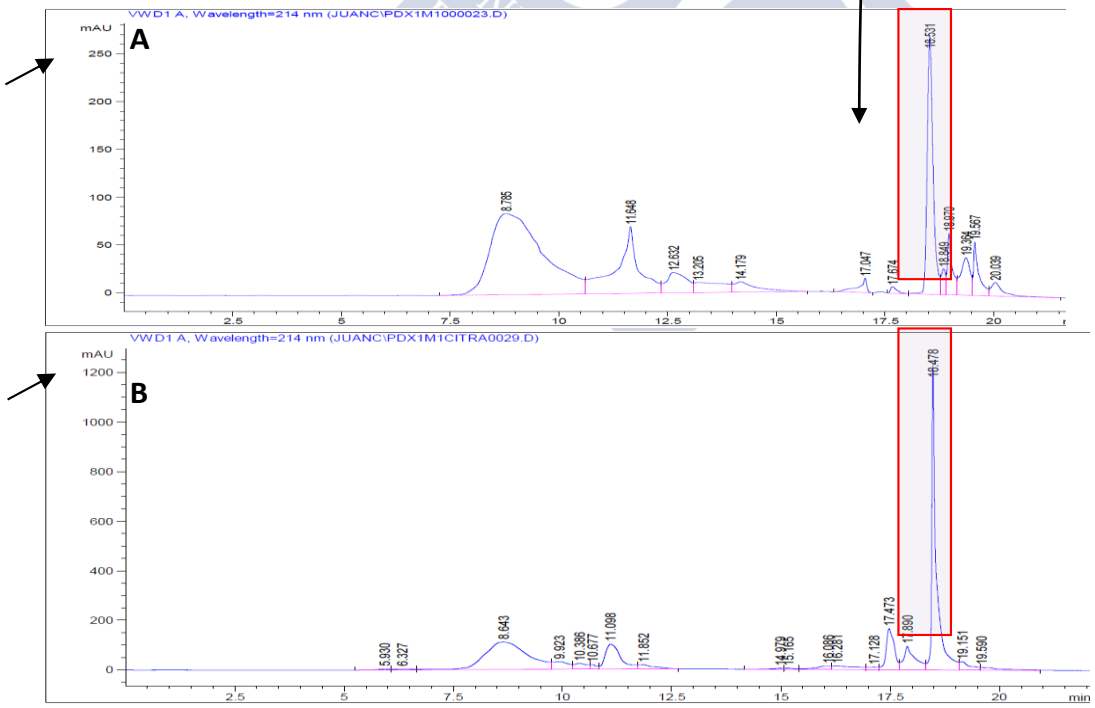

Figura IV.47: (A) Cromatograma de HPLC de la fracción PDX1M1. (B) Cromatograma de la fracción PDX1M1 + citrato sódico.

Este resultado nos permite barajar la posible utilización como fuente de hierro de un compuesto derivado del citrato por parte de *P. damselae* subsp*. damselae.* Los genes de síntesis estarían por tanto formando parte de la fracción de los genes esenciales.

Precisamente, una de las principales fuentes de hierro en las bacterias es el citrato. Se ha descrito en *E. coli* que el citrato se capta mediante un sistema Fec encabezado por un receptor dependiente de TonB, denominado FecA, y el transportador ABC FecABCD (Yue et al., 2003; Ogierman & Braun, 2003; Braun & Endriss, 2007). Un estudio realizado en *P. aeruginosa* (Harding & Royt, 1990) mostró claramente que el mecanismo de transporte de citrato férrico era inducible en condiciones limitantes de hierro y en algunos casos la captación de citrato se lleva a cabo mediante el receptor FecA y el transportador del Fe^{+2} en la membrana interna FeoB (Marshall et al., 2009), lo que implica la separación del citrato y el hierro en el espacio periplásmico.

Con objeto de comprobar si las tres cepas representativas de tipo A (RG91), tipo B (RM71) y tipo C (ATCC33539) eran capaces de utilizar citrato como fuente de hierro, se cultivaron en CM9 con alto déficit de hierro (90 µM de dipiridil), añadiendo citrato férrico 10 µM. Como era de esperar, las tres cepas testadas pueden crecer en estas condiciones utilizando el citrato férrico (10 µM) como única fuente de hierro, aunque la cepa tipo C (ATCC33539) lo hace en menor medida (Figura IV.48).

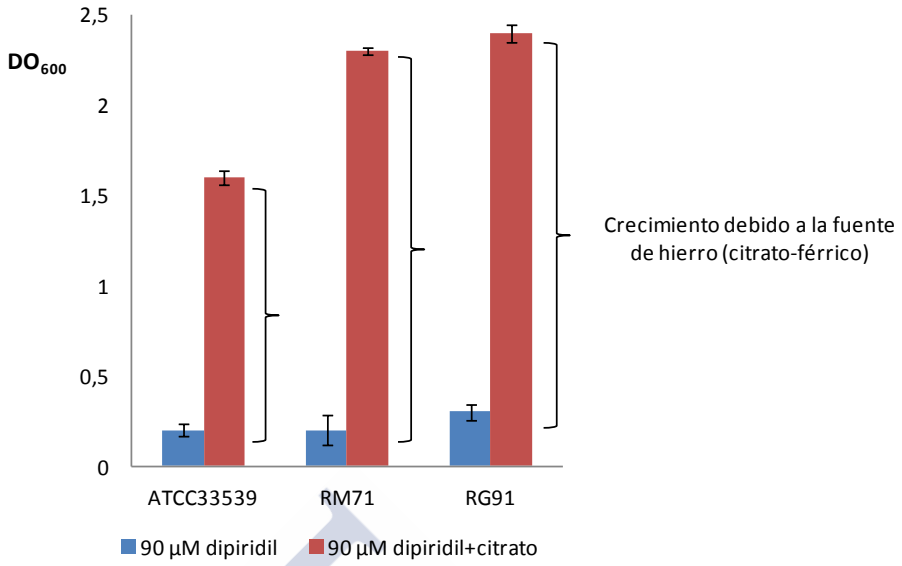

Figura IV.48: Crecimiento de las cepas representativas de los tres grupos (ATCC33539, RM71, RG91) en déficit de hierro (CM9 con 90 µM de dipiridil), y en el mismo medio con citrato férrico 10 µM.

A continuación se buscaron en los genomas de *P. damselae* subsp. *damselae*, homólogos del receptor FecA utilizando para ello secuencias de proteínas FecA de especies próximas. Aunque no se encontró ningún receptor con una homología clara con FecA, sí se encontraron los transportadores de citrato férrico FecABCD. De hecho, FecB fue una de las proteínas hierro-reprimidas (FecB, *spot* 70; Tabla IV.1), que identificamos anteriormente en el apartado 2.1.1. También encontramos en el genoma de las tres cepas el sistema FeoABC para el transporte del ión Fe^{+2}.

Nos planteamos la hipótesis de que alguno de los receptores y proteínas TonB previamente descritos en apartados anteriores de este estudio, pudiesen jugar un papel en la captación del citrato. Para evaluar esta posibilidad, se hicieron crecer diferentes mutantes en condiciones de déficit de hierro, con y sin citrato añadido. En la Figura IV.49 podemos observar que ninguno de los dos receptores dependientes de TonB, VDA_0839 y fhuE funcionan como receptores del citrato férrico en la cepa RM71 ya que ninguno de los mutantes BP10 (*ΔVDA_0839*) y BP14 (*ΔfhuE*), incluso el doble mutante BP22 (*ΔfhuE-VDA_0839*), mostraba cambio fenotípico alguno con respecto a la cepa salvaje en cuanto a su crecimiento en presencia de citrato férrico. Tampoco se

observaron cambios en los mutantes TonB. Si bien hay una ligera disminución del crecimiento en los mutantes BP18 (*ΔtonB1*) y BP19 (*ΔtonB2*) con respecto a la cepa salvaje, no encontramos cambios en el mutante doble BP25 (*ΔtonB1-ΔtonB2*) y triple BP32 (*ΔtonB1-tonB2-tonB3*).

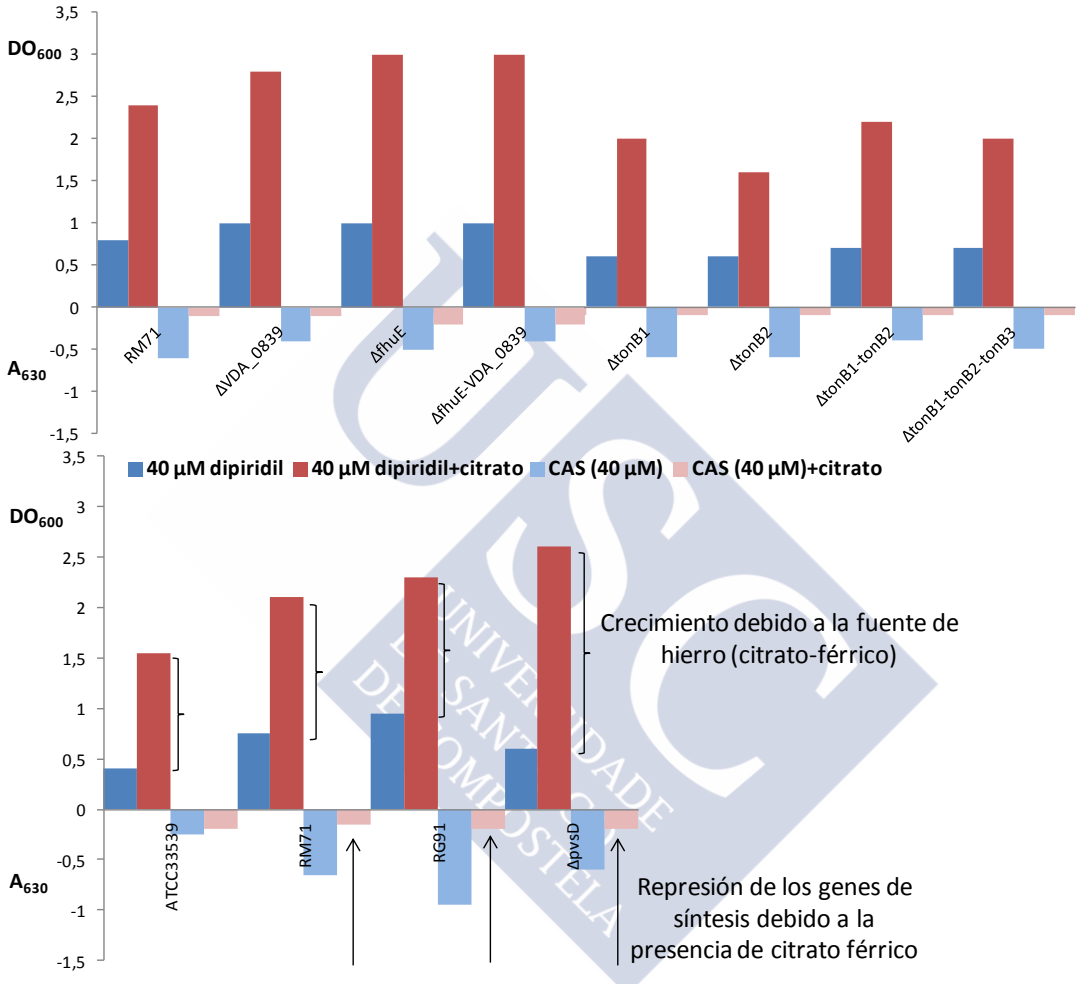

Figura IV.49: Crecimiento (DO_{600}) y valores de CAS (A_{630}) de las cepas crecidas en medio CM9 con 40 µM de dipiridil, y en el mismo medio con citrato-férrico 10 µM. A: Mutantes de los dos receptores dependientes de TonB (*ΔVDA_0839, ΔfhuE* y *ΔfhuE-VDA_0839*) y de los genes *tonB* (*ΔtonB1*, *ΔtonB2, ΔtonB1-ΔtonB2 y ΔtonB1-tonB2-tonB3*). B: Cepas representativas de los tres grupos (ATCC33539, RM71, RG91) y el mutante RG91 (*ΔpvsD*).

Se sabe que en *V. anguillarum* la producción de sideróforos de tipo catecol es inhibida por la presencia del citrato férrico (Mazoy et al., 1997). En la Figura IV.49 podemos ver que en las cepas RM71 y RG91 la presencia del citrato férrico inhibe la síntesis del sideróforo, en cambio en la cepa ATCC33539 no existe ningún cambio, lo que

apoya nuestras observaciones anteriores de que no existe producción de sideróforo en las cepas de tipo C. También es cierto que los microorganismos son capaces de detectar la presencia de sideróforos en el medio extracelular, llegando a la sobreexpresión de los receptores y a la inhibición de los genes de síntesis de su propio sideróforo (Pelludat et al., 1998; Brickman et al., 2001; Anderson & Armstrong, 2004), por lo que en nuestro caso el citrato podría funcionar como un sideróforo cuya expresión es regulada por si mismo.

La adquisición de citrato por *P. damselae* subsp. *damselae* debe ser independiente de TonB, ya que como vemos en la Figura IV.50 el mutante de los genes *tonB1* y *tonB2,* BP36 (*ΔtonB1-ΔtonB2*) de la cepa RG91, sigue creciendo en déficit de hierro (40 µM de dipiridil), aún a pesar de que el receptor de vibrioferrina es dependiente de TonB (a PsuA le proporciona energía TonB2 y a PvuA le proporcionan energía TonB1 y TonB2) (Tanabe et al., 2011). Esto concuerda con lo descrito por Biville et al. (2014) en el sentido de que tanto el citrato como el PPi podrían adquirirse por transportadores independientes de TonB. Es interesante destacar que PorA, una porina independiente de TonB que permite la internalización de PPi presenta una cierta homología con OmpU, proteína que hemos identificado en este estudio como parte de la fracción de proteínas hierro-reprimidas (*spot* 57; Tabla IV.1), que identificamos anteriormente en el apartado 2.1.1.

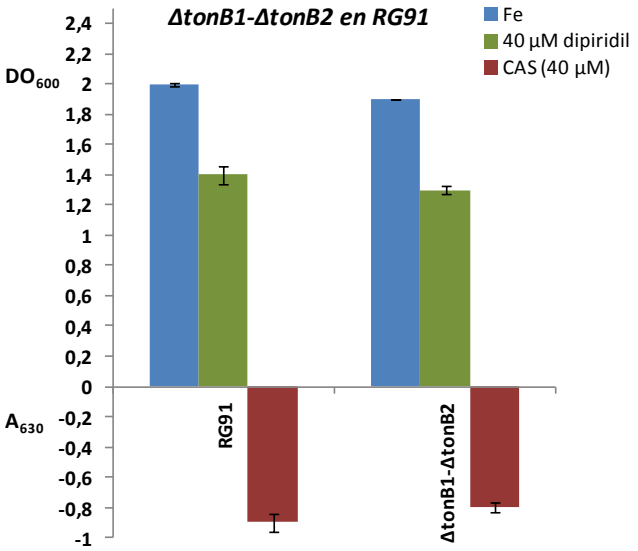

Figura IV.50: Crecimiento a las 12 h y valores de CAS del doble mutante BP36 (*ΔtonB1-tonB2*), bajo condiciones de déficit de hierro.

Es cierto que la actividad sideróforа se debe al citrato?

Se ha determinado que la cepa RM71 produce una molécula basada en citrato en un medio con déficit de hierro, que presenta actividad quelante, y que el mutante de *pvsD* de RG91 sigue dando resultados positivos en el ensayo CAS. Además se comprobó que las tres cepas de *P. damselae* subsp*. damselae* son capaces de utilizar citrato como fuente de hierro, y que probablemente el receptor sea independiente de TonB. Por tanto, podemos preguntarnos en este momento si los valores de CAS observados en las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* podrían deberse a una acumulación de citrato. Para ello debemos responder antes a la pregunta de cuál es la cantidad mínima de citrato que da lugar a un resultado positivo en el test CAS. En la Figura IV.51 vemos la representación de la concentración de citrato que consigue virar el CAS. Con una concentración de 0,1 mM de citrato, conseguimos un valor de CAS de -0,5, aproximadamente el valor de CAS de las cepas de tipo B. Además, podemos observar que existe una correlación directa entre la concentración de citrato y los valores de CAS (Figura IV.51).

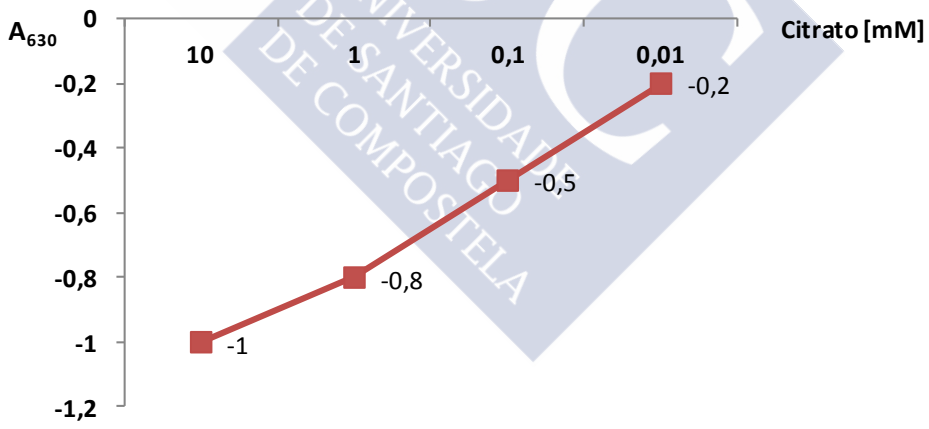

Figura IV.51: Representación de los valores de CAS de muestras de distintas concentraciones de citrato de sodio en medio mínimo CM9.

Existen algunas bacterias como *Bradyrhizobium japonicum* que pueden sintetizar el citrato en un medio con déficit de hierro y utilizarlo como un sideróforo (Guerinot et al., 1990). Además Park et al. (1994) estudiaron la regulación del gen *gltA*, que codifica

la enzima citrato sintasa en *E. coli*, y observaron que su expresión se reducía un 30% al añadirle un exceso de hierro al medio.

Qusimos comprobar por tanto si los valores de CAS que presentaban las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* crecidas en déficit de hierro se debían a una acumulación significativa de citrato que pudiera ser utilizado como sideróforo.

Se sabe que algunas cepas de *E. coli* presentan una acumulación de 2 mM de citrato cuando crecen en un medio mínimo con glucosa (Bennett et al., 2009). En este estudio nos plateamos por tanto determinar si la acumulación de citrato en el sobrenadante de la cepa RM71 está regulada por la concentración de hierro. Tal y como se observa en la Figura IV.52, cuando la cepa RM71 es crecida bajo condiciones de déficit de hierro (40 µM de dipiridil) la cepa acumula una cantidad de 5,5 mM de citrato. En cambio, en condiciones de exceso de hierro los valores de acumulación de citrato fueron de 0,93 mM. Estos resultados indican que la producción basal de citrato aumentaría 5 veces cuando la bacteria se encuentra en condiciones de déficit de hierro.

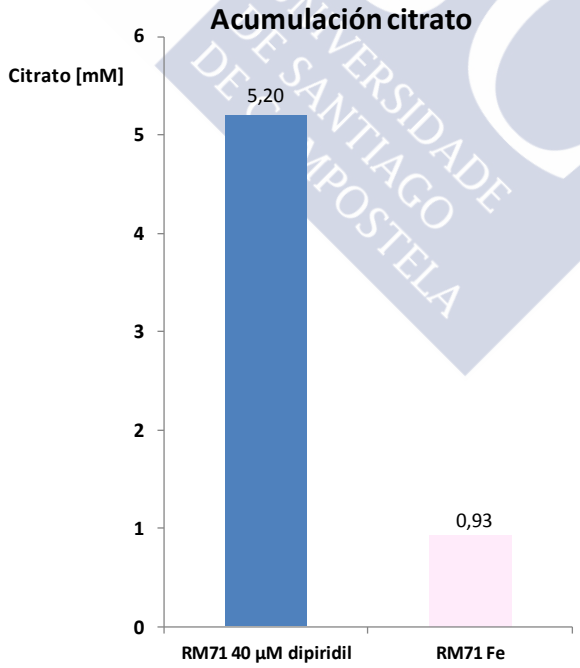

Figura IV.52 Acumulación de citrato en el medio por la cepa RM71 crecida en CM9 con 40 µM de dipiridil y con exceso de hierro.

Tal y como se muestra en la Figura IV.51 concentraciones de citrato entre 0,01 mM y 10 mM dan resultado positivo en el ensayo CAS con valores entre -0,2 y -1,0 (A_{630}). Estos valores concuerdan con la cuantificación de citrato acumulado en los sobrenadantes estudiados (Figura IV.53). Como vemos, las cepas RM71 y BP52 (*ΔpvsD*) crecidas en déficit de hierro (35 µM dipiridil) acumulan citrato en concentraciones de 5-6 mM (aumentan 5 veces la concentración de citrato) y dan valores de CAS en torno a -0,65. En cambio las cepas de *E. coli* (K12) y *V. anguillarum* (RV22), utilizadas como control, no acumulaban citrato, siendo destacable el hecho de que la cepa *E. coli* K12 presenta valores de CAS muy altos, debidos a la producción de enterobactina. Curiosamente en la cepa de tipo A RG91 (que produce vibrioferrina) los valores elevados de CAS (-0,85) no parecen deberse a la acumulación de citrato, ya que sólo acumulan en torno a 1,5 mM. Esta observación sugiere que la síntesis de citrato está regulada por la concentración de vibrioferrina en el sobrenadante. De hecho se observa también que cuando se elimina la producción de vibrioferrina en la cepa RG91 (mutante *pvsD*), aumenta la acumulación de citrato hasta los 5 mM.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

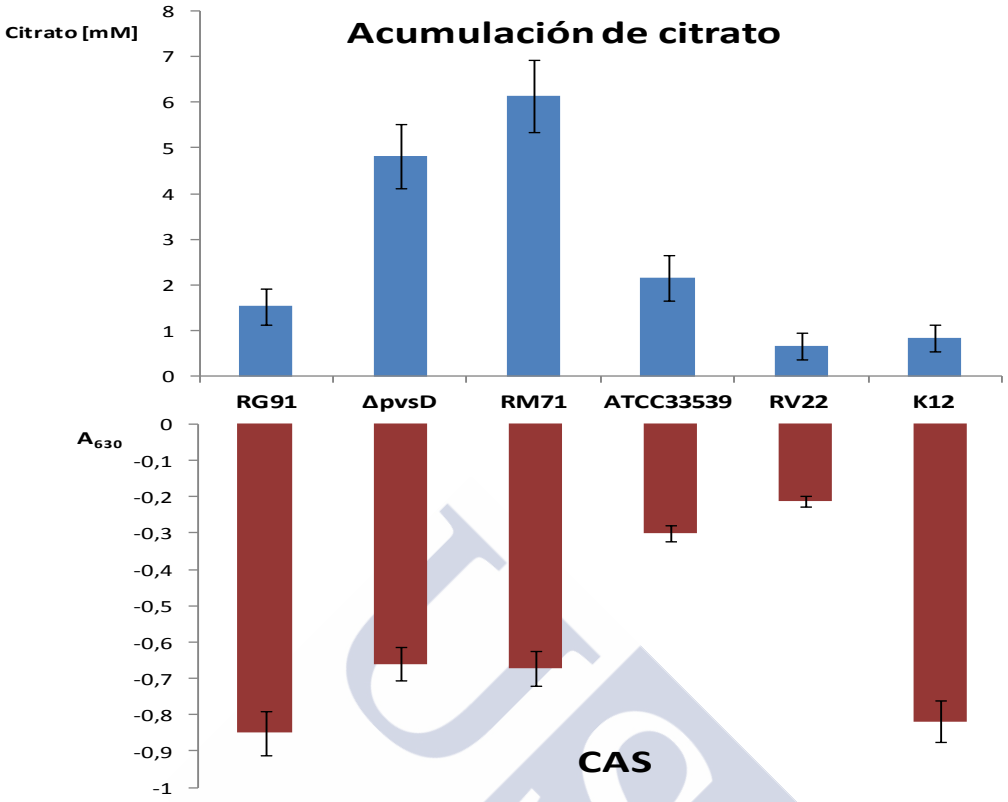

Figura IV.53: Valores de CAS (A_{630}) y acumulación de citrato (mM) de las tres cepas representativas (ATCC33539, RM71 y RG91), del mutante de síntesis de vibrioferrina BP52 (*ΔpvsD*) y de dos cepas no productoras de vibrioferrina, *V. anguillarum* RV22 y *E. coli* K12, crecidas en CM9 con 35 µM de dipiridil, después de 12 h.

Volviendo hacia atrás, en el apartado 3.1 decíamos que la mutación de *pvsD* en RG91 parece convertir a esta cepa en una cepa de tipo B, a efectos de producción de sideróforos. Lo que observamos aquí es que la presencia de otra fuente de hierro inhibe la expresión del segundo sideróforo. Aunque ambos sistemas, el basal del citrato y el de vibrioferrina, posiblemente adquirido por transferencia horizontal, no se encuentren próximos en el cromosoma, es muy probable que su transcripción se corregule, porque las regiones promotoras en ambos operones contienen cajas Fur. Mientras que en la cepa RM71 la presencia de un único sistema de captación de hierro mediada por sideróforos sería suficiente para la colonización, no es descartable que la presencia de sistemas adicionales en la cepa RG91 pudiese contribuir a un mejor crecimiento en el hospedador donde hay disponibles múltiples fuentes de hierro. Sin embargo, como se ha descrito en el apartado 2.4 (Figura IV.29), la presencia del sistema de vibrioferrina no

parece aportar una ventaja en infecciones experimentales, ya que no hay diferencias significativas en la virulencia para peces. Se han descrito evidencias que sugieren que la enterobactina y la aerobactina en *E. coli* cumplen diferentes papeles en la adquisición de hierro *in vivo*: la enterobactina adquiere hierro, predominantemente extracelular, que está unido a la transferrina y la aerobactina interviene en la obtención de hierro preferentemente a partir de complejos de hierro intracelular (Torres et al., 2001).

El hierro extracelular en el hospedador se encuentra formando complejos con la transferrina, lactoferrina y citrato (Griffiths, 1991). Como vemos en la Figura IV.54 (A), las cepas tipo A (RG91) en presencia de citrato inhiben la síntesis de vibrioferrina, ya que los valores de CAS de la cepa salvaje RG91 (produce vibrioferrina) y de la cepa mutante BP52 (*ΔpvsD*) (no sintetiza vibrioferrina) crecidas en presencia de citrato son equivalentes. Por el contrario, cuando la vibrioferrina está presente, los niveles de citrato en el medio descienden drásticamente (Figura IV.54 B). Es probable que la expresión de vibrioferrina se limite a entornos en los que *P. damselae* subsp. *damselae* conviva con bacterias que produzcan los mismos sideróforos. Como ya se mencionó anteriormente la adquisición de vibrioferrina en las cepas de tipo A (RG91) podría ser el resultado de adaptaciones a las interacciones bióticas con miembros del género *Vibrio*, consiguiendo así que varios componentes de un determinado nicho compartan los mismos recursos (Cordero et al., 2012).

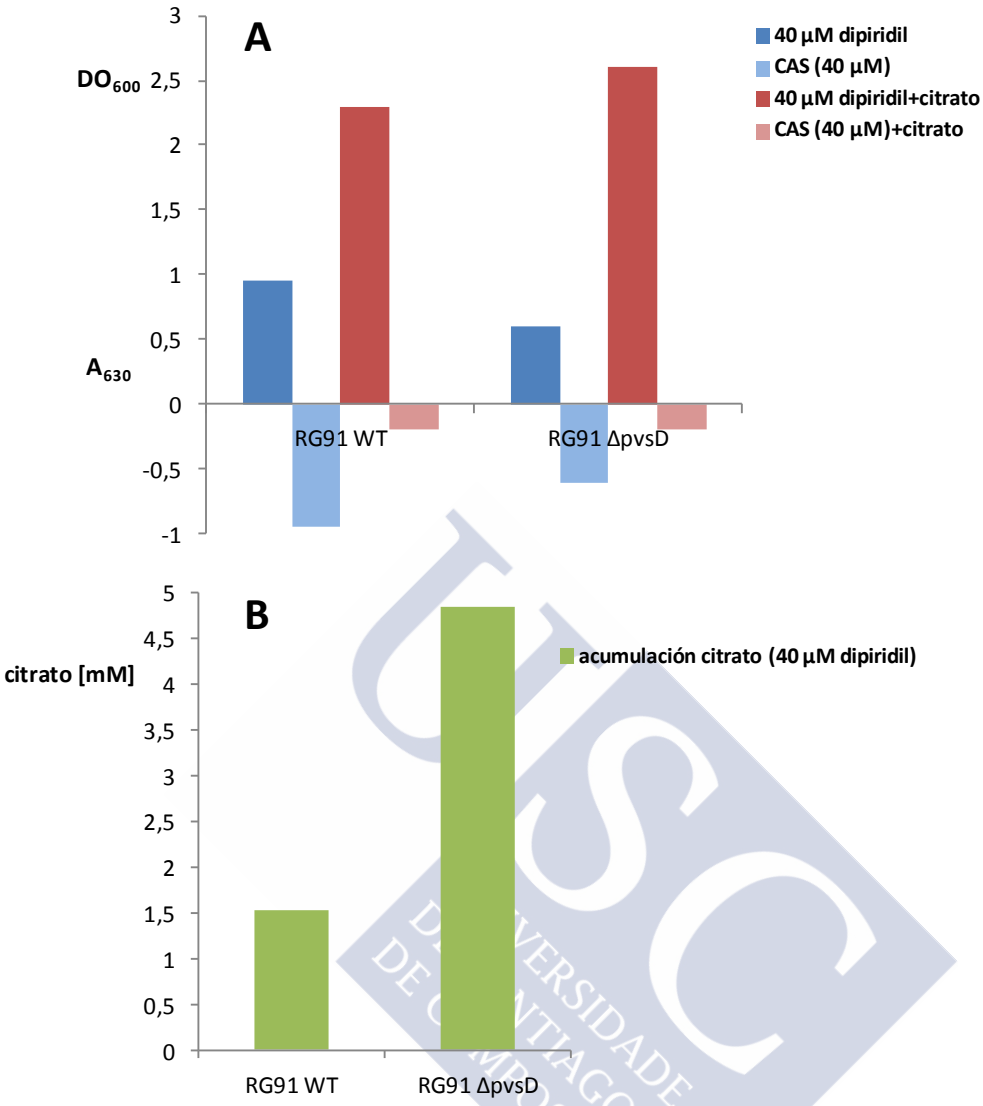

Figura IV.54: Posible corregulación de la síntesis de sideróforos en la cepa RG91. A: Crecimiento (DO_{600}) y valores de CAS (A_{630}) de la cepa salvaje RG91 (síntetiza vibrioferrina) y la cepa mutante BP52 (*ΔpvsD*) (no síntetiza vibrioferrina) durante 12 h en CM9 con 40 µM de dipiridil con y sin citrato. B: Acumulación de citrato en la cepa salvaje RG91 y el mutante BP52 (*ΔpvsD*) crecidas durante 12 h en CM9 con 40 µM de 2,2´-dipiridil.

En este momento podemos decir por tanto que las cepas de tipo A (RG91), presentan dos sistemas de asimilación de hierro, el del sideróforo vibrioferrina adquirido vía transferencia horizontal, y la acumulación de citrato que sería común en todas las cepas de *P. damselae* subsp*. damselae.* La vibrioferrina se captaría a través de un sistema con dos receptores dependientes de TonB, el PsuA y el PvuA (Tanabe et al., 2011). Según lo descrito en la literatura, lo más probable es que el citrato pase al espacio periplásmico a través de porinas, después el complejo Fe-citrato se separaría y

el Fe^{+2} pasaría al citoplasma a través de los transportadores FeoABC (Marshall et al., 2009), o seguiría unido al citrato y llegaría al citoplasma a través de los transportadores FecBCDE (Staudenmaier et al., 1989; Yue et al., 2003; Ogierman & Braun, 2003; Braun & Endriss, 2007) (Figura IV.55). La expresión de uno u otro sideróforo en RG91 estaría regulada recíprocamente como vemos en la Figura IV.54.

Es conocido que poseer distintos mecanismos de adquisición de hierro aumenta la versatilidad de una bacteria para crecer en distintos ambientes (Schmidt & Hensel, 2004; Rohmer et al., 2011). En los vertebrados existe hierro extracelular en forma de citrato férrico (Griffiths, 1991), por lo que las cepas de tipo A de *P. damselae* subsp. *damselae* tendrían una mayor ventaja al poder utilizar citrato como sideróforo dentro del hospedador. Sin embargo, fuera del hospedador las cepas de tipo A se adaptarían a los ecosistemas marinos utilizando principalmente vibrioferrina, uno de los sideróforos más extendidos dentro de las bacterias marinas. Mediante la adquisición de elementos genéticos móviles se facilitaría la utilización de la misma fuente de hierro (vibrioferrina) por parte de los componentes de un mismo nicho ecológico (Cordero et al., 2012; Rohmer et al., 2011). En cambio las cepas tipo B (RM71) que sintetizarían únicamente citrato como sideróforo, probablemente estarían menos adaptadas para sobrevivir en nuevos nichos ecológicos fuera del hospedador.

La cepa ATCC33539 (tipo C) es capaz de captar el citrato pero no de acumularlo en grandes cantidades (Figura IV.53). Hemos mencionado la posibilidad de que exista una mutación puntual en los genes de síntesis del sideróforo común en las cepas tipo C (ATCC33539). Si el sideróforo común está basado en el citrato, esta explicación parece improbable, ya que el citrato, además de poder funcionar como quelante de hierro, es esencial para las bacterias dado que forma parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Hemos visto en el apartado 3.4 que entre los genes que comparten las cepas RM71 y RG91 se encuentran dos posibles exportadores. Se sabe que en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium el exportador de citrato férrico IceT parece ser capaz de exportar tanto citrato solo como citrato férrico, aunque la función en este caso sería la de expulsar el exceso de hierro a través de su unión al citrato (Frawley et al., 2013). Podríamos pensar que alguno de los exportadores que contienen las cepas de tipo A y B

y que no están presentes en las de tipo C de *P. damselae* subsp*. damselae*, sean los responsables de la exportación al medio de altos niveles de citrato. También existe la posibilidad de que una mutación en la regulación de la síntesis de citrato en las cepas de tipo A y B, diese lugar a una sobreproducción, originando un aumento de la concentración de citrato en el citoplasma bacteriano (Figura IV.55), que en cierta medida sería perjudicial para las células al tratarse de uno de los componentes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que es un ciclo muy regulado. Pero al mismo tiempo podría constituir una ventaja evolutiva al disponer la bacteria de una nueva posibilidad para crecer en entornos con déficit de hierro.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

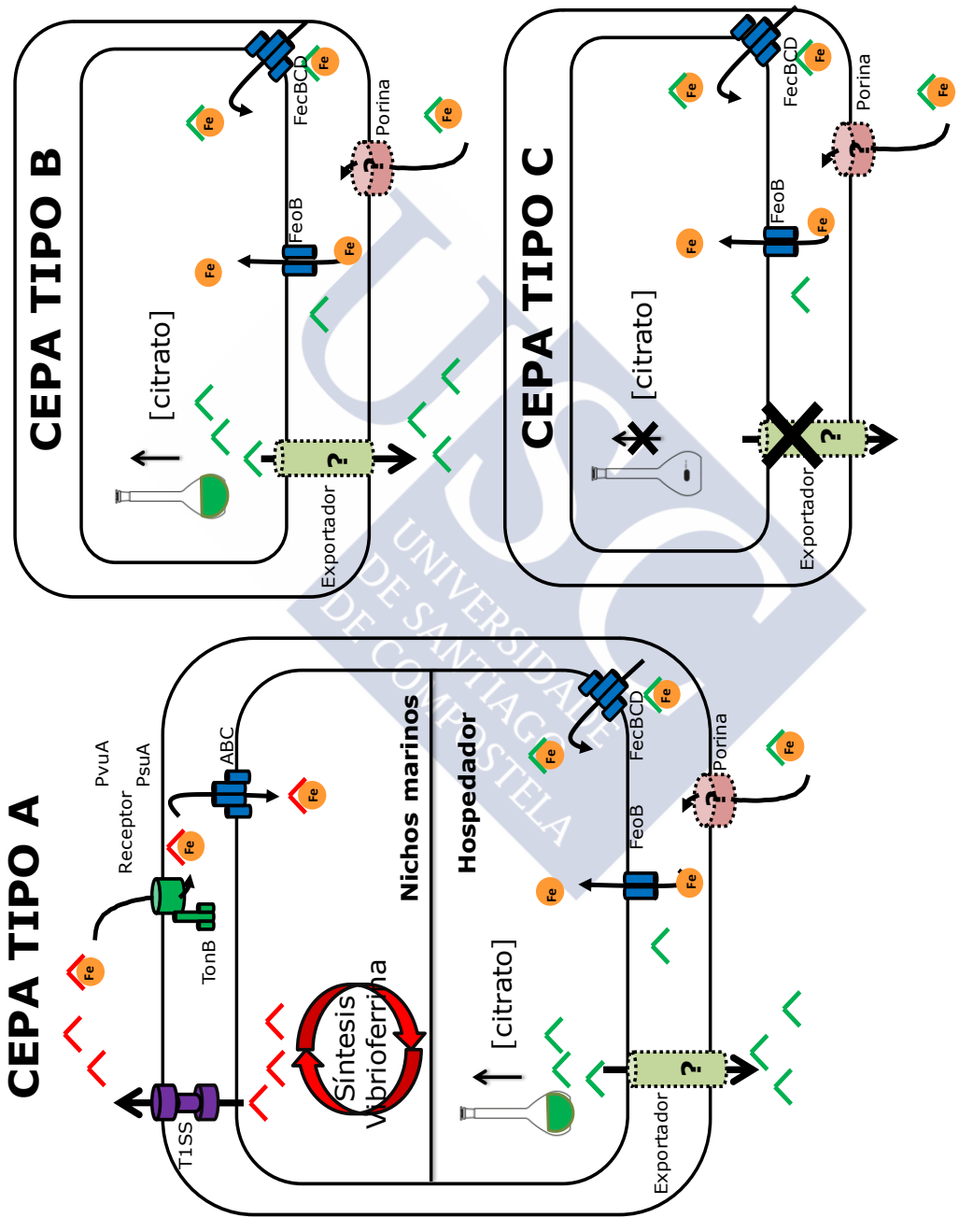

Figura IV.55: Representación de los sistemas de captación de hierro mediante sideróforo en las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae*.

Recapitulación de los resultados obtenidos y consideraciones finales

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo podemos decir que en *P. damselae* subsp*. damselae* existe una heterogeneidad entre cepas con respecto al crecimiento en déficit de hierro, pudiendo dividirlas en tres grupos: tipo A (RG91), tipo B (RM71) y tipo C (ATCC33539), clasificados de manera descendente en cuanto a su capacidad de crecimiento y de producción de sideróforos.

Las tres cepas mencionadas presentan cromosomas sinténicos en cuanto a la organización de los genes. Al igual que otras vibrionáceas sus genomas se organizan en dos cromosomas, siendo el cromosoma 1 de mayor tamaño que el cromosoma 2. La mayoría de las proteínas hierro-inducidas se encuentran codificadas en el cromosoma 1. La única diferencia entre las tres cepas es la presencia de secuencias cromosómicas concretas, que corresponden a las zonas variables que codifican los LPS, así como a elementos de transferencia horizontal como fagos, profagos o islas genéticas.

Todas las cepas contienen en su genoma los genes regulados por hierro que codifican diversos componentes del sistema de transporte del grupo hemo (cromosoma 1), todos ellos descritos anteriormente en *P. damselae* (Rio et al., 2005). Además presentan dos genes que codifican dos receptores dependientes de TonB VDA_0839 y FhuE (cromosoma 2), tres genes que codifican las proteínas TonB1 (cromosoma 1), TonB2 y TonB3 (cromosoma 2) respectivamente, y un operón de genes en el cromosoma 1 (*aroA-trpEGDCBA*) que codifican la ruta biosintética del corismato y del triptófano. Ninguno de estos genes está involucrado en la síntesis del sideróforo en la cepa tipo B (RM71).

Las cepas de tipo A presentan una región en el cromosoma 2 con características típicas de las Islas de Patogenicidad (Schmidt & Hensel, 2004), como son una zona de integración formada por un gen del ARNt, una integrasa y secuencias de inserción (transposasas). Esta isla contiene todos los genes de síntesis y transporte del sideróforo vibrioferrina, que se encuentran organizados en dos operones: *pvsABCDE* (síntesis) y *psuA-pvuABCDE* (transporte) siguiendo la misma estructura que en *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* (Tanabe et al., 2003; Wang et al., 2007). El gen de síntesis *pvsD* en la

cepa RG91 es responsable de la síntesis de vibrioferrina, aunque su mutación afecta sólo parcialmente al crecimiento y a la producción de sideróforos en condiciones de limitación de hierro, ya que los mutantes de este gen dan resultados equivalentes a las cepas de tipo B (RM71). La mutación del receptor *pvuA* en RG91 no produce cambios fenotípicos observables, a diferencia de lo que ocurre en *V. parahaemolyticus* (Tanabe et al., 2011). Todo ello nos conduce a plantear que las cepas de tipo A y B producirían un compuesto común con actividad sideróforа que además tendría su propio sistema de transporte. La síntesis de vibrioferrina en las cepas tipo A (RG91) no les confiere una ventaja a la hora de producir una infección en rodaballo. Esto sugiere que la adquisición de este sistema podría más bien proporcionar una ventaja en la adaptación a diferentes nichos marinos (Rohmer et al., 2011), como por ejemplo los microecosistemas habitados por otros vibrios, compartiendo así los mismos recursos (Cordero et al., 2012).

Las cepas de tipo A (RG91 y su derivado el mutante BP52 (*ΔpvsD*)), B (RM71) y C (ATCC33539) crecidas en déficit de hierro, son capaces de utilizar citrato férrico como fuente de hierro, aumentando con ello su capacidad de crecimiento. Además, la presencia de citrato parece regular no solo su propia producción y/o exportación al medio extracelular, sino también la producción de vibrioferrina en RG91. Se ha encontrado mediante fraccionamiento biodirigido una fracción con actividad quelante en el sobrenadante de la cepa de tipo A (RM71) crecida en déficit de hierro, y se ha demostrado que contiene una molécula basada en el citrato. También se ha comprobado que el citrato, a una concentración de 0,1 mM, da un resultado positivo en el ensayo CAS. La cepa de tipo B (RM71) y la cepa mutante BP52 (*ΔpvsD*), son capaces de acumular una gran cantidad de citrato cuando crecen en medios con déficit de hierro, y este resultado se corresponde con los valores de CAS. También es cierto que la cepa de tipo A (RG91), acumula muy poco citrato en el medio en presencia de vibrioferrina. Una posible explicación podría ser que las cepas de tipo A (RG91) sinteticen citrato como sideróforo cuando se encuentren dentro del hospedador y, en cambio, utilizen la vibrioferrina cuando se encuentren compartiendo nichos ecológicos con Vibrios. En cuanto a la captación de citrato por parte de la célula, ésta podría estar mediada por la porina OmpU (identificada entre las proteínas hierro-reprimidas) dado que nuestros

datos apuntan a que el transporte de citrato no se haría a través de un receptor dependiente de TonB.

La cepa de tipo C (ATCC33539) muestra valores de CAS muy bajos, y aunque es capaz de captar citrato no lo acumula en elevadas concentraciones cuando crece en medios con déficit de hierro, lo cual podría deberse bien a la ausencia de una sobreproducción del citrato o bien a la carencia de un exportador eficaz del mismo.

Como conclusión final podemos decir por tanto que la mayoría de cepas de *P. damselae* subsp*. damselae* probablemente utilizan como sideróforo un compuesto basado en el citrato, que sería el sideróforo ancestral común en esta subespecie. Además, algunas cepas contienen en su genoma una isla genética, adquirida por transferencia horizontal, que les confiere la capacidad de sintetizar y utilizar el sideróforo vibrioferrina, lo cual les podría proporcionar alguna ventaja selectiva en ciertas condiciones y en ciertos nichos ecológicos, puesto que estas cepas muestran una mayor capacidad de crecimiento en condiciones limitantes de hierro.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

V. CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan nuevos conocimientos acerca de los sistemas de asimilación de hierro mediante sideróforos que utiliza *Photobacterium damselae* subsp*. damselae*.

Las conclusiones que se extraen de todo lo expuesto son:

1. En *P. damselae* subsp*. damselae* existe una heterogeneidad intraespecífica en la capacidad de crecimiento en déficit de hierro y en la producción de sideróforos, pudiéndose clasificar las cepas en tres grupos bien diferenciados: Cepas tipo A (ej. RG91), con una alta capacidad de crecimiento en limitación de hierro y producción de sideróforos; cepas tipo B (ej. RM71), con crecimiento en déficit de hierro y producción de sideróforos intermedios; cepa tipo C (ATCC33539), con limitada capacidad de crecer en déficit de hierro y valores de CAS muy bajos.

2. Los estudios de proteómica en la cepa RG91 han permitido identificar una serie de genes relacionados con la asimilación de hierro, así como otros relacionados con otros posibles factores de virulencia, cuya expresión se incrementa en condiciones de déficit de hierro.

3. Las cepas tipo A contienen en su genoma una isla de patogenicidad que incluye los operones *pvsABCDE* (síntesis) y *psuA-pvuABCDE* (transporte) del sideróforo vibrioferrina. Los mutantes de la cepa RG91 en los que se inactiva el gen de síntesis *pvsD* no sintetizan vibrioferrina pero mantienen tanto la capacidad de crecer en condiciones limitantes de hierro como la actividad sideróforа en el ensayo CAS, aunque con valores inferiores a los de la cepa parental. Dicha isla genómica está ausente en las demás cepas.

4. Los ensayos de virulencia con mutantes de la cepa RG91 deficientes en la síntesis de vibrioferrina, muestran que la producción de este sideróforo no parece representar una ventaja a la hora de causar una infección en el rodaballo.

5. El fenotipo del mutante RG91-*ΔpvsD* y la existencia de cepas no portadoras de los genes de vibrioferrina, sugieren que existe un sideróforo común en todas las cepas de la subespecie *damselae*.

6. El estudio de diferentes mutantes demuestra que ni el operón de genes *aroA-trpEGDCBA* -que es ubicuo en la subespecie- de la ruta biosintética del triptófano y del corismato, ni los transportadores FhuE o VDA_0839, ni tampoco ninguno de los tres sistemas TonB, intervienen en la biosíntesis y transporte de este posible sideróforo común.

7. Las cepas RM71 y RG91-*ΔpvsD* crecidas en déficit de hierro acumulan 5 veces más citrato en el sobrenadante que las cepas de *E. coli* (K12) y *V. anguillarum* (RV22). El fraccionamiento biodirigido ha permitido aislar un compuesto con capacidad quelante de hierro en cuya estructura participa el citrato.

8. La producción de vibrioferrina por las cepas tipo A inhibiría en ellas la biosíntesis del segundo sideróforo común a las demás cepas, lo que podría explicar que la cepa RG91 no acumule citrato en el sobrenadante cuando se está utilizando el sistema de la vibrioferrina.

9. El sideróforo común de todas las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* es probablemente una molécula basada en el citrato cuyos genes de síntesis forman parte de la fracción de los genes esenciales de esta bacteria. Esto último se ve apoyado por el hecho de que no se haya podido aislar ningún mutante por transposición en genes de biosíntesis de dicha molécula.

10. La heterogeneidad de las cepas de *P. damselae* subsp*. damselae* con respecto al crecimiento en déficit de hierro y a los valores de CAS, se explicaría por tanto por la producción de dos tipos de sideróforo diferentes: las cepas tipo B producen un

sideróforo basado en el citrato, mientras que las de tipo A producen además vibrioferrina.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

VI. BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Abdul-Tehrani, H., Hudson, A. J., Chang, Y. S., Timms, A. R., Hawkins, C., Williams, J. M., et al. (1999). Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *Journal of Bacteriology.* **181**, 1415-1428.

Aeckersberg, F., Lupp, C., Feliciano, B., & Ruby, E. G. (2001). *Vibrio fischeri* outer membrane protein OmpU plays a role in normal symbiotic colonization. *Journal of Bacteriology.* **183**, 6590-6597.

Aguirre, A. A., Balazs, G. H., Zimmerman, B., & Spraker, T. R. (1994). Evaluation of hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. *Journal of Wildlife Diseases.* **30**, 8-15.

Aigbivbalu, L., & Maraqa, N. (2009). *Photobacterium damsela* wound infection in a 14-year-old surfer. *Southern Medical Journal.* **102**, 425-426.

Alice, A. F., Naka, H., & Crosa, J. H. (2008). Global gene expression as a function of the iron status of the bacterial cell: Influence of differentially expressed genes in the virulence of the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity.* **76**, 4019-4037.

Álvarez, J. R., Lamba, S., Dyer, K. Y., & Apuzzio, J. J. (2006). An unusual case of urinary tract infection in a pregnant woman with *Photobacterium damsela*. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology.* **2006**, 80682.

Amin, S. A. (2009). Vibrioferrin, an unusual marine siderophore: Iron binding, photochemistry, and biological implications. *Inorganic Chemistry.* **48**, 11451-11458.

Anderson, M. T., & Armstrong, S. K. (2004). The BfeR regulator mediates enterobactin-inducible expression of *Bordetella enterobactin* utilization genes. *Journal of Bacteriology.* **186**, 7302-7311.

Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quiñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews.* **27**, 215-237.

Ankenbauer, R. G., Toyokuni, T., Staley, A., Rinehart, K. L.,Jr, & Cox, C. D. (1988). Synthesis and biological activity of pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology.* **170**, 5344-5351.

Asato, J., & Kanaya, F. (2004). Fatal infection of the hand due to *Photobacterium damsela*: A case report. *Clinical Infectious Diseases.* **38**, 100-101.

Austin, B. (2010). Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology.* **140**, 310-317.

Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., et al. (2008). The RAST server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* **9**, 2164-2175.

Bach, S., de Almeida, A., & Carniel, E. (2000). The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiology Letters.* **183**, 289-294.

Bagg, A., & Neilands, J. B. (1987). Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiological Reviews.* **51**, 509-518.

Bakopoulos, V., Hanif, A., Poulos, K., Galeotti, M., Adams, A., & 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. Journal of Fish Diseases.* **27**, 1-13.

Balado, M., Osorio, C. R., & Lemos, M. L. (2008). Biosynthetic and regulatory elements involved in the production of the siderophore vanchrobactin in *Vibrio anguillarum*. *Microbiology.* **154**, 1400-1413.

Barber, G. R., & Swygert, J. S. (2000). Necrotizing fasciitis due to *Photobacterium damsela* in a man lashed by a stingray. *The New England Journal of Medicine.* **342**, 824.

Bardowski, J., Ehrlich, S. D., & Chopin, A. (1992). Tryptophan biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp*. lactis*. *Journal of Bacteriology.* **174**, 6563-6570.

Bari, W., Lee, K. M., & Yoon, S. S. (2012). Structural and functional importance of outer membrane proteins in *Vibrio cholerae* flagellum. *Journal of Microbiology.* **50**, 631-637.

Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., et al. (2004). The pfam protein families database. *Nucleic Acids Research.* **32**, 138-41.

Bennett, B. D., Kimball, E. H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S. J., & Rabinowitz, J. D. (2009). Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli. Nature Chemical Biology.* **5**, 593-599.

Berti, A. D., & Thomas, M. G. (2009). Analysis of achromobactin biosynthesis by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *Journal of Bacteriology.* **191**, 4594-4604.

Bisharat, N., Bronstein, M., Korner, M., Schnitzer, T., & Koton, Y. (2013). Transcriptome profiling analysis of *Vibrio vulnificus* during human infection. *Microbiology.* **159**, 1878-1887.

Biville, F., Brezillon, C., Giorgini, D., & Taha, M. K. (2014). Pyrophosphate-mediated iron acquisition from transferrin in *Neisseria meningitidis* does not require TonB activity. *PloS One.* **9**, e107612.

Boiko, A. V. (2000). The etiological structure of acute intestinal infections caused by noncholera *Vibrios* in the Volga delta. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, i Immunobiologii.* **1**, 15-17.

Bonet, R., Magariños, B., Romalde, J. L., Simon-Pujol, M. D., Toranzo, A. E., & Congregado, F. (1994). Capsular polysaccharide expressed by *Pasteurella piscicida* grown in vitro. *FEMS Microbiology Letters.* **124**, 285-289.

Bosch, M., Tarrago, R., Garrido, M. E., Campoy, S., Fernandez de Henestrosa, A. R., Perez de Rozas, A. M., et al. (2001). Expression of the *Pasteurella multocida ompH* gene is negatively regulated by the Fur protein. *FEMS Microbiology Letters.* **203**, 35-40.

Botella, S., Pujalte, M. J., Macian, M. C., Ferrus, M. A., Hernandez, J., & Garay, E. (2002). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and biochemical typing of P*hotobacterium damselae* subsp. *damselae*. *Journal of Applied Microbiology.* **93**, 681-688.

Boyd, E. F., Almagro-Moreno, S., & Parent, M. A. (2009). Genomic islands are dynamic, ancient integrative elements in bacterial evolution. *Trends in Microbiology.* **17**, 47-53.

Braun, V., & Endriss, F. (2007). Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins. *Biometals.* **20**, 219-231.

Brickman, T. J., Kang, H. Y., & Armstrong, S. K. (2001). Transcriptional activation of *Bordetella* alcaligin siderophore genes requires the AlcR regulator with alcaligin as inducer. *Journal of Bacteriology.* **183**, 483-489.

Brickman, T. J., & McIntosh, M. A. (1992). Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from E*scherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *The Journal of Biological Chemistry.* **267**, 12350-12355.

Buck, J. D., Wells, R. S., Rhinehart, H. L., & Hansen, L. J. (2006). Aerobic microorganisms associated with free-ranging bottlenose dolphins in coastal gulf of Mexico and Atlantic ocean waters. *Journal of Wildlife Diseases.* **42**, 536-544.

Bullen, J. J. (1981). The significance of iron in infection. *Reviews of Infectious Diseases.* **3**, 1127-1138.

Bultreys, A., Gheysen, I., & de Hoffmann, E. (2006). Yersiniabactin production by *Pseudomonas syringae* and *Escherichia coli,* and description of a second yersiniabactin locus evolutionary group. *Applied and Environmental Microbiology.* **72**, 3814-3825.

Calderwood, S. B., & Mekalanos, J. J. (1987). Iron regulation of shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *Journal of Bacteriology.* **169**, 4759-4764.

Carniel, E. (2001). The *Yersinia* high-pathogenicity island: An iron-uptake island. *Microbes and Infection.* **3**, 561-569.

Carpenter, B. M., Whitmire, J. M., & Merrell, D. S. (2009). This is not your mother's repressor: The complex role of Fur in pathogenesis. *Infection and Immunity.* **77**, 2590-2601.

Challis, G. L. (2005). A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem.* **6**, 601-611.

Challis G.L., & Hopwood D.A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **2**, 14555-14561.

Charbit, A., & Hofnung, M. (1985). Isolation of different bacteriophages using the LamB protein for adsorption on *Escherichia coli* K-12. *Journal of Virology.* **53**, 667-671.

Cheng, J., Huang, S., Yu, H., Li, Y., Lau, K., & Chen, X. (2010). Trans-sialidase activity of *Photobacterium damsela* alpha2,6-sialyltransferase and its application in the synthesis of sialosides. *Glycobiology.* **20**, 260-268.

Chiu, T. H., Kao, L. Y., & Chen, M. L. (2013). Antibiotic resistance and molecular typing of *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*, isolated from seafood. *Journal of Applied Microbiology.* **114**, 1184-1192.

Clarridge, J. E., & Zighelboim-Daum, S. (1985). Isolation and characterization of two hemolytic phenotypes of *Vibrio damsela* associated with a fatal wound infection. *Journal of Clinical Microbiology.* **21**, 302-306.

Company, R., Sitjà-Bobadilla, A., Pujalte, M. J., Garay, E., Alvarez-Pellitero, P., et al. (1999). Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex*, Dentex dentex L*. *Journal of Fish Diseases.* **22**, 299-309.

Cordero, O. X., Ventouras, L. A., DeLong, E. F., & Polz, M. F. (2012). Public good dynamics drive evolution of iron acquisition strategies in natural bacterioplankton populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* **109**, 20059-20064.

Cowles, K. N., Moser, T. S., Siryaporn, A., Nyakudarika, N., Dixon, W., Turner, J. J., et al. (2013). The putative poc complex controls two distinct *Pseudomonas aeruginosa* polar motility mechanisms. *Molecular Microbiology.* **90**, 923-938.

Cox, C. D. (1980). Iron reductases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology.* **141**, 199-204.

Crawford, I. P. (1989). Evolution of a biosynthetic pathway: The tryptophan paradigm. *Annual Review of Microbiology.* **43**, 567-600.

Crosa, J. H., & Walsh, C. T. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **66**, 223-249.

Cutter, D. L., & Kreger, A. S. (1990). Cloning and expression of the damselysin gene from *Vibrio damsela*. *Infection and Immunity.* **58**, 266-268.

Danielli, A., Roncarati, D., Delany, I., Chiarini, V., Rappuoli, R., & Scarlato, V. (2006). In vivo dissection of the *Helicobacter pylori* Fur regulatory circuit by genome-wide location analysis. *Journal of Bacteriology.* **188**, 4654-4662.

Darling, A. C., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2004). Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research.* **14**, 1394-1403.

De Ley, J., Mannheim, W., Mutters, R., Piechulla, K., Tytgat, R., Segers, P., et al. (1990). Inter- and intrafamilial similarities of rRNA cistrons of the *Pasteurellaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **40**, 126-137.

de Lorenzo, V., Bindereif, A., Paw, B. H., & Neilands, J. B. (1986). Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology.* **165**, 570-578.

de Lorenzo, V., & Martinez, J. L. (1988). Aerobactin production as a virulence factor: A reevaluation. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* **7**, 621-629.

Di Lorenzo, M., Stork, M., Tolmasky, M. E., Actis, L. A., Farrell, D., Welch, T. J., et al. (2003). Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain 775. *Journal of Bacteriology.* **185**, 5822-5830.

Diavatopoulos, D. A., Cummings, C. A., van der Heide, H. G., van Gent, M., Liew, S., Relman, D. A., et al. (2006). Characterization of a highly conserved island in the otherwise divergent *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* genomes. *Journal of Bacteriology,* **188**, 8385-8394.

do Vale, A., Marques, F., & Silva, M. T. (2003). Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damselae* subsp*. piscicida. Fish & Shellfish Immunology.* **15**, 129-144.

do Vale, A., Silva, M. T., dos Santos, N. M., Nascimento, D. S., Reis-Rodrigues, P., Costa-Ramos, C., et al. (2005). AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damselae*

subsp. piscicida with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Molecular Microbiology.* **58**, 1025-1038.

Dobrindt, U., & Reidl, J. (2000). Pathogenicity islands and phage conversion: Evolutionary aspects of bacterial pathogenesis. *International Journal of Medical Microbiology.* **290**, 519-527.

Donnenberg, M. S., & Kaper, J. B. (1991). Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infection and Immunity*. **59**, 4310-4317.

Dryden, M., Legarde, M., Gottlieb, T., Brady, L., & Ghosh, H. K. (1989). *Vibrio damsela* wound infections in Australia. *The Medical Journal of Australia.* **151**, 540-541.

Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzon, E., Caro, A., Rosa, R. D., Le Roux, F., et al. (2011). Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* **108**, 2993-2998.

Elhadi, N., Radu, S., Chen, C. H., & Nishibuchi, M. (2004). Prevalence of potentially pathogenic *Vibrio* species in the seafood marketed in Malaysia. *Journal of Food Protection,* **67**, 1469-1475.

Falkow, S., Isberg, R. R., & Portnoy, D. A. (1992). The interaction of bacteria with mammalian cells. *Annual Review of Cell Biology.* **8**, 333-363.

Faruque, S. M., & Mekalanos, J. J. (2003). Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. *Trends in Microbiology.* **11**, 505-510.

Fee, J. A. (1991). Regulation of *sod* genes in *Escherichia coli*: Relevance to superoxide dismutase function. *Molecular Microbiology.* **5**, 2599-2610.

Field, T. B., McCourt, J. L., McBryde, W.A. E. (1974). Composition and stability of iron and copper citrate complexes in aqueous solution. *Canadian Jornal Chemistry*. **52**, 3119-3124.

Fischer, E., Strehlow, B., Hartz, D., & Braun, V. (1990). Soluble and membrane-bound ferrisiderophore reductases of *Escherichia coli* K-12. *Archives of Microbiology.* **153**, 329-336.

Fouz, B., Barja, J. L., Amaro, C., Rivas, C., & Toranzo, A. E. (1993). Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolated from diseased fish. *Current Microbiology.* **27**, 341-347.

Fouz, B., Larsen, J. L., Nielsen, B., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1992). Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot S*cophthalmus maximus* in Spain. *Diseases of Aquatic Organisms.* **12**, 155-166.

Fouz, B., Biosca, E. G., & Amaro, C. (1997). High affinity iron-uptake systems in *Vibrio damsela:* Role in the acquisition of iron from transferrin. *Journal of Applied Microbiology.* **82**, 157-167.

Fouz, B., Toranzo, A. E., Biosca, E. G., Mazoy, R., & Amaro, C. (1994). Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. *FEMS Microbiology Letters.* **121**, 181-188.

Fouz, B., Toranzo, A. E., Marco-Noales, E., & Amaro, C. (1998). Survival of fish-virulent strains of *Photobacterium damselae* subsp*. damselae* in seawater under starvation conditions. *FEMS Microbiology Letters.* **168**, 181-186.

Fouz, B., Toranzo, A. E., Milan, M., & Amaro, C. (2000). Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*. *Journal of Applied Microbiology.* **88**, 531-535.

Francis, A. J., Dodge, C.J. (1993). Influence of complex structure on the biodegradation of iron-citrate complexes. *Applied and Environmental Microbiology.* **59**, 109–113.

Fraser, S. L., Purcell, B. K., Delgado, B.,Jr, Baker, A. E., & Whelen, A. C. (1997). Rapidly fatal infection due to *Photobacterium* (*Vibrio*) *damsela*. *Clinical Infectious Diseases.* **25**, 935-936.

Frawley, E. R., Crouch, M. L., Bingham-Ramos, L. K., Robbins, H. F., Wang, W., Wright, G. D., et al. (2013). Iron and citrate export by a major facilitator superfamily pump regulates metabolism and stress resistance in *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* **110**, 12054-12059.

Fujioka, R. S., Greco, S. B., Cates, M. B., & Schroeder, J. P. (1988). *Vibrio damsela* from wounds in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus. Diseases of Aquatic Organisms.* **4**, 1-8.

Fujita, M. J., Kimura, N., Sakai, A., Ichikawa, Y., Hanyu, T., & Otsuka, M. (2011). Cloning and heterologous expression of the vibrioferrin biosynthetic gene cluster from a marine metagenomic library. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* **75**, 2283-2287.

Fukushima, T., Sia, A. K., Allred, B. E., Nichiporuk, R., Zhou, Z., Andersen, U. N., & Raymond, K. N. (2012). *Bacillus cereus* iron uptake protein fishes out an unstable ferric citrate trimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA of America*. **109** 16829-16834

Funahashi, T., Moriya, K., Uemura, S., Miyoshi, S., Shinoda, S., Narimatsu, S., et al. (2002). Identification and characterization of *pvuA*, a gene encoding the ferric vibrioferrin receptor protein in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology.* **184**, 936-946.

Gancz, H., Censini, S., & Merrell, D. S. (2006). Iron and pH homeostasis intersect at the level of fur regulation in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity.* **74**, 602-614.

Gao, H., Zhou, D., Li, Y., Guo, Z., Han, Y., Song, Y., et al. (2008). The iron-responsive *fur* regulon in *Yersinia pestis*. *Journal of Bacteriology.* **190,** 3063-3075.

Garcia Cortes, V., & Antillon, F. (1990). Isolation of enteropathogenic *Vibrio* in bivalves and mud from the Nicoya gulf, Costa Rica. *Revista de Biologia Tropical.* **38**, 437-440.

Garcia-Rosado, E., Cano, I., Martin-Antonio, B., Labella, A., Manchado, M., Alonso, M. C., et al. (2007). Co-occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured sparid fish. *International Microbiology.* **10**, 193-199.

Gardes, A., Triana, C., Amin, S. A., Green, D. H., Romano, A., Trimble, L., et al. (2013). Detection of photoactive siderophore biosynthetic genes in the marine environment. *Biometals.* **26**, 507-516.

Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J. L., Gauthier, M., et al. (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. *International Journal of Systematic Bacteriology.* ***45*****,** 139-144.

Gomez-Gil, B., Fajer-Avila, E., & Garcia-Vargas, F. (2007). *Vibrios* of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869 from Northwestern Mexico. *Journal of Applied Microbiology.* **102**, 1518-1526.

Goodell, K. H., Jordan, M. R., Graham, R., Cassidy, C., & Nasraway, S. A. (2004). Rapidly advancing necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium* (*Vibrio*) *damsela*: A hyperaggressive variant. *Critical Care Medicine.* **32**, 278-281.

Green, R. J., Dafoe, D. C., & Raffin, T. A. (1996). Necrotizing fasciitis. *Chest.* **110**, 219-229.

Griffiths, E. (1991). Iron and bacterial virulence-a brief overview. *Biology of Metals.* **4**, 7-13.

Grimes, D. J., Stemmler, J., Hada, H., May, E. B., Maneval, D., Hetrick, F. M., Jones, R. T., Stoskcopf, M., Colwell, R. R. (1984). *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. *Microbial Ecology.* **10**, 271-282.

Guerinot, M. L., Meidl, E. J., & Plessner, O. (1990). Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology.* **172**, 3298-3303.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Oxford University Press.* **41**, 95-98.

Hanlon, R. T., Forsythe, J. W., Cooper, K. M., Dinuzzo, A. R., Folse, D. S., & Kelly, M. T. (1984). Fatal penetrating skin ulcers in laboratory-reared octopuses. *Journal of Invertebrate Pathology.* **44**, 67-83.

Hantke, K. (1984). Cloning of the repressor protein gene of iron-regulated systems in *Escherichia coli* K12. *Molecular & General Genetics.* **197**, 337-341.

Hantke, K. (2001). Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology.* **4**, 172-177.

Hantke, K. (1987). Ferrous iron transport mutants in *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiology Letters.* **44**, 53-57.

Harding, R. A., & Royt, P. W. (1990). Acquisition of iron from citrate by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology.* **136**, 1859-1867.

Henderson, D. P., & Payne, S. M. (1994). *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. *Infection and Immunity.* **62**, 5120-5125.

Herrero, M., de Lorenzo, V., & 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. *Journal of Bacteriology.* **172**, 6557-6567.

Hiles, I. D., Gallagher, M. P., Jamieson, D. J., & Higgins, C. F. (1987). Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Molecular Biology.* **195**, 125-142.

Himpsl, S. D., Pearson, M. M., Arewang, C. J., Nusca, T. D., Sherman, D. H., & Mobley, H. L. (2010). Proteobactin and a yersiniabactin-related siderophore mediate iron acquisition in *Proteus mirabilis*. *Molecular Microbiology.* **78**, 138-157.

Hou, Y. M. (1999). Transfer RNAs and pathogenicity islands. *Trends in Biochemical Sciences.* **24**, 295-298.

Hu, Z., Cheng, L., & Wang, H. (2015). The illumina-solexa sequencing protocol for bacterial genomes. *Methods in Molecular Biology.* **1231**, 91-97.

Huang, B., Ru, K., Yuan, Z., Whitchurch, C. B., & Mattick, J. S. (2004). TonB3 is required for normal twitching motility and extracellular assembly of type IV pili. *Journal of Bacteriology.* **186**, 4387-4389.

Hundenborn, J., Thurig, S., Kommerell, M., Haag, H., & Nolte, O. (2013). Severe wound infection with *Photobacterium damselae* ssp. *damselae* and *Vibrio harveyi*, following a laceration injury in marine environment: A case report and review of the literature. *Case Reports in Medicine.* **610632**, 1-7.

Ishihama, A. (1992). Role of the RNA polymerase alpha subunit in transcription activation. *Molecular Microbiology.* **6**, 3283-3288.

Izutsu, K., Kurokawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Hayashi, T., Honda, T., et al. (2008). Comparative genomic analysis using microarray demonstrates a strong correlation between the presence of the 80-kilobase pathogenicity island and pathogenicity in kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Infection and Immunity.* **76**, 1016-1023.

Juiz-Rio, S., Osorio, C. R., & Lemos, M. L. (2004). Identification and characterisation of the *fur* genes in *Photobacterium damselae* ssp. *piscicida* and ssp. *damselae*. *Diseases of Aquatic Organisms.* **58**, 151-156.

Kanchanopas-Barnette, P., Labella, A., Alonso, C. M., Manchado, M., Castro, D., & Borrego, J. J. (2009). The first isolation of *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* from Asian seabass *Lates calcarifer*. *Fish Pathology.* **44**, 47-50.

Kannan, T. R., Musatovova, O., Gowda, P., & Baseman, J. B. (2008). Characterization of a unique ClpB protein of *Mycoplasma pneumoniae* and its impact on growth. *Infection and Immunity.* **76**, 5082-5092.

Ketterer, P. J., & Eaves, L. E. (1992). Deaths in captive eels (*Anguila reinhardtii*) due to *Photobacterium* (*Vibrio*) *damsela*. *Australian Veterinary Journal.* **69**, 203-204.

Kim, S. Y., Thanh, X. T., Jeong, K., Kim, S. B., Pan, S. O., Jung, C. H., et al. (2014). Contribution of six flagellin genes to the flagellum biogenesis of *Vibrio vulnificus* and in vivo invasion. *Infection and Immunity.* **82**, 29-42.

Kim, H. R., Kim, J. W., Lee, M. K., & Kim, J. G. (2009). Septicemia progressing to fatal hepatic dysfunction in an cirrhotic patient after oral ingestion of *Photobacterium damsela*: A case report. *Infection.* **37**, 555-556

Klemm, P., Vejborg, R. M., & Hancock, V. (2010). Prevention of bacterial adhesion. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **88**, 451-459.

Kloosterman, H., Hessels, G. I., Vrijbloed, J. W., Euverink, G. J., & Dijkhuizen, L. (2003). (De)regulation of key enzyme steps in the shikimate pathway and phenylalanine-specific pathway of the actinomycete *Amycolatopsis methanolica*. *Microbiology.* **149**, 3321-3330.

Knight-Madden, J. M., Barton, M., Gandretti, N., & Nicholson, A. M. (2005). *Photobacterium damsela* bacteremia in a child with sickle-cell disease. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* **24**, 654-655.

Koster, W. (2001). ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Research in Microbiology.* **152**, 291-301.

Koster, W., & Braun, V. (1989). Iron-hydroxamate transport into *Escherichia coli* K12: Localization of FhuD in the periplasm and of FhuB in the cytoplasmic membrane. *Molecular & General Genetics.* **217**, 233-239.

Kothary, M. H., & Kreger, A. S. (1985). Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio damsela*. *Infection and Immunity.* **49**, 25-31.

Kreger, A. S. (1984). Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. *Infection and Immunity.* **44**, 326-331.

Kreger, A. S., Bernheimer, A. W., Etkin, L. A., & Daniel, L. W. (1987). Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytolysin and its interaction with sheep erythrocytes. *Infection and Immunity.* **55**, 3209-3212.

Kuehl, C. J., & Crosa, J. H. (2010). The TonB energy transduction systems in *Vibrio* species. *Future Microbiology.* **5**, 1403-1412.

Kunkle, C. A., & Schmitt, M. P. (2003). Analysis of the *Corynebacterium diphtheriae* DtxR regulon: Identification of a putative siderophore synthesis and transport system that is similar to the *Yersinia* high-pathogenicity island-encoded yersiniabactin synthesis and uptake system. *Journal of Bacteriology.* **185**, 6826-6840.

Kustusch, R. J., Kuehl, C. J., & Crosa, J. H. (2012). Three TonB systems in the human pathogen *Vibrio vulnificus*: Two contain the *ttpC* gene but only one of them is active in iron transport and virulence. *Journal of Bacteriology.* **194**, 3250-3259.

Labella, A., Manchado, M., Alonso, M. C., Castro, D., Romalde, J. L., & Borrego, J. J. (2010a). Molecular intraspecific characterization of *Photobacterium damselae* ssp*. damselae* strains affecting cultured marine fish. *Journal of Applied Microbiology.* **108**, 2122-2132.

Labella, A., Sanchez-Montes, N., Berbel, C., Aparicio, M., Castro, D., Manchado, M., et al. (2010b). Toxicity of *Photobacterium damselae* subsp*. damselae* strains isolated from new cultured marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms.* **92**, 31-40.

Labella, A., Vida, M., Alonso, M. C., Infante, C., Cardenas, S., Lopez-Romalde, S., et al. (2006). First isolation of *Photobacterium damselae* ssp*. damselae* from cultured redbanded seabream, *Pagrus auriga* Valenciennes, in Spain. *Journal of Fish Diseases.* ***29***, 175-179.

Le, D. T., Lee, B. C., Marino, S. M., Zhang, Y., Fomenko, D. E., Kaya, A., et al. (2009). Functional analysis of free methionine-R-sulfoxide reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry.* **284**, 4354-4364.

Lehane, L., & Rawlin, G. T. (2000). Topically acquired bacterial zoonoses from fish: A review. *The Medical Journal of Australia.* **173**, 256-259.

Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2007). Heme, an iron supply for Vibrios pathogenic for fish. *Biometals.* **20**, 615-626.

Lemos, M. L., Salinas, P., Toranzo, A. E., Barja, J. L., & Crosa, J. H. (1988). Chromosome-mediated iron uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology.* **170**, 1920-1925.

Lopez-Doriga, M. V., Barnes, A. C., dos Santos, N. M., & Ellis, A. E. (2000). Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*: Evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. *Microbiology.* **146**, 21-30.

Love, M., Teebken-Fisher, D., Hose, J. E., Farmer, J. J.,3rd, Hickman, F. W., & Fanning, G. R. (1981). *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science.* **214**, 1139-1140.

Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., et al. (2012). SOAPdenovo2: An empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *Gigascience.* **10**, 1186-2047.

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. *Applied and Environmental Microbiology.* **60**, 2990-2998.

Magariños, B., Romalde, J. L., Noya, M., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1996). Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiology Letters.* **138**, 29-34.

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 damselae* subsp. *piscicida* evidenced by random amplified polymorphic DNA analysis. *Epidemiology and Infection.* **125**, 213-219.

Marshall, B., Stintzi, A., Gilmour, C., Meyer, J. M., & Poole, K. (2009). Citrate-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter. *Microbiology.* **155**, 305-315

Martins, P., Cleary, D. F., Pires, A. C., Rodrigues, A. M., Quintino, V., Calado, R., et al. (2013). Molecular analysis of bacterial communities and detection of potential pathogens in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis*. *PloS One.* **8**, 80847.

Maspoli, A., Wenner, N., Mislin, G. L., & Reimmann, C. (2014). Functional analysis of pyochelin-/enantiopyochelin-related genes from a pathogenicity island of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *Biometals.* **27**, 559-573.

Masse, E., Salvail, H., Desnoyers, G., & Arguin, M. (2007). Small RNAs controlling iron metabolism. *Current Opinion in Microbiology.* **10**, 140-145.

Mazoy, R., Botana, L. M., Lemos, M. L. (1997). Iron uptake from ferric citrate by *Vibrio anguillarum*. *FEMS Microbiology Letters.* **154**, 145-150.

Mey, A. R., Craig, S. A., & Payne, S. M. (2005). Characterization of *Vibrio cholerae* RyhB: The RyhB regulon and role of *ryhB* in biofilm formation. *Infection and Immunity.* **73**, 5706-5719.

Miyamoto, K., Kosakai, K., Ikebayashi, S., Tsuchiya, T., Yamamoto, S., & Tsujibo, H. (2009). Proteomic analysis of *Vibrio vulnificus* M2799 grown under iron-repleted and iron-depleted conditions. *Microbial Pathogenesis.* **46**, 171-177.

Moraes, P. M., Seyffert, N., Silva, W. M., Castro, T. L., Silva, R. F., Lima, D. D., et al. (2014). Characterization of the opp peptide transporter of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in virulence and pathogenicity. *BioMed Research International*. 489782.

Morgenthau, A., Pogoutse, A., Adamiak, P., Moraes, T. F., & Schryvers, A. B. (2013). Bacterial receptors for host transferrin and lactoferrin: Molecular mechanisms and role in host-microbe interactions. *Future Microbiology.* **8**, 1575-1585.

Morris, J. G.,Jr, Miller, H. G., Wilson, R., Tacket, C. O., Hollis, D. G., Hickman, F. W., et al. (1982). Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae*. *Lancet.* **1,** 1294-1297.

Mouriño, S., Osorio, C. R., & Lemos, M. L. (2004). Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology.* **186**, 6159-6167.

Murphy, R. A., & Boyd, E. F. (2008). Three pathogenicity islands of *Vibrio cholerae* can excise from the chromosome and form circular intermediates. *Journal of Bacteriology.* **190**, 636-647.

Nag, S., Das, S., & Chaudhuri, K. (2005). In vivo induced *clpB1* gene of *Vibrio cholerae* is involved in different stress responses and affects in vivo cholera toxin production. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **331**, 1365-1373.

Naikare, H., Butcher, J., Flint, A., Xu, J., Raymond, K. N., & Stintzi, A. (2013). *Campylobacter jejuni* ferric-enterobactin receptor CfrA is TonB3 dependent and mediates iron acquisition from structurally different catechol siderophores. *Metallomics.* **5**, 988-996.

Naka, H., Hirono, I., & Aoki, T. (2005). Molecular cloning and functional analysis of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* haem receptor gene. *Journal of Fish Diseases.* **28**, 81-88.

Nakamura, Y., Uchihira, M., Ichimiya, M., Morita, K., & Muto, M. (2008). Necrotizing fasciitis of the leg due to *Photobacterium damsela*. *The Journal of Dermatology.* **35**, 44-45.

Nandal, A., Huggins, C. C., Woodhall, M. R., McHugh, J., Rodriguez-Quinones, F., Quail, M. A., et al. (2010). Induction of the ferritin gene (*ftnA*) of *Escherichia coli* by Fe(2+)-Fur is mediated by reversal of H-NS silencing and is RyhB independent. *Molecular Microbiology,* **75**, 637-657.

Neilands, J. B. (1995). Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *The Journal of Biological Chemistry.* **270**, 26723-26726.

Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., & Buchanan, S. K. (2010). TonB-dependent transporters: Regulation, structure, and function. *Annual Review of Microbiology.* **64**, 43-60.

Obendorf, D. L., Carson, J., & McManus, T. J. (1987). *Vibrio damsela* infection in a stranded leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *Journal of Wildlife Diseases.* **23**, 666-668.

Occhino, D. A., Wyckoff, E. E., Henderson, D. P., Wrona, T. J., & Payne, S. M. (1998). *Vibrio cholerae* iron transport: Haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Molecular Microbiology.* **29**, 1493-1507.

Odenbreit, S., M. Till, D. Hofreuter, G. Faller, and R. Haas. (1999). Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Molecular Microbiology.* **31***,* 1537–1548.

Oelschlaeger, T. A., Zhang, D., Schubert, S., Carniel, E., Rabsch, W., Karch, H., et al. (2003). The high-pathogenicity island is absent in human pathogens of *Salmonella enterica* subspecies I but present in isolates of subspecies III and VI. *Journal of Bacteriology.* **185**, 1107-1111.

Ogierman, M., & Braun, V. (2003). Interactions between the outer membrane ferric citrate transporter FecA and TonB: Studies of the FecA TonB box. *Journal of Bacteriology.* **185**, 1870-1885.

Okada, K., Iida, T., Kita-Tsukamoto, K., & Honda, T. (2005). *Vibrios* commonly possess two chromosomes. *Journal of Bacteriology.* **187**, 752-757.

O'Malley, S. M., Mouton, S. L., Occhino, D. A., Deanda, M. T., Rashidi, J. R., Fuson, K. L., et al. (1999). Comparison of the heme iron utilization systems of pathogenic *Vibrios*. *Journal of Bacteriology.* **181**, 3594-3598.

Ormonde, P., Horstedt, P., O'Toole, R., & Milton, D. L. (2000). Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology.* **182**, 2326-2328.

Osorio, C. R., Juiz-Rio, S., & Lemos, M. L. (2006). A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* is structurally and functionally related to the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Microbiology.* **152**, 3327-3341.

Osorio, C. R., Juiz-Rio, S., & Lemos, M. L. (2010). The ABC-transporter *hutCD* genes of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* are essential for haem utilization as iron source and are expressed during infection in fish. *Journal of Fish Diseases.* **33**, 649-655.

Osorio, C. R., Lemos, M. L., & Braun, V. (2004). Identification of Fur regulated genes in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damselae* ssp. *piscicida* using the Fur titration assay. *Biometals.* **17**, 725-733.

Osorio, C. R., Romalde, J. L., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (2000). Presence of phospholipase-D (*dly*) gene coding for damselysin production is not a pre-requisite for pathogenicity in *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*. *Microbial Pathogenesis.* **28**, 119-126.

Osorio, C. R., Rivas, A. J., Balado, M., Fuentes-Monteverde, J. C., Rodríguez, J., Jiménez, C., Lemos, M. L., & Waldor, M. K. (2015). A transmissible plasmid-borne pathogenicity island encodes siderophore piscibactin biosynthesis in the fish pathogen *Photobacterium damselae* subsp*. piscicida*. *Applied and Environmental Microbiology*. Manuscrito enviado.

Oves-Costales, D., Kadi, N., & Challis, G. L. (2009). The long-overlooked enzymology of a nonribosomal peptide synthetase-independent pathway for virulence-conferring siderophore biosynthesis. *Chemical Communications*. **43**, 6530-41.

Park, S. J., McCabe, J., Turna, J., & Gunsalus, R. P. (1994). Regulation of the citrate synthase (*gltA*) gene of *Escherichia coli* in response to anaerobiosis and carbon supply: Role of the *arcA* gene product. *Journal of Bacteriology.* **176**, 5086-5092.

Park, S. J., Tseng, C. P., & Gunsalus, R. P. (1995). Regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) operon expression in *Escherichia coli* in response to carbon supply and anaerobiosis: Role of *ArcA* and *fnr*. *Molecular Microbiology.* **15**, 473-482.

Pedersen, K., Dalsgaard, I., & Larsen, J. L. (1997). *Vibrio damsela* associated with diseased fish in Denmark. *Applied and Environmental Microbiology.* **63**, 3711-3715.

Pedersen, K., Skall, H. F., Lassen-Nielsen, A. M., Bjerrum, L., & Olesen, N. J. (2009). *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*, an emerging pathogen in Danish rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), mariculture. *Journal of Fish Diseases.* **32**, 465-472.

Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C. A., Schubert, S., & Heesemann, J. (1998). The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: Organization and siderophore-dependent regulation. *Journal of Bacteriology.* **180**, 538-546.

Perez-Tirse, J., Levine, J. F., & Mecca, M. (1993). *Vibrio damsela*. A cause of fulminant septicemia. *Archives of Internal Medicine.* **153**, 1838-1840.

Perry, R. D., Balbo, P. B., Jones, H. A., Fetherston, J. D., & DeMoll, E. (1999). Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: Biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiology.* **145**, 1181-1190.

Petermann, S. R., Sherwood, J. S., & Logue, C. M. (2008). The *Yersinia* high pathogenicity island is present in *Salmonella enterica* subspecies I isolated from turkeys. *Microbial Pathogenesis.* **45**, 110-114.

Postle, K., & Kadner, R. J. (2003). Touch and go: Tying TonB to transport. *Molecular Microbiology.* **49**, 869-882.

Ratledge, C., & Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology.* **54**, 881-941.

Richards, G. P., Watson, M. A., Crane, E. J.,3rd, Burt, I. G., & Bushek, D. (2008). *Shewanella* and *Photobacterium* spp. in oysters and seawater from the Delaware bay. *Applied and Environmental Microbiology.* **74**, 3323-3327.

Rio, S. J., Osorio, C. R., & Lemos, M. L. (2005). Heme uptake genes in human and fish isolates of *Photobacterium damselae*: Existence of *hutA* pseudogenes. *Archives of Microbiology.* **183**, 347-358.

Rivas, A. J., Balado, M., Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2011). The *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* hemolysins damselysin and HlyA are encoded within a new virulence plasmid. *Infection and Immunity.* **79**, 4617-4627.

Rivas, A. J., Balado, M., Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2013). Synergistic and additive effects of chromosomal and plasmid-encoded hemolysins contribute to hemolysis and virulence in *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*. *Infection and Immunity.* **81**, 3287-3299.

Rivas, A. J., Labella, A. M., Borrego, J. J., Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2014). Evidence for horizontal gene transfer, gene duplication and genetic variation as driving forces of the diversity of haemolytic phenotypes in *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*. *FEMS Microbiology Letters.* **355**, 152-162.

Rohmer, L., Hocquet, D., & Miller, S. I. (2011). Are pathogenic bacteria just looking for food? metabolism and microbial pathogenesis. *Trends in Microbiology,* **19**, 341-348.

Sakata, T., Matsuura, M., & Shimokawa, Y. (1989). Characteristics of *Vibrio damsela* isolated from diseased yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Nippon Suisan Gakkaishi.* **55**, 135-141.

Sambrook, J. & Rusell, D. W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. ed 3. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.*

Sauer, M., Hantke, K., & Braun, V. (1987). Ferric-coprogen receptor FhuE of *Escherichia coli*: Processing and sequence common to all TonB-dependent outer membrane receptor proteins. *Journal of Bacteriology.* **169**, 2044-2049.

Schalk, I. J. (2013). Innovation and originality in the strategies developed by bacteria to get access to iron. *Chembiochem.* **14**, 293-294.

Schalk, I. J., Hannauer, M., & Braud, A. (2011). New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental Microbiology.* **13**, 2844-2854.

Schmidt, H., & Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews.* **17**, 14-56.

Schubert, S., Cuenca, S., Fischer, D., & Heesemann, J. (2000). High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures and urine samples: Prevalence and functional expression. *The Journal of Infectious Diseases.* **182**, 1268-1271.

Schwarzer, D., Finking, R., & Marahiel, M. A. (2003). Nonribosomal peptides: From genes to products. *Natural Product Reports.* **20**, 275-287.

Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry.* **160**, 47-56.

Sebastian, S., Agarwal, S., Murphy, J. R., & Genco, C. A. (2002). The gonococcal *fur* regulon: Identification of additional genes involved in major catabolic, recombination, and secretory pathways. *Journal of Bacteriology.* **184**, 3965-3974.

Serracca, L., Ercolini, C., Rossini, I., Battistini, R., Giorgi, I., & Prearo, M. (2011). Occurrence of both subspecies of *Photobacterium damselae* in mullets collected in the River Magra (italy). *Canadian Journal of Microbiology.* **57**, 437-440.

Severi, E., Hood, D. W., & Thomas, G. H. (2007). Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology.* **153**, 2817-2822.

Shin, J. H., Shin, M. G., Suh, S. P., Ryang, D. W., Rew, J. S., & Nolte, F. S. (1996). Primary *Vibrio damsela* septicemia. *Clinical Infectious Diseases.* **22**, 856-857.

Sigel, S. P., Stoebner, J. A., & Payne, S. M. (1985). Iron-vibriobactin transport system is not required for virulence of *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity.* **47**, 360-362.

Silva, D. S., Pereira, L. M., Moreira, A. R., Ferreira-da-Silva, F., Brito, R. M., Faria, T. Q., et al. (2013). The apoptogenic toxin AIP56 is a metalloprotease A-B toxin that cleaves NF-kappaB P65. *PLoS Pathogens.* **9**, e1003128.

Silva, M. T., Dos Santos, N. M., & do Vale, A. (2010). AIP56: A novel bacterial apoptogenic toxin. *Toxins.* **2**, 905-918.

Smajs, D., Smarda, J., & Weinstock, G. M. (2003). The *Escherichia fergusonii iucABCD iutA* genes are located within a larger chromosomal region similar to pathogenicity islands. *Folia Microbiologica.* **48**, 139-147.

Smith, S. K., Sutton, D. C., Fuerst, J. A., & Reichelt, J. L. (1991). Evaluation of the genus *Listonella* and reassignment of *Listonella damsela* (Love et al.) MacDonell and Colwell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* comb. nov. with an emended description. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **41**, 529-534.

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. *Journal of Bacteriology.* **88**, 1814-1815.

Song, Y. L., Cheng, W., & Wang, C. H. (1993). Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. *Journal of Invertebrate Pathology.* **61**, 24-31

Souto, A., Montaos, M. A., Rivas, A. J., Balado, M., Osorio, C. R., Rodríguez, J., et al. (2012). Structure and biosynthetic assembly of piscibactin, a siderophore from *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*, predicted from genome analysis. *European Journal of Organic Chemistry.* **29**, 5693-5700.

Staudenmaier, H., Van Hove, B., Yaraghi, Z., & Braun, V. (1989). Nucleotide sequences of the *fecBCDE* genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-binding-protein-dependent transport mechanism for iron(III) dicitrate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* **171**, 2626-2633.

Stoebner, J. A., & Payne, S. M. (1988). Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity.* **56**, 2891-2895.

Stojiljkovic, I., & Perkins-Balding, D. (2002). Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria. *DNA and Cell Biology.* **21**, 281-295.

Stork, M., Di Lorenzo, M., Mouriño, S., Osorio, C. R., Lemos, M. L., & Crosa, J. H. (2004). Two *tonB* systems function in iron transport in *Vibrio anguillarum*, but only one is essential for virulence. *Infection and Immunity.* **72**, 7326-7329.

Sugita, H., Shinagawa, Y., & Okano, R. (2000). Neuraminidase-producing ability of intestinal bacteria isolated from coastal fish. *Letters in Applied Microbiology.* **31**, 10-13.

Tamayo, R., Tischler, A. D., & Camilli, A. (2005). The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *The Journal of Biological Chemistry.* **280***,* 33324-33330.

Tanabe, T., Funahashi, T., Nakao, H., Miyoshi, S., Shinoda, S., & Yamamoto, S. (2003). Identification and characterization of genes required for biosynthesis and transport of the siderophore vibrioferrin in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology.* **185***,* 6938-6949.

Tanabe, T., Funahashi, T., Okajima, N., Nakao, H., Takeuchi, Y., Miyamoto, K., et al. (2011). The *Vibrio parahaemolyticus pvuA1* gene (formerly termed *psuA*) encodes a second ferric vibrioferrin receptor that requires *tonB2*. *FEMS Microbiology Letters.* **324***,* 73-79.

Tanabe, T., Nakao, H., Kuroda, T., Tsuchiya, T., & Yamamoto, S. (2006). Involvement of the *Vibrio parahaemolyticus pvsC* gene in export of the siderophore vibrioferrin. *Microbiology and Immunology.* **50**, 871-876.

Tang, W. M., & Wong, J. W. (1999). Necrotizing fasciitis caused by *Vibrio damsela*. *Orthopedics.* **22**, 443-444.

Teixido, L., Carrasco, B., Alonso, J. C., Barbe, J., & Campoy, S. (2011). Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the *hilD* operator in vivo and in vitro. *PloS One.* **6***,* 19711.

Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology.* **3**, 711-721.

Thyssen, A., Grisez, L., van Houdt, R., & Ollevier, F. (1998). Phenotypic characterization of the marine pathogen *Photobacterium damselae* subsp*. piscicida*. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **48**, 1145-1151.

Tison, D. L., & Kelly, M. T. (1984). *Vibrio* species of medical importance. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* **2**, 263-276.

Tolmasky, M. E., Actis, L. A., & Crosa, J. H. (1995). A histidine decarboxylase gene encoded by the *Vibrio anguillarum* plasmid pJM1 is essential for virulence: Histamine is a precursor in the biosynthesis of anguibactin. *Molecular Microbiology.* **15**, 87-95.

Torres, A. G., Redford, P., Welch, R. A., & Payne, S. M. (2001). TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli:* Aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infection and Immunity.* **69**, 6179-6185.

Valdenegro-Vega, V., Naeem, S., Carson, J., Bowman, J. P., Tejedor del Real, J. L., & Nowak, B. (2013). Culturable microbiota of ranched southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii* Castelnau). *Journal of Applied Microbiology.* **115**, 923-932.

Vesth, T., Lagesen, K., Acar, O., & Ussery, D. (2013). CMG-biotools, a free workbench for basic comparative microbial genomics. *PloS One.* **8**, 60120.

Vieira, J., & Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology.* **153**, 3-11.

Wang, Q., Liu, Q., Cao, X., Yang, M., & Zhang, Y. (2008). Characterization of two TonB systems in marine fish pathogen *Vibrio alginolyticus*: Their roles in iron utilization and virulence. *Archives of Microbiology.* **190**, 595-603.

Wang, Q., Liu, Q., Ma, Y., Zhou, L., & Zhang, Y. (2007). Isolation, sequencing and characterization of cluster genes involved in the biosynthesis and utilization of the siderophore of marine fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. *Archives of Microbiology.* **188**, 433-439.

Wang, R. F., & Kushner, S. R. (1991). Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene.* **100**, 195-199.

Wang, X. H., Oon, H. L., Ho, G. W., Wong, W. S., Lim, T. M., & Leung, K. Y. (1998). Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in vibrio-fish epithelial cell interactions. *Microbiology.* **144**, 2987-3002.

Weaver, E. A., Wyckoff, E. E., Mey, A. R., Morrison, R., & Payne, S. M. (2013). FeoA and FeoC are essential components of the *Vibrio cholerae* ferrous iron uptake system, and FeoC interacts with FeoB. *Journal of Bacteriology.* **195**, 4826-4835.

Whitfield, C., & Valvano, M. A. (1993). Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Advances in Microbial Physiology.* **35**, 135-246.

Wilderman, P. J., Sowa, N. A., FitzGerald, D. J., FitzGerald, P. C., Gottesman, S., Ochsner, U. A., et al. (2004). Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* **101**, 9792-9797.

Wyckoff, E. E., Boulette, M. L., & Payne, S. M. (2009). Genetics and environmental regulation of *Shigella* iron transport systems. *Biometals.* **22**, 43-51.

Wyckoff, E. E., Mey, A. R., & Payne, S. M. (2007). Iron acquisition in *Vibrio cholerae*. *Biometals..* **20**, 405-416.

Wyckoff, E. E., Schmitt, M., Wilks, A., & Payne, S. M. (2004). HutZ is required for efficient heme utilization in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology.* **186**, 4142-4151.

Xiong, X. P., Zhang, B. W., Yang, M. J., Ye, M. Z., Peng, X. X., & Li, H. (2010). Identification of vaccine candidates from differentially expressed outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* in response to NaCl and iron limitation. *Fish & Shellfish Immunology.* **29**, 810-816.

Yamamoto, S., Hara, Y., Tomochika, K., & Shinoda, S. (1995). Utilization of hemin and hemoglobin as iron sources by *Vibrio parahaemolyticus* and identification of an iron-repressible hemin-binding protein. *FEMS Microbiology Letters.* **128**, 195-200.

Yamamoto, S., Okujo, N., Yoshida, T., Matsuura, S., & Shinoda, S. (1994). Structure and iron transport activity of vibrioferrin, a new siderophore of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Biochemistry.* **115**, 868-874.

Yamane, K., Asato, J., Kawade, N., Takahashi, H., Kimura, B., & Arakawa, Y. (2004). Two cases of fatal necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium damsela* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology.* **42**, 1370-1372.

Yeterian, E., Martin, L. W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I. L., & Schalk, I. J. (2010). Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids.* **38**, 1447-1459.

Yucel, N., & Balci, S. (2010). Prevalence of *Listeria*, *Aeromonas*, and *Vibrio* species in fish used for human consumption in Turkey. *Journal of Food Protection.* **73**, 380-384.

Yue, W. W., Grizot, S., & Buchanan, S. K. (2003). Structural evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrane transporter FecA. *Journal of Molecular Biology.* **332**, 353-368.

Yuen, K. Y., Ma, L., Wong, S. S., & Ng, W. F. (1993). Fatal necrotizing fasciitis due to *Vibrio damsela*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases.* **25**, 659-661.

Zhang, X. J., Qin, G. M., Bing, X. W., Yan, B. L., & Bi, K. R. (2011). Phenotypic and molecular characterization of *Photobacterium damselae*, a pathogen of the cultured tongue sole

Cynoglossus semilaevis in China. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research.* **45**, 1-13.

Zhao, D. H., Sun, J. J., Liu, L., Zhao, H. H., Wang, H. F., Liang, L. Q., et al. (2009). Characterization of two phenotypes of *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* isolated from diseased juvenile *Trachinotus ovatus* reared in cage mariculture. *Journal of the World Aquaculture Society.* **40**, 281-289.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA